

Određivanje spola kod morskih kornjača pod utjecajem temperature

Marinković, Mija

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:629425>

Rights / Prava: [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI CI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ODRE IVANJE SPOLA KOD MORSKIH
KORNJA A POD UTJECAJEM TEMPERATURE
TEMPERATURE DEPENDENT SEX
DETERMINATION IN SEA TURTLES

SEMINARSKI RAD

Mija Marinkovi

Prediplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate study of molecular biology)

Mentor: prof. Dr. sc. Gordana Lackovi Venturin

Zagreb, 2010.

Sadržaj

1. Uvod.....	2
2.1. Morske kornja e.....	3
2.2. Spolni život morskih kornja a.....	4
2.3. Mehanizmi determinacije spolova.....	6
2.3.1. Kromosomska determinacija spola.....	7
2.3.2. Okolišno uvjetovana determinacija spola (temperaturna determinacija spola).....	7
2.4. Geni uklju eni u determinaciju spola.....	9
2.5. Ekspresija <i>Sox9</i> gena u gonadama <i>Lepidochelys olivacea</i>	10
2.6. Ekspresija <i>Dax1</i> , <i>Dmrt1</i> i <i>Sox9</i> gena za vrijeme temperaturne determinacije spola kod <i>L. olivacea</i>	13
2.7. Uloga estrogena kod kornja a u spolnoj determinaciji.....	15
2.8. Utjecaj poliklornih bifenilnih spojeva na TSD kod kornja a.....	17
2.9. Globalno zatopljenje i temperaturna determinacija spola.....	19
3. Zaklju ak.....	20
4. Sažetak/summary.....	21
5. Literatura.....	22

1. Uvod

Sve do otkrija spolnih kromosoma vjerovalo se da su okoliš, temperatura i ishrana ključni pri određivanju spola. Danas nam je poznato da oboje, i okoliš i unutarnji mehanizmi određivanja spola, mogu djelovati u različitim vrsta.

Spol većine kornjača određen je okolišnim imbenikom. U ovih gmažova temperatura jaja, za vrijeme određenog razdoblja razvitka, predstavlja odlučujući imbenik u određenju spola. Ona djeluje poput prekida koji se pri određenim temperaturama pali i pokreće molekularne procese koji će u koncu nici kao ishod dati određeni spol ili se gasi pa se zaustavlja kaskada procesa i dolazi do formiranja suprotnog spola. Samo male promjene u temperaturi mogu uzrokovati dramatične promjene u omjeru spolova.

Temperaturna determinacija spola je najbolje proučena kod riba i gmažova, ali se to i drugi molekularni mehanizam još uvijek ne zna. Poznato je da neki geni koji su ključni za kromosomalnu determinaciju sudjeluju i u temperaturnoj determinaciji. Također se zna kako pojedine tvari iz ovjekova okoliša mogu djelovati na način da dolazi do promjene spola na temperaturama pri kojima se inače rađaju ženke ili mužjaci.

Problem modernog doba je i općepovećanje temperature na Zemlji. Kakva je sudbina vrsta sa temperaturnom determinacijom? Da li će izumrijeti ili će se ipak prilagoditi novonastalim uvjetima?

2.1. Morske kornja e

Kornja e (*Testudines*, ranije *Testudinata* i *Chelonia*) predstavljaju vrlo staru i primitivnu skupinu gmazova; njihovi najstariji pronaeni fosilni nalazi datiraju iz razdoblja Perma, što je oko 280 milijuna godina prije nove ere. Morske kornja e su gmazovi koji potje u s kopna, otkud su prije otprilike 200 milijuna godina prešle u more. U prvih 50 do 100 milijuna godina evolucija se pobrinula za itav niz promjena kojima su se te životinje prilagodile novom okolišu. Noge su se razvile u peraje, oklop je postao spljošten i hidrodinamičan, a udovi i glava se više ne mogu uvu i u njega. Ipak, zadržale su se neke tipi ne znajuće svih gmazova; dišu plušima pa svako toliko moraju na površinu kako bi udahnule i nemaju stalnu tjelesnu toplinu (poikilotermni) pa je ne mogu održavati neovisnom od temperature vanjske sredine te su stoga i najzastupljenije u tropskim krajevima (Castro i Huber, 2005). Red kornja e obuhvaća 11 porodica sa 25 rodova i oko 250 vrsta.

Na zemlji danas živi 7 vrsta morskih kornja e i svrstane u dvije porodice *Cheloniidae* i *Dermochelyidae*. To su:

1. Glavata želva (*Caretta caretta*)
2. Sedmopruga usminja ka (*Dermochelys coriacea*)
3. Zelena želva (*Chelonia mydas*)
4. Karetina želva (*Eretmochelys imbricata*)
5. Australska zelena želva (*Natator depressus*)
6. Kempijeva želva (*Lepidochelys kempi*)
7. Maslinasta ili pacifička želva (*Lepidochelys olivacea*)

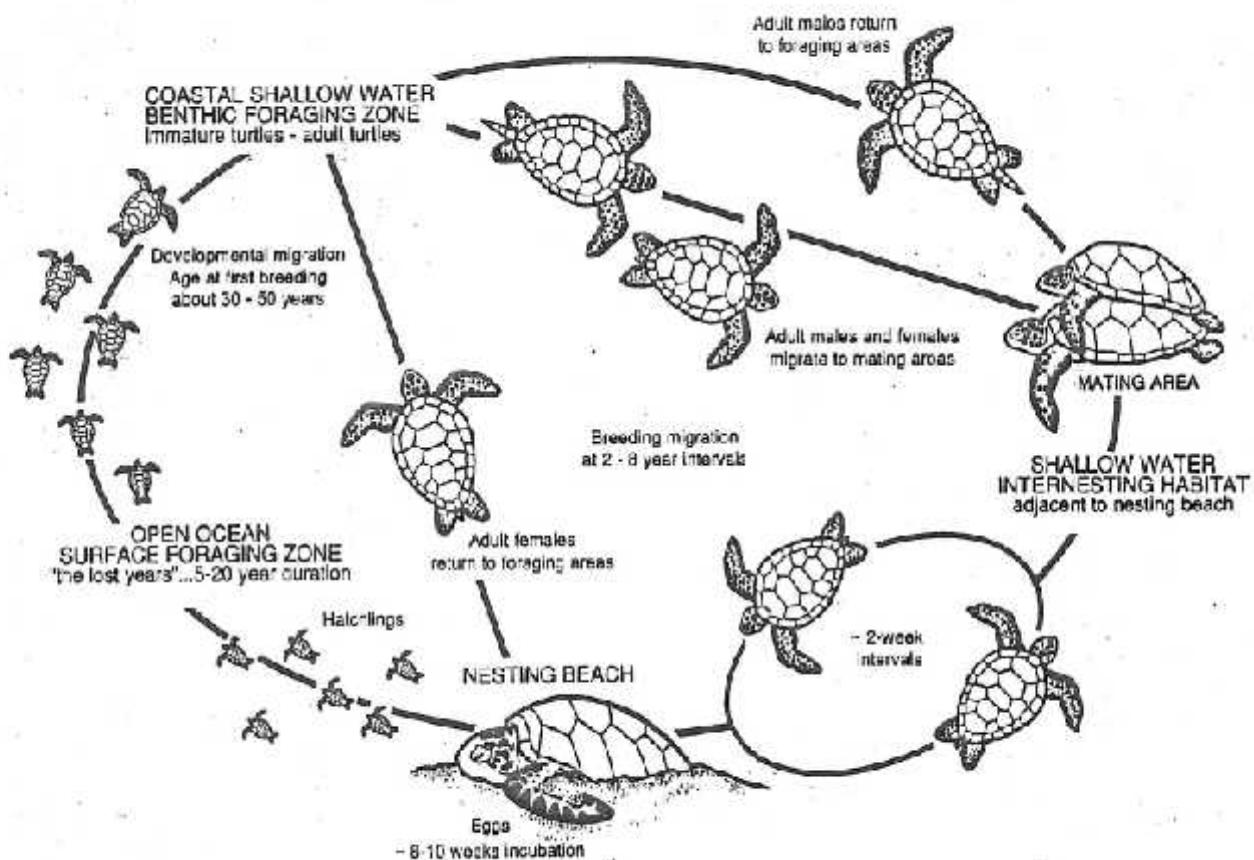
U *Dermochelyidae* jedino spada vrsta *Dermochelys coriacea* jer se fiziološki poprilično razlikuje od ostalih vrsta morskih kornja e.

