

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:629425>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI 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 kornjake.....	3
2.2. Spolni život morskih kornjaka.....	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 uključeni 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 kornjaka u spolnoj determinaciji.....	15
2.8. Utjecaj poliklornih bifenilnih spojeva na TSD kod kornjaka.....	17
2.9. Globalno zatopljenje i temperaturna determinacija spola.....	19
3. Zaključak.....	20
4. Sažetak/summary.....	21
5. Literatura.....	22

1. Uvod

Sve do otkrića 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 vrstama.

Spol većine kornjaka određeno je okolišnim faktorom. U ovih gmazova temperatura je, za vrijeme određenog razdoblja razvitka, predstavlja odlučujući faktor u određivanju spola. Ona djeluje poput prekidača koji se pri određenim temperaturama pali i pokreće molekularne procese koji se u konačnici kao ishod daju 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 gmazova, ali se točan molekularni mehanizam još uvijek ne zna. Poznato je da neki geni koji su ključni za kromosomsku determinaciju sudjeluju i u temperaturnoj determinaciji. Također se zna kako pojedine tvari iz izvješkova 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 općenito povećanje temperature na Zemlji. Kakva je sudbina vrsta sa temperaturnom determinacijom? Da li će izumrijeti ili će se ipak prilagoditi novonastalim uvjetima?

2.1. Morske kornjake

Kornjake (*Testudines*, ranije *Testudinata* i *Chelonia*) predstavljaju vrlo staru i primitivnu skupinu gmazova; njihovi najstariji pronađeni fosilni nalazi datiraju iz razdoblja Perma, što je oko 280 milijuna godina prije nove ere. Morske kornjake su gmazovi koji potječu s kopna, otkud su prije otprilike 200 milijuna godina prešli u more. U prvih 50 do 100 milijuna godina evolucija se pobrinula za bitav 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 uvući u njega. Ipak, zadržale su se neke tipične značajke svih gmazova; dišu plućima 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 kornjaka obuhvaća 11 porodica sa 25 rodova i oko 250 vrsta.

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

1. Glavata želva (*Caretta caretta*)
2. Sedmopruga usminjaka (*Dermochelys coriacea*)
3. Zelena želva (*Chelonia mydas*)
4. Karetna želva (*Eretmochelys imbricata*)
5. Australaska zelena želva (*Natator depressus*)
6. Kempijeva želva (*Lepidochelys kempfi*)
7. Maslinasta ili pacifička želva (*Lepidochelys olivacea*)

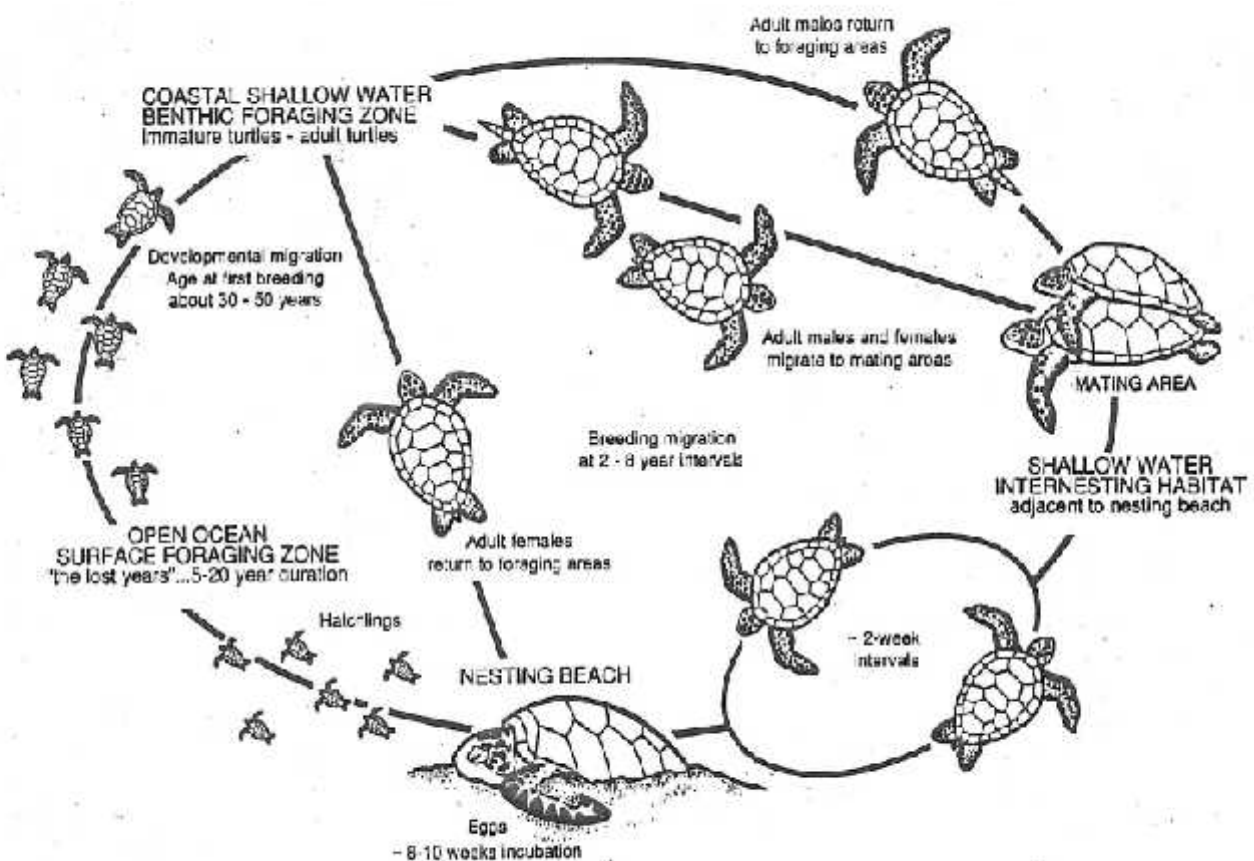
U *Dermochelyidae* jedino spada vrsta *Dermochelys coriacea* jer se fiziološki poprilično razlikuje od ostalih vrsta morskih kornjaka.