Većina vrsta je široko rasprostranjena, osim *L. kempi*, koja je ograničena na područje Meksika i zaljeva te vrste *N. depressus*, endem australskog područja. Iako njihova hranidbena područja obuhvaćaju široka morska prostranstva, primarna hranidbena područja se nalaze unutar područja omeđenog izotermom od 20°C temperature površine mora te na relativno plitkom području kontinentalne pliche. Iznimka je vrsta *D. coriacea* koja obitava u hladnijim morima i na većim dubinama. Glavne lokacije za gnijezdenje vrsta *Dermochelys coriacea*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, *L. kempi* i *Natator depressus* su smještene na otočnim i kontinentalnim plažama između sjeverne i južne obala.

2.2. Spolni život morskih kornjača

Cijeli svoj život morske kornjače provedu u moru. Jedino ženke izlaze na kopno da bi položile jaja i odmah nakon toga se vratile u sigurno more. Život mužjaka, koji sav svoj život proveđe u moru ne izlaze i na kopno i danas je nepoznana. Gotovo sve što znamo o tim životinjama temelji se na istraživanjima ženki prilikom izlaska na kopno i polaganja jaja. Nakon parenja, koje se uvijek odvija u vodi, morske kornjače prelaze velike distante. Zanimljiv je primjer kako *Caretta caretta* nađe mjesto na kojem je prije desetak godina sama izašla iz jaja. Neki stručnjaci pretpostavljaju da osjetilo mirisa i dodira ima veze sa time. Male morske kornjače se kada se izlegnu, grizu pijesak kao da bi htjele zapamtiti ukus i miris, a isto to rade i odrasle ženke prije polaganja jaja.

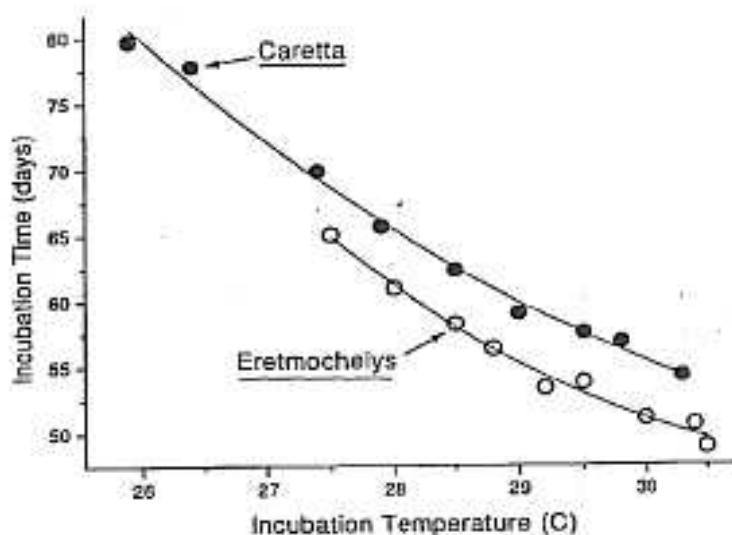
Sve vrste migriraju na barem malim udaljenostima, s hranidbenog prostora na području razmnožavanja, odakle se muške jedinke vraćaju na hranidbena područja, a ženske odlaze prema području gniažđenja (Slika 1.). Neke vrste prevale i više od 3000 km kako bi pronašle svoju plažu.



Slika 1. Životni ciklus morskih kornjača; trajanje pojedine faze ovisi o vrsti
(Preuzeto iz: Lutz i Musick, 1997)

Polaganje jaja se uvijek dešava no u, osim kod *Lepidochelys kempi* koja pretežno danju polaže svoja jaja. Kao što je ve spomenuto, polaganje jaja je jedini razlog zašto morske kornja e izlaze na kopno. Udaljenost od mora može biti i do 100 metara, gdje morske kornja e traže pogodno mjesto za polaganje svojih jaja i gdje iskopavaju ovalnu rupu. U nju polažu stotinjak jaja koja potom zatrpuju te se vrate u more. Ovisno o vrsti, vremenski period polaganja jaja može varirati od 15 minuta do više sati. Nakon polaganja jaja, kornja a zakopa rupu i briše tragove, tako da je gnijezdo teško prona i. Nakon uspješnog polaganja jaja, izmorene kornja e se vra aju u more i odlaze na hranidbena podru ja te se pripremaju za novo reprodukcijsko razdoblje. Jaja se razvijaju od 105 do 110 dana. Kada se izvale iz jaja, male morske kornja e se odmah upute prema sigurnom moru iz kojeg e se vratiti tek nakon 15-tak godina kao odrasle ženke radi polaganja jaja. Na tom putu su esto žrtve ptica, rakova i sli nih životinja. One koje dostignu do mora, izložene su opasnostima od ve ih riba. Pretpostavlja se da samo jedna od 1000 mladih dostigne spolnu zrelost.

Reprodukтивna sezona ženki je svake dvije do etiri godine dok se mužjaci mogu pariti svake ili svake druge sezone. Reproduktivne karakteristike variraju od vrste do vrste (Tablica 1.). Sve vrste morskih kornja a prave nekoliko gnijezda s jajima za vrijeme sezone gnijež enja. Uspješan razvoj embrija ovisi o nekoliko okolišnih faktora, a me u njima su temperatura, vlažnost, salinitet i koli ina respiratornih plinova u okolišu na kojem se jaja inkubiraju (Lutz i Musick, 1997). Ako je temperatura inkubacije niska inkubacijsko vrijeme se produljuje, dok se pri povišenim temperaturama skra uje inkubacijski period (Slika 2.).



Slika 2. Utjecaj inkubacijske temperature na inkubacijsko vrijeme
(Preuzeto iz: Lutz i Musick, 1997)

Tablica 1. Reproduktivne karakteristike ženki morskih kornjača
(Preuzeto iz: Lutz i Musick, 1997)

Vrsta	Period grijezanja	Broj grijezda po sezoni	Intervali grijezanja (dani)	Remigracijski interval (godine)	Broj jaja u grijezdu
<i>Dermochelys coriacea</i>	No	6.17 (0.47) 4	9.5, 9-10	2.28 (0.14) 5	81.5 (3.6) 12
<i>Chelonia mydas</i>	No	2.93 (0.28) 9	12, 10-17	2.86 (0.23) 9	112.8 (3.7) 24
<i>Natator depressus</i>	No i dan	2.84 (---) 1	16, 2-23	2.65 (---) 1	52.8 (0.9) 6
<i>Lepidochelys kempi</i>	Dan	1.80 (---) 1	20-28	1.50 (---) 1	110.0 (---) 1
<i>Lepidochelys olivacea</i>	No	2.21 (0.79) 2	17, 22, 30, 45	1.70 (0.30) 2	109.9 (1.8) 11
<i>Eretmochelys imbricata</i>	No i dan	2.74 (0.22) 5	14.5, 11-28	2.90 (0.11) 5	130.0 (6.8) 17
<i>Caretta caretta</i>	No	3.49 (0.20) 4	14, 13-17	2.59 (0.15) 5	112.4 (2.2) 19

* Intervali između arribada

Napomena: Brojane vrijednosti su izražene: srednja vrijednost za ispitane jedinke, u zagradama su standardne devijacije te na kraju broj uključenih jedinki.

2.3. Mehanizmi determinacije spolova

Spolna diferencijacija je usklađena kaskada hormonskih i genetičkih zbiljanja tijekom kojih se indiferentne gonade razvijaju u testise ili ovarije s odgovarajućim urogenitalnim i sekundarnim spolnim karakteristikama. Spolna determinacija je konačan ishod spolne diferencijacije (Lance, 1997).

Danas nam je poznato da oboje, i okolišni unutarnji mehanizmi određivanja spola mogu djelovati u različitim vrstama. Determinacija spola može biti pod genetskom ili okolišnom kontrolom pa razlikujemo kromosomske i okolišne uvjetovane determinacije spola (Gilbert, 2003). Zanimljivo je kod mehanizma determinacije spola da ako imamo jedan tip determinacije to ne znači da on je isključivo drugi tip. Kod nekih organizama kao što su daždevnjaci koji imaju heteromorfne kromosome XY ako razvoj gonada teče na 20°C onda se odvija genetska determinacija spolova i odnos spolova potomaka je 1:1, međutim ako je bilo kojeg razloga do embrionalnog razvoja dolazi na višim temperaturama od 30°C, uključujući se temperaturna determinacija spolova i u tom slučaju omjer spolova nije više 1:1.

2.3.1. Kromosomska determinacija spola

Postoji mnogo na ina na koji kromosomi mogu odrediti spol u embrija. U sisavaca prisutnost X ili Y kromosoma na drugom mjestu odre uje koji e embriji biti ženski (XX homogametan), a koji muški (XY heterogametan). Y kromosom sadrži gen koji dešifrica testis-determiniraju i faktor. Taj faktor usmjerava razvoj gonada u sjemenike, a ne jajnike. Y kromosom je odlu uju i imbenik za odre ivanje spola u sisavaca. U ptica, situacija je obrnuta: mužjaci imaju dva istovrsna spolna kromosoma (ZZ), dok ženke imaju razli it par (ZW). U kukaca leta a Y kromosom nije zna ajan za odre ivanje spola, ali omjer X kromosoma prema autosomima odre uje spolni fenotip. U drugih kukaca (naro ito u *Hymenoptera*, kao što su p ele, ose i mravi), oplo ena, diploidna jaja razvijaju se u ženke, dok neoplo ena, haploidna jaja postaju mužjaci (Gilbert, 2003).

2.3.2. Okolišno uvjetovana determinacija spola (temperaturna determinacija)

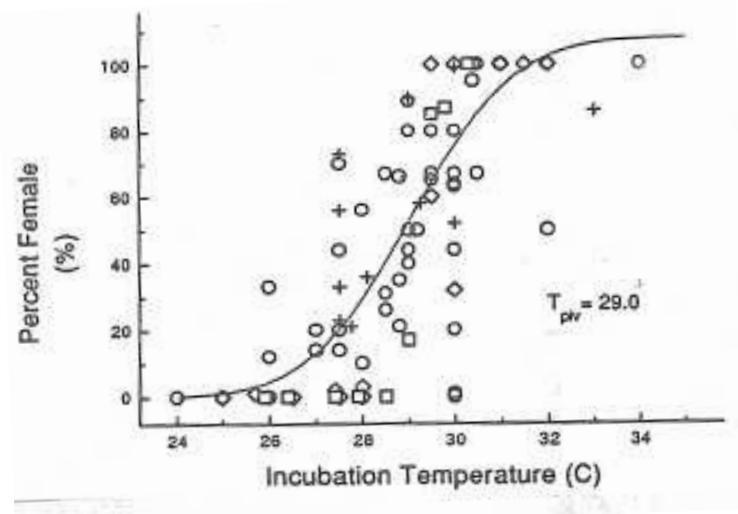
Kod kralježnjaka osim XY i ZW kromosomske determinacije postoji i tre i mehanizam koji je ustanovljen kod nekih vrsta gmazova bez spolnih kromosoma. Kod njih je temperatura najvažniji faktor koji odre uje spol (Malnado i sur., 2002). Molekularni mehanizmi temperaturne determinacije spola (temperature-dependent sex determination TSD, tako er i environmental sex determination ESD) do danas još nisu poznati, ali se zna nešto o genima i faktorima koji utje u na ovaj mehanizam. Kod kromosomske determinacije spola omjer spolova je naj eš e 1:1 što nije slu aj kod temperaturne determinacije spola.

Dok je spol ve ine zmija i ve ine guštera odre en spolnim kromosomima za vrijeme oplodnje, spol ve ine kornja a i svih vrsta krokodila odre en je okolišem. U ovih gmazova temperatura jaja, za vrijeme odre enog razdoblja razvitka, predstavlja odlu uju i imbenik u odre enju spola. Samo male promjene u temperaturi mogu uzrokovati dramati ne promjene u omjeru spolova (Gilbert, 2003). Temperatura pri kojoj je omjer spolova jednak 1:1 zove se pivotalna temperatura (T_{piv}) i ona se razlikuje od vrste do vrste (Tablica 2.). Me utim, postoje neke vrste koje imaju dvije pivotalne temperature, gornju i donju. Temperatura pri kojoj je produkcija ženskog spola dominantna zove se temperatura feminizacije (engl. female producing temperature FPT) dok je maskuliniziraju a temperatura ona pri kojoj je isklju ivo produkcija muškog spola (male producing temperature MPT). Raspon izme u temperatura koje e uvjetovati maskulinizaciju odnosno feminizaciju populacije naziva se tranzicijski raspon temperature. Kod mnogih krokodila i guštera na nižim se temperaturama ra aju ženke, a na višim mužjaci. Za kornja e je situacija obrnuta (Crews i sur., 1995).

Kod morskih kornjača se pri višim temperaturama u većini legu ženke, dok je pri nižim veći udio muških potomaka. Termosenzibilni period za determinaciju je druga trećina inkubacije. Pivotalne temperature su oko 28°C do 30°C (Tablica 2.) i (Slika 3.).

Tablica 2. Pivotalne temperature (°C) kod nekih vrsta morskih kornjača
(Preuzeto iz: Lutz i Musick, 1997)

Vrsta	Pivotalna temperatura
<i>Chelonia mydas</i>	28.26
<i>Caretta caretta</i>	28.74
<i>Lepidochelys olivacea</i>	29.13
<i>Eretmochelys imbricata</i>	29.32



Slika 3. Utjecaj temperature inkubacije na udio dobivenih ženki. Različite oznake na grafikonu odnose se na različite vrste morskih kornjača. (Krugovi-*C. caretta*, rombovi-*L. olivacea*, plus-*C. mydas*, kvadrati-*E. imbricata*).

(Preuzeto iz: Lutz i Musick, 1997)

2.4. Geni uključeni u determinaciju spola

Kod placentalnih sisavaca spol je određen genom na Y kromosomu koji uzrokuje formiranje testisa. Ovaj gen se zove *Sry* gen i za njega se pokazalo da je smješten na kraju kraku Y kromosoma kod većine placentalnih sisavaca, uključujući i tobolare, ali nije utvrđen kod sisavaca koji legu jaja. U odsustvu *Sry* gena dolazi do razvoja ovarija. Pokušaji da se pronađe *Sry* gen kod monotremata rezultirali su pronalaskom velike obitelji gena tzv. *Sox* geni (*Sry* - related HMG box containing genes) koji kodiraju za proteine s DNA veznom domenom. Postoji više od 20 *Sox* gena koji se eksprimiraju u različitim tkivima za vrijeme razvoja (Lance, 1997).

Smatra se da je *Sry* gen u sisavaca evoluirao iz *Sox3* gena koji je prisutan na X kromosomu tobolara i primitivnom Y kromosomu. Uloga *Sox3* gena u determinaciji spola je još uvek nepoznata. Kromosomalna determinacija spola evolucijski je nastala genskom duplikacijom *Sox3* gena smještenog na X kromosomu prilikom čega je nastao *Sry* gen i to nakon odvajanja monotremata od tobolara i viših sisavaca. Zbog toga, monotremata, za razliku od tobolara i viših sisavaca imaju ZW determinaciju spola. Tobolari i viši sisavci imaju XY mehanizam determinacije spola i Y kromosom je taj koji nosi *Sry* gen koji kodira za SRY protein koji utječe na daljnju diferencijaciju gonada u testise.

O drugom lanu obitelji *Sox* gena, *Sox9* genu, se zna mnogo više pa i to da je uključen u determinaciju spola. Njegova prisutnost je dokazana u tkivu muških gonada i kod morskih kornjača pa se smatra da je uloga *Sox9* gena u determinaciji testisa evolucijski konzervirana (Lance, 1997).

Za mnoge gene koji su uključeni u kromosomalnu determinaciju spola potvrđena je prisutnost i kod vrsta s temperaturnom determinacijom spola. Tako je *Sox9* koji se eksprimira u testisima miševa pronađen eksprimiran u embrionalnim testisima gmažova. Tako je, zajedno sa genima za sisavce i gmažove tj. genima za koje se smatra da sudjeluju i u kromosomalnoj i u temperaturnoj determinaciji spola su još i SF-1, MIH i moguće *Dax-1* (Lance, 1997).

2.5. Ekspresija *Sox9* gena u gonadama *Lepidochelys olivacea*

Sox9 je autosomalni gen važan za diferencijaciju Sertolijevih stanica. Srođan je Sry genu i visoko je konzerviran tijekom evolucije kralježnjaka. Proizvodi njegove ekspresije su detektirani u nediferenciranim gonadama. Na početku diferencijacije gonada, *Sox9* je prisutan u testisima dok u jajnicima nije (Moreno-Mendoza i sur., 1999).

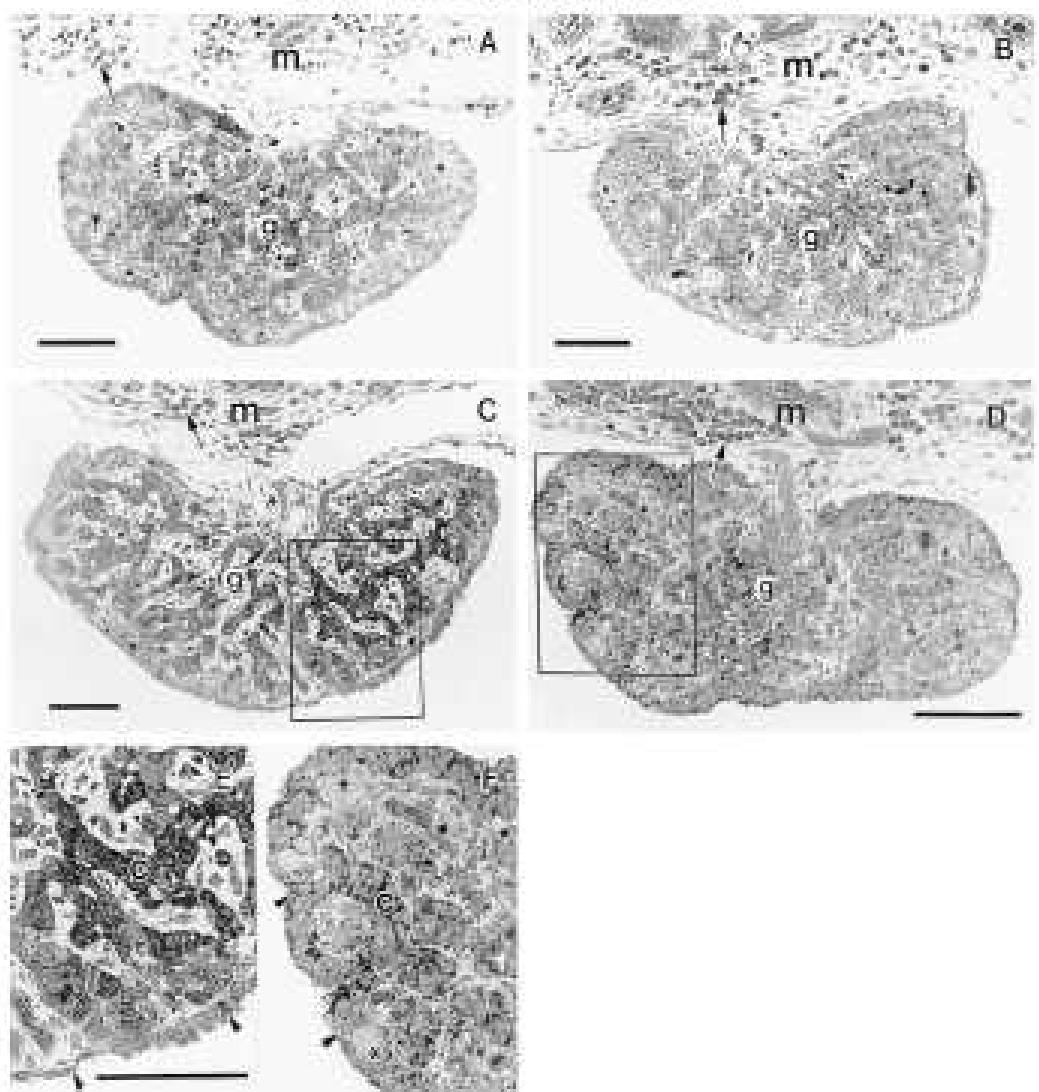
Lepidochelys olivacea je jako osjetljiva vrsta i njeni najveći gnjezdila nalaze se u Indiji, Mexiku i Kostarici tj. u Tihom i Indijskom oceanu. Za nju je karakteristična pojava zvana arribada tj. gniježđenje danju u velikim skupinama. 1947. godine zabilježeno je 40000 ženki koje su se na plaži gnijezdile u jednom danu. 1999. godine proučavana je ekspresija *Sox9* gena kod te kornjače koristeći antitijela za detekciju ekspresije. Temperatura pri kojoj se razvija i udio mužjaka je 27°C (male promoting temperature MPT), dok je veći udio ženki pri 32°C (female promoting temperature FPT). Temperaturno senzitivan period (engl. temperature sensitive period TSP) je kratko razdoblje tijekom kojeg se razvoj nediferenciranih gonada usmjerava u jednom od dva moguća pravca i to ili prema formiranju testisa ili prema formiranju ovarija. TSP je od 21.-26.-toga dana, iako na MPT, spol je determiniran 24.-toga dana, dok se kod FPT spol determinira nešto kasnije tj. 26.-toga dana.

Sakupljena su jaja sa četiri legla *L. olivacea* na plaži La Escobilla u Mexiku te su podijeljena u dvije skupine koje su inkubirane na dvjema različitim temperaturama. Prva skupina je inkubirana na $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (MPT), a druga na $32 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (FPT).

Imunohistokemijskom analizom ustanovaljeno je da sve do 24.-toga stadija (24 dana embrionalnog razvoja), histologija gonada embrija inkubiranih na MPT i FPT se ne razlikuju. Medularni traci se uočavaju i na površini je formiran epitel sastavljen od kubičnih ili cilindričnih stanica (Slika 4. A i B).

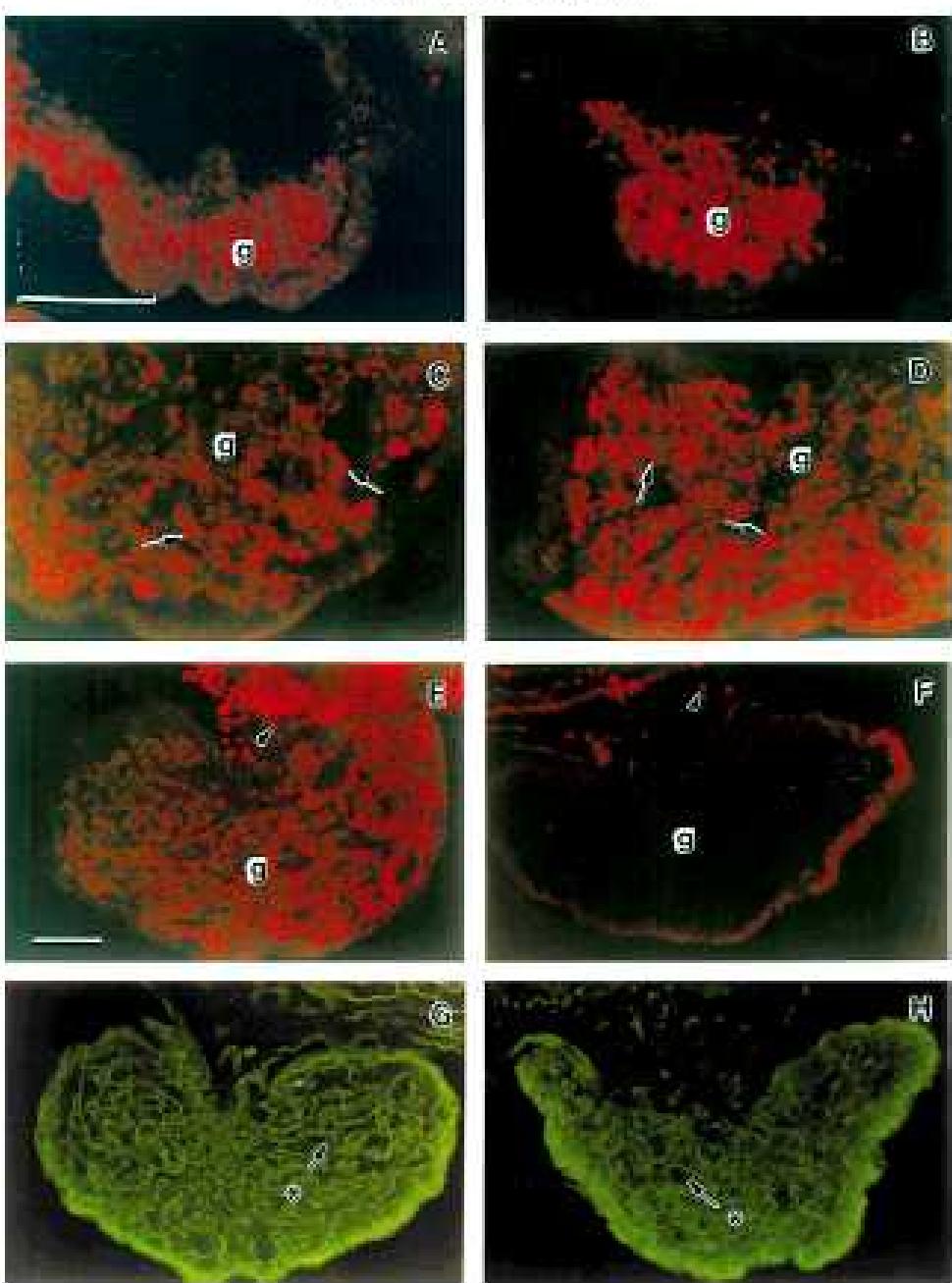
26.-toga i 27.-og dana uočavaju se histološke razlike. Gonade embrija inkubiranog na MPT pokazuju izražene medularne traci, okružene stanicama strome. Na površini je formiran jednoslojni kubični epitel (Slika 4. C i E). Na FPT, površinski epitel postaje cilindričan i višeslojan, a medularni traci se fragmentiraju (Slika 4. D i F).

EXPRESSION OF SOX9 IN SEA TURTLE



Slika 4. Urogenitalni nabori kod *L. olivacea* inkubirani na MPT (A, C, E) i FPT (B, D, F).
(Preuzeto iz N.Moreno-Mendoza i sur., 1999.)

Imunohistokemijsko bojanje SOX9 proteina je bilo pozitivno u medularnim tra cima na MPT i FPT u periodu od 21.-tog do 24.-tog dana. Epitel i stroma nisu obojani (Slika 5. A-D). Na slici sa velikim pove anjem se uo ava prisutnost obojanog SOX9 proteina u jezgrama stanica medularnih tra aka. 25.-tog dana se uo avaju prve razlike. Pri MPT, medularni tra ci ostaju SOX9 pozitivni, ali na FPT nije detektirana prisutnost SOX9 proteina u medularnim tra cima. Naposljetku, od 26.-tog dana pa na dalje na MPT se konstantno uo ava prisutnost SOX9 u medularnim tra cima (Slika 5. E), dok za gonade na FPT nema prisutnosti istog proteina (Slika 5. F).



Slika 5. Urogenitalni nabori embrija *L. olivacea* inkubiranih na MPT (A, C, E i G) te na FPT (B, D, F i H).

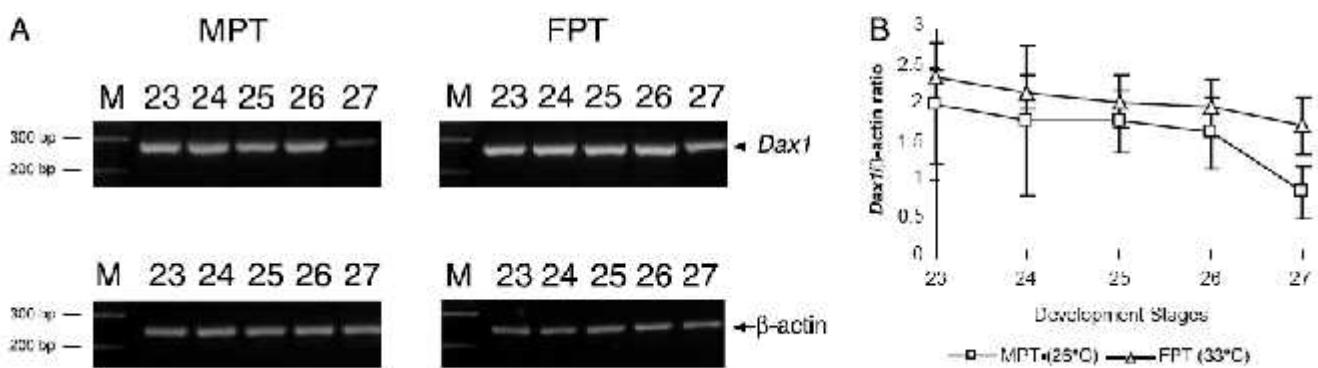
(Preuzeto iz: Moreno-Mendoza i sur., 1999.)

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se spol kod *L. olivacea* nepovratno determinira 24.-tog ili 26.-tog dana na MPT ili FPT te da postoji korelacija između *Sox9* ekspresije i determinacije spola u maslinaste želvi. Na MPT, ekspresija *Sox9* gena u Sertolijevim stanicama 24.-tog dana determinira diferencijaciju gonada u testise, dok na FPT *Sox9* gen je 26.-tog dana utisan i diferencijacija ide prema formiranju ženskih gonada, ovarijskih.

2.6. Ekspresija *Dax1*, *Dmrt1* i *Sox9* gena za vrijeme temperaturne determinacije spola kod *L. olivacea*

Kod sisavaca determinacija spola ovisi o *Sry* genu. U ptica i gmazova nije pronađen homolog toga gena, ali su ustanovljeni homolozi nekih drugih gena uključujući u biokemijske putove determinacije spola. *Sox9*, *Dax1* i *Dmrt1* se eksprimiraju na početku razvoja gonada kod ptica i gmazova. *Dax1* kodira za netipični hormonski receptor na jezgrinoj membrani, a istraživanja su pokazala da je potreban za razvoj ovarija, ali ne i testisa kod ptica i sisavaca. *Dmrt1* kodira za transkripcijski faktor sa DM domenom (vrsta DNA vezujuće domene karakteristične za proteine uključujuće u biokemijske putove determinacije spola). Njegova ekspresija ovisi o spolu i obično je eksprimiran na MPT nego na FPT tijekom termosenzitivnog razdoblja. Kod *L. olivacea*, vrsti sa temperaturnom determinacijom spola, gen *Sox9* je eksprimiran u nediferenciranim gonadama na MPT kao i na FPT. Pri MPT taj gen je eksprimiran i u testisima, ali na FPT se utišava pri onim temperaturama kada započinje diferencijacija u ženske gonade.

mRNA ekspresijski profil *Dax1* i *Dmrt1* u gonadama *L. olivacea* za vrijeme i nakon termosenzibilnog perioda usporeden je sa ekspresijskim profilom *Sox9* na temelju rezultata dobivenih RT-PCR-om. Za određivanje ekspresijskog profila ovih gena tijekom temperaturne determinacije spola kod *L. olivacea* jaja su inkubirana na 26°C (MPT) ili na 33°C (FPT). Urogenitalne strukture embrija su uzorkovane u periodu od 23.-28.-oga dana razvoja. Uzorkovali su se etiri gonade sa 23.-toga, dvije sa 24.-toga i po jedna gonada u periodu od 25.-32.-og dana i za svaki stadij je napravljeno pet replika.

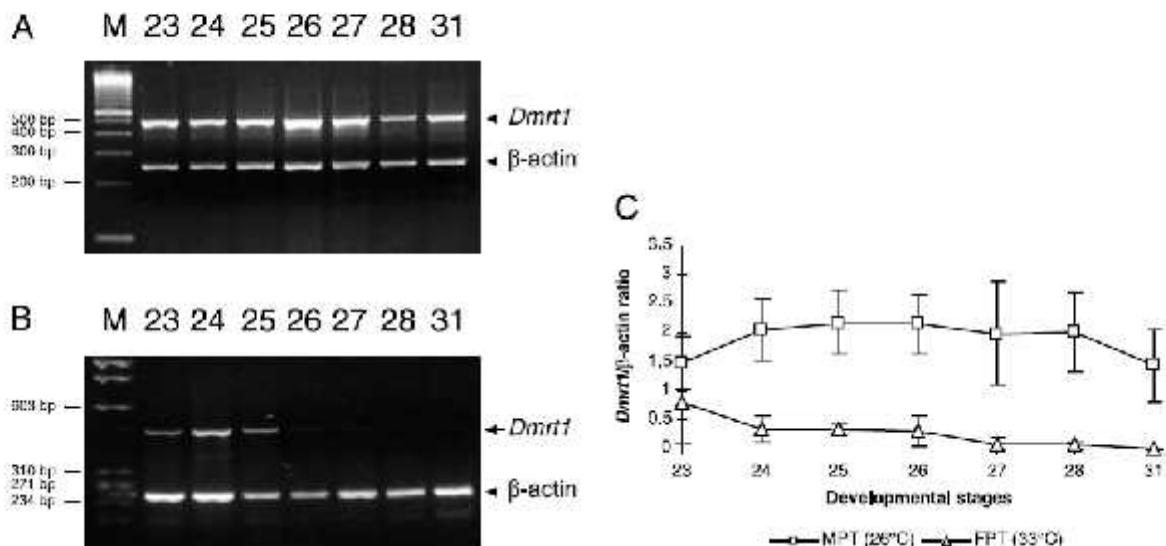


Slika 6. Ekspresija *Dax1* mRNA

(Preuzeto iz: Torres i sur., 2002).

Na slici 6. prikazana je ekspresija *Dax1* gena u gonadama embrija na MPT (26°C) i FPT (33°C). -aktinski fragment od 252 pb je korišten kao pozitivna kontrola koja je uvijek prisutna. Fragment *Dax1* je od 271 pb je detektiran u svim uzorcima, ali se ja ina njegove ekspresije razlikuje. Dok je u stadijima od 23.-26.-toga dana intenzitet sličan na MPT i FPT, 27.-mog dana pokazuje smanjeni intenzitet u gonadama embrija inkubiranih na MPT (Slika 6. A i B).

Dmrt1 je detektiran kao fragment od 473 bp u gonadama svih embrionalnih stadija na MPT. Ekspresija je najizraženija 26. i 27.-mog dana, a na nižim i višim temperaturama pokazuje podjednaki intenzitet ekspresije (Slika 7. A). U gonadama na FPT *Dmrt1* je detektiran samo u periodu od 23.-25.-toga dana (Slika 7. B).



Slika 7. Ekspresija *Dmrt1* mRNA

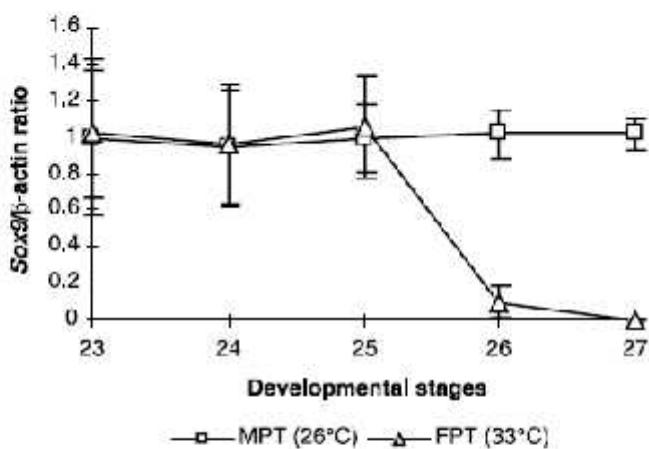
(Preuzeto iz: Torres i sur., 2002)

Ekspresija *Sox9* ukazuje na sličan intenzitet ekspresije za period od 23.-25.-toga stadija kod obje temperature. Od 26.-og stadija na dalje ekspresija *Sox9* gena naglo opada za FPT (Slika 8).

Promatrana je ekspresija *Dmrt1*, *Dax1* i *Sox9* gena na MPT (26°C) i na FPT (33°C) za vrijeme i nakon termo senzibilnog perioda determinacije spola kod *L. olivacea*. *Dax1* pokazuje istu razinu ekspresije kod MPT i FPT za vrijeme termo senzibilnog perioda, dok njegova ekspresija značajno raste na FPT, ali tek nakon termo senzibilnog perioda odnosno kad je već moguće ustanoviti morfološke razlike između gonada koje se usmjeravaju u razvoj testisa ili ovarija. To ukazuje da gen *Dax1* nije uključen u biokemijski put temperaturne

determinacije spola kod *L. olivacea*. Smatra se da je uloga *Dax1* za vrijeme razvoja gonada različita kod različitih skupina kralježnjaka.

Ekspresija *Dmrt1* pokazuje znajujuću ekspresiju pri MPT u svim stadijima nego pri FPT, za razliku od *Sox9* gena koji pokazuje sličnu ekspresiju u razdoblju od 23.-25.-tog dana inkubacije, ali nakon termosenzibilnog perioda ekspresijski profil *Dmrt1* i *Sox9* gena je izrazito sličan pri obim temperaturama. To ukazuje na moguću ulogu ovog gena u temperaturnoj determinaciji spola (Torres i sur., 2002).



Slika 8. Ekspresijski profil *Sox9* gena na MPT i FPT

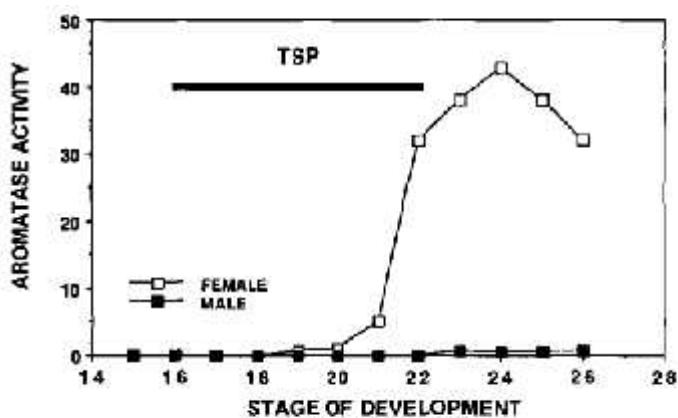
(Preuzeto iz : Torres i sur., 2002)

2.7. Uloga estrogena kod kornjača u spolnoj determinaciji

Molekularni mehanizmi temperaturne determinacije spola još su uvijek velika enigma, međutim sa sigurnošću se zna da u gmazova sa TSD-om estrogen ima znajuću ulogu u spolnoj determinaciji. Sinteza estrogena u nediferenciranim gonadama inhibira razvoj testisa, a stimulira razvoj jajnika neovisno o tome dali su jaja inkubirana na MPT ili na FPT. U odsustvu estrogena dolazi do razvoja mužjaka. Kod kornjača efektivno djelovanje estrogena je utvrđeno u periodu diferencijacije gonada. Ako je temperatura inkubacije 1-2°C oko pivotalne temperature, ali je bliže temperaturama koje rezultirati većim udjelom mužjaka, manje je estrogena potrebno za indukciju ženki nego ako na ekstremnijim temperaturama. Ovo ukazuje na sinergističko i ekvivalentno fiziološko djelovanje temperature i hormona estrogena (Lance, 1997). Ubrizgavanjem u jaja tvari koje inhibiraju sintezu estrogena, iz njih će se izlagati muški potomci, ak i kad su jaja inkubirana na temperaturi pri kojoj se obično izlegu ženke (Gilbert, 2003). Djelovanje dihidrotestosterona na pivotalnoj temperaturi rezultira u anjemu mužjaka. Na temperaturama kada je 100%-tno izvaljivanje ženki

dihidrotestosteron nema nikakvog efekta (Lance, 1997). Razdoblje osjetljivosti na utjecaj estrogena i njegovih inhibitora podudara se s razdobljem kad se odre ivanje spola obično događa (Gilbert, 2003).

Uvijek se da je enzim aromataza, koji pretvara testosteron u estrogen, ključan u temperaturno ovisnom odre ivanju spola. Inhibitori sinteze estrogena, blokiraju enzim aromatazu, pokazuju i da eksperimentalno izazvana niska razina aromataze dovodi do razvoja samo muških potomaka. Na temperaturi kada se obično razvijaju ženke, aktivnost aromataze se povećava za vrijeme kritičnog razdoblja odre ivanja spola (Slika 9.).



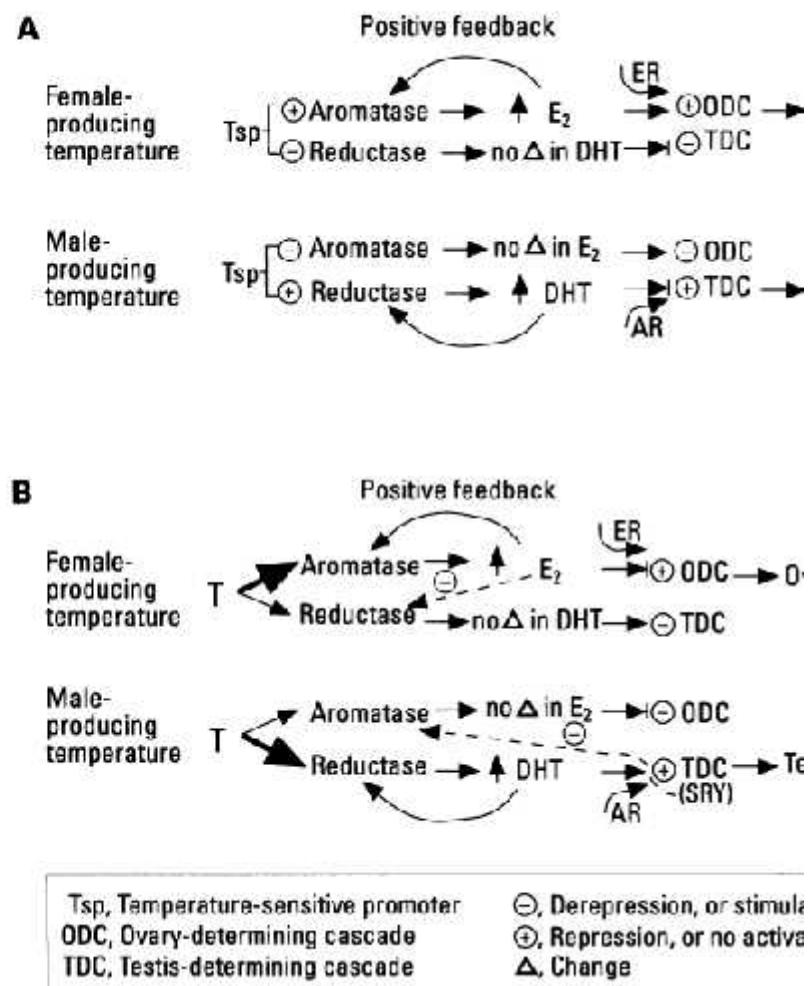
Slika 9. Aktivnost aromataze u gonadama mužjaka i ženki za vrijeme temperaturno senzitivnog perioda

(Preuzeto iz: Lance, 1997).

Aromataza se proizvodi na dva mesta u embriju: u gonadama i mozgu. Međutim, razina gonadalne aromataze uvijek je jednaka u oba spola. Aktivnost aromataze proizvedene u mozgu je u uzajamnoj ovisnosti s temperaturom i ženskim spolom. Kad su embriji *Lepidochelys* bili izloženi temperaturi koja proizvodi ženke, ona je znatno viša aktivnost aromataze, nego u mozgovima jedinki inkubiranih na nižoj temperaturi, koja obično daje mužjake. Ovo povećanje proizvodnje estrogena u mozgu može izazvati neuroendokrine promjene, koje rezultiraju formiranjem gonadalnih steroida i stvaranjem jajnika (Gilbert, 2003).

Kao što je već prethodno rečeno, tavan molekularni mehanizam temperaturne determinacije spola još se uvijek ne zna, ali postoje određene pretpostavke kako bi se determinacija trebala odvijati. Geni koji su ključni za odre ivanje spola su smješteni na autosomima i aktiviraju se temperaturom te nakon aktivacije gena dolazi do njihove ekspresije i sinteze proteina koji utječu na diferencijaciju gonada bilo u ovare ili testis. Ključna je temperatura u drugoj trećini inkubacijskog perioda koja pokreće niz kaskadnih

reakcija na molekularnoj i stani noj razini koje u kona nici rezultiraju stvaranjem muškog ili ženskog spola. Geni koji se aktiviraju u ovom sluaju kodiraju za hormonske receptore. MPT aktivira gene koji kodiraju za androgene, a FPT za estrogene receptore (Slika 10).



Slika 10. Dva predložena molekularna modela temperaturne determinacije spola kod kornja a (Preuzeto iz: Crews i sur., 1995).

2.8. Utjecaj poliklornih bifenilnih spojeva na TSD kod kornja a

Istraživanja su pokazala da poliklorni bifenilni spojevi (PCB), skupina široko rasprostranjenih zagaiva, mogu djelovati slično estrogenu. Iznimno niske koncentracije PCB mogu promijeniti spol kornja a povišenjem temperature na muški spol.

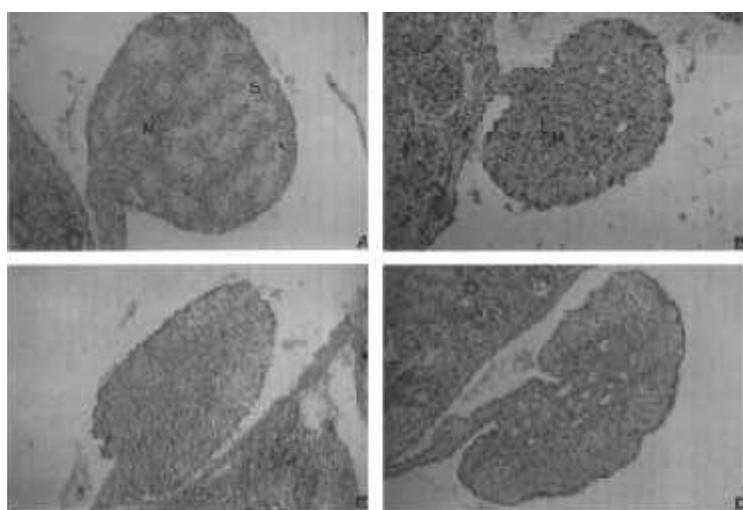
Eksperimentom je ispitano djelovanje jedanaest različitih PCB-a na jajima inkubiranim na 27.8°C odnosno na temperaturi pri kojoj se legu mužjaci. Svaki spoj dodan je u visokoj i niskoj koncentraciji. Rezultati su pokazali da 2',4',6'-trikloro-4-bifenil i 2',3',4',5'-tetrakloro-4-bifenil imaju estrogenski efekt jer su uzrokovali pojavu ženki na MPT. 2',4',6'-

trikloro-4-bifenil je uzrokovao 100%-tnu pojavu ovarija dodan pri koncentraciji od 100 µg (Tablica 3 i Slika 11.). PCB mogu dugo perzistirati u vodenom okolišu i utjecati na živi svijet preko hranidbenog lanca ili direktno (Crews i sur., 1995).

Tablica 3. Utjecaj nekih PCB spojeva na determinaciju spola
(Preuzeto iz: Crews i sur., 1995)

Compound	Hatchlings with female gonads, % [low dose/high dose]	Hatchlings with oviducts, % [low dose/high dose]
A 2,3'-Dichloro-3-biphenylol	0/0	0/14
B 2,2',4-Trichlorodiphenyl ether	7/0	21/0
C 2,2',3'-Trichloro-4-biphenylol	0/0	7/0
D 2,3,4'-Trichlorobiphenyl	7/0	0/0
E 2,3',5-Trichlorobiphenyl	0/6	7/3
F 2',4',6-Trichloro-4-biphenylol	0/100	0/100
G 2',3',4',5'-Tetrachloro-4-biphenylol	4/50	8/71
H 2,4,4',5-Tetrachlorodiphenyl ether	0/0	0/0
J 2,4,4',6-Tetrachlorobiphenyl	7/0	0/7
K 2,4,4',6-Tetrachloro-p-terphenyl	0/0	0/7
I 2',3',4',5,5'-Pentachloro-2-biphenylol	0/0	0/0
Ethanol control	0	0
F ₂ control	100	100

Ove spoznaje mogu imati veliku važnost u o uvanja okoliša i zaštiti ugroženih vrsta, kao što su kornjače i vodozemci, u kojih hormoni mogu utjecati na promjene u primarnom razvijanju spola. Neki zagovornici zaštite gmazova koriste hormonske tretmane da povećaju postotak ženki u ugroženih vrsta (Crews i sur., 1995).



Slika 11. Prerez gonada embrija inkubiranih na MPT. (A) Testisi (kontrola); (B) djelovanje estogena i formiranje ovarija (hormonska kontrola); (C) djelovanje PCB i formiranje ovarija (200 µg 2',4',6'-trikloro-4-bifenil); (D) djelovanje PCB i formiranje ovarija (100 µg 2',4',6'-Trikloro-4-bifhenil i 2',3',4',5'-tetrakloro-4-bifenil)

(Preuzeto iz: Crews i sur., 1995)

2.9. Globalno zatopljenje i temperaturna determinacija spola

Klimatske promjene se oduvijek dešavaju, ali u novije vrijeme problem tih promjena je njihova brzina koju organizmi ne uspijevaju slijediti. Globalno zatopljenje predstavlja problem za vrste koje imaju temperaturnu determinaciju spola jer postoji mogunost poremećaja omjera spolova koji je potreban za normalan nastavak vrste. Odnos spolova sa TSD-om nije 1:1, ali otklon u omjeru spolova mora biti optimalan za održanje vrste. Promjena temperature uzrokuje promjenu prirodnog odnosa spolova kod gmazova. Povećanje temperature za 1°C inkubacija se smanjuje za pet dana i dobije se veći udio ženki. Glavno pitanje je da li će to u konačnici uzrokovati pre malo mužjaka koji će biti ženkama na raspolaganju.

Plaže s tamnim pijeskom jačaju apsorbiranje sunčeve svijetlosti pa je na tim plažama veći udio ženki, dok odnos spolova na svjetlijim plažama nije toliko otklonjen prema ženkama. Odnos između temperature zraka i pijeska je izuzetno koreliran. U zadnjih sto godina temperatura pijeska u gnjezdilištima je porasla za 0.5°C. Za organizme s temperaturnom determinacijom spola to je znatan i promjena u samo 0.5°C može drastično promijeniti omjer spolova.

Morske kornjače su migratori organizmi pa je moguće da će u budućnosti kolonizirati nova područja na kojima trebaju postojati osnovni uvjeti za formiranje gnjezdila. Druga stvar koja bi se mogla desiti je pomak reproduktivne sezone, ali to predstavlja problem za morske kornjače koje gnijezde tijekom cijele sezone. To su dva načina na kojima bi morske kornjače mogle riješiti negativan utjecaj globalnog zatopljenja, ali pitanje je da li će se moći prilagoditi brzini tih klimatskih promjena.

3. Zaključak

Spol je osobina jedinke koja je u većini slučajeva uvjetovana prisutnošću ili odsustvom određenog spolnog kromosoma i gena koji se na njemu nalaze. Međutim, postoje organizmi kod kojih okolišni faktori utječu na konačan ishod spolne diferencijacije tj. da li će razvoj gonada krenuti prema stvaranju testisa (muških spolnih žlijezda) ili možda prema razvoju ovarija (ženskih spolnih žlijezda). Morske kornjače su rijetka skupina životinja kod kojih okolišni imbenik utječe na put diferencijacije gonada. Taj odlučujući imbenik je temperatura inkubacije njihovih jaja za vrijeme termosenzibilnog perioda tijekom kojeg pri višim temperaturama dolazi do formiranja ovarija, a pri nižim testisa. Postoji samo uzak raspon temperature pri kojem je moguće dobiti jednak udio ženki i mužjaka.

Molekularni mehanizmi temperaturne determinacije spola još su uvek velika nepoznanica za znanost, ali se poprilično dobro zna o faktorima i genima koji su uključeni u taj mehanizam. *Sox9*, *Dmrt1* su geni čiji je ekspresija dokazana u testisima a vrijeme embrionalnog razvoja kod vrsta s temperaturnom determinacijom spola. Ustanovljeno je da estrogeno djelovanje pojedinih spojevi koji su prisutni u svakodnevnoj ovisnosti uporabi uzrokuju spolni disbalans kod ovih životinja.

Temperaturna determinacija spola ima prednosti i mane. Jedna prednost u smislu spolnog razmnožavanja je da daje prednost jednom spolu jer omjer spolova nije 1:1. Najveća manja je da temperaturna determinacija ograničava uvijete u kojima vrsta može normalno živjeti i razmnožavati se.

Sudbina ovakvih organizama s temperaturnom determinacijom spola postaje upitna s obzirom na globalno zatopljenje i povećanje opće temperature na Zemlji. Kako će se prilagoditi novim uvjetima i da li će dobiti utrku sa globalnim promjenama koje se trenutno odvijaju neizmjerno velikom brzinom?

4. Sažetak

Na odreivanje spola djeluju i genetički i okolišni faktori. Kod mnogih gmazova, tip gonada je determiniran inkubacijskom temperaturom jaja i taj je proces poznat kao temperaturna determinacija spola (TSD). Gmazovi sa TSD pokazuju razlike u odnose između temperature i omjera spolova. Niže temperature produciraju ženke, a više mužjake kod mnogih guštera i krokodila, dok je kod većine kornjača situacija obrnuta. Estrogen ima važnu ulogu u spolnoj determinaciji kod gmazova sa TSD. Neki geni uključeni u determinaciju spola kod sisavaca su ustanovljeni i u gonadama drugih kralježnjaka. *Sox9*, *Dax1* i *Dmrt1* su eksprimirani na početku razvoja gonada kod ptica i gmazova. Danas još uvijek ne znamo točno kako temperatura djeluje na spol embrija, ali se zna da važnu ulogu u tome ima estrogen. Neki toksični spojevi kao što su poliklorirani bifenili (PCBs) mogu imati djelovanje slično estrogenu i uzrokovati reproduktivne anomalije. Ovo je očito dokaz da utjecaj ovjeka može biti štetan za okoliš i organizme u njemu.

Summary

Sex determination is controlled either by genetic or environmental factors. In many reptiles, gonadal sex is determined by the incubation temperature of the egg, a process known as temperature-dependent sex determination (TSD). Reptiles with TSD exhibit various relationships between temperature and sex ratio. Low temperatures produce females and high temperatures produce males in many lizards and crocodilians, whereas this pattern is reversed in most turtles. Estrogen plays a significant role in sex determination in reptiles with TSD. Some genes of the mammalian sex-determining pathway have been identified in gonads of different vertebrates. *Sox9*, *Dax1* and *Dmrt1* are expressed at the onset of gonadal development in birds and reptiles. Today we are still unclear as to how temperature ultimately affects the sex of the embryo, but the argument for the role of estrogen appears even stronger. Some of the effects of toxicants such as polychlorinated biphenyls (PCBs) can have estrogenic effects and can induce reproductive anomalies. There is abundant evidence that manmade products can become environmental toxicants.

5. Literatura

- Castro P., Huber M.E. (2005). Marine Biology – fifth edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., Avenue of the Americas, New York
- Crews D., Bergon J.M., McLachlan J. A. 1995. The Role of Estrogen in Turtle Sex Determination and the Effect of PCBs. *Environ Health Perspect* 103(Suppl 7):73-77.
- Gilbert S. F. (2003). Developmental Biology – sixth edition, Sinauer Associates, INC., Publishers, Sunderland, Massachusetts
- Janzen F. J. 1994. Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 91, pp. 7487-7490, August 1994 Population Biology.
- Lance V. A. 1997. Sex Determination in Reptiles: An Update. From the Symposium Developmental Endocrinology of Non-Mammalian Vertebrates presented at the Annual Meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology, 26-30 December 1996, at Albuquerque, New Mexico.
- Moreno-Mendoza N., Harley V. R., Merchant-Larios H. 1999. Differential Expression of SOX9 in Gonads of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* at Male- or Female- Promoting Temperatures. *Journal of experimental zoology* 284:705-710 (1999).
- Schwanz L. E., Janzen F.J. 2008. Climate Change and Temperature-Dependent Sex Determination: Can Individual Plasticity in Nesting Phenology Prevent Extreme Sex Ratios?. *Physiological and Biochemical Zoology* 81(6):826–834. 2008.
- Standora E. A., Spotila J. R. 1985. Temperature Dependent Sex Determination in Sea Turtles. *Copeia*, Vol. 1985, No. 3. (Aug. 5, 1985), pp. 711-722.
- Torrse Malnado L. C., Landra Piedra A., Moreno Mendoza N., Marmolejo Valencia A., Meza Martínez A., Merchant Larios H. 2002. Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology* 129 (2002) 20-26.
- Valenzuela N., Janzen F. J. 2001. Nest-site philopatry and the evolution of temperature-dependent sex determination. *Evolutionary Ecology Research*, 2001, 3: 779–794.

<http://www.global-greenhouse-warming.com/climate-change-and-sea-turtles.html>

<http://media-portal.biz/morske-kornjace-tihi-moreplovci-jadrana/>