Većina vrsta je široko rasprostranjena, osim *L. kempfi*, 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 plitine. Iznimka je vrsta *D. coriacea* koja obitava u hladnijim morima i na većim dubinama. Glavne lokacije za gniježenje vrsta *Dermochelys coriacea*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, *L. kempfi* i *Natator depressus* su smještene na otocima i kontinentalnim plažama između sjeverne i južne obratnice.

2.2. Spolni život morskih kornja a

Cijeli svoj život morske kornja e 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 provede u moru ne izlaze i na kopno i danas je nepoznanica. 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 kornja e prelaze velike distance. Zanimljiv je primjer kako *Caretta caretta* na e 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 kornja e 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 područja razmnožavanja, odakle se muške jedinke vraćaju na hranidbena područja, a ženske odlaze prema područjima gnijež enja (Slika 1.). Neke vrste prevale i više od 3000 km kako bi pronašle svoju plažu.

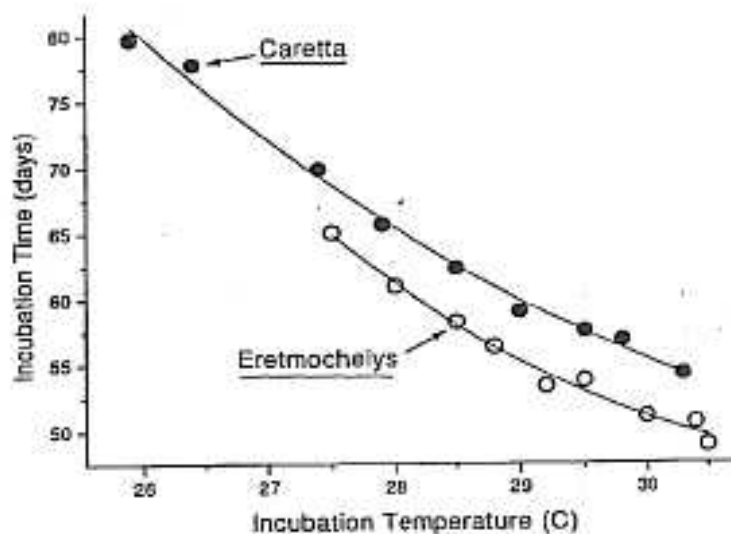


Slika 1. Životni ciklus morskih kornja a; trajanje pojedine faze ovisi o vrsti

(Preuzeto iz: Lutz i Musick, 1997)

Polaganje jaja se uvijek dešava noću, osim kod *Lepidochelys kempfi* koja pretežno danju polaže svoja jaja. Kao što je već spomenuto, polaganje jaja je jedini razlog zašto morske kornjake izlaze na kopno. Udaljenost od mora može biti i do 100 metara, gdje morske kornjake traže pogodno mjesto za polaganje svojih jaja i gdje iskopavaju ovalnu rupu. U nju polažu stotinjak jaja koja potom zatrpaju te se vrata u more. Ovisno o vrsti, vremenski period polaganja jaja može varirati od 15 minuta do više sati. Nakon polaganja jaja, kornjake zakopaju rupu i brišu tragove, tako da je gnijezdo teško pronaći. Nakon uspješnog polaganja jaja, izmorene kornjake se vraćaju u more i odlaze na hranidbeno područje gdje se pripremaju za novo reprodukcijsko razdoblje. Jaja se razvijaju od 105 do 110 dana. Kada se izvale iz jaja, male morske kornjake se odmah upute prema sigurnom moru iz kojeg će se vratiti tek nakon 15-tak godina kao odrasle ženke radi polaganja jaja. Na tom putu su često žrtve ptica, rakova i ostalih životinja. One koje dostignu do mora, izložene su opasnostima od velikih riba. Pretpostavlja se da samo jedna od 1000 mladih dostigne spolnu zrelost.

Reproduktivna sezona ženki je svake dvije do četiri godine dok se mužjaci mogu pariti svake ili svake druge sezone. Reprodukativne karakteristike variraju od vrste do vrste (Tablica 1.). Sve vrste morskih kornjaka prave nekoliko gnijezda s jajima za vrijeme sezone gniježenja. Uspješan razvoj embrija ovisi o nekoliko okolišnih faktora, a među njima su temperatura, vlažnost, salinitet i količina 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 skraćuje 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 gnijež enja	Broj gnijezda po sezoni	Intervali gnijež enja (dani)	Remigracijski interval (godine)	Broj jaja u gnijezdu
<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 izme u arribada

Napomena: Broj ane vrijednosti su izražene: srednja vrijednost za ispitane jedinke, u zagradama su standardne devijacije te na kraju broj uklju enih jedinki.

2.3. Mehanizmi determinacije spolova

Spolna diferencijacija je uskla ena kaskada hormonskih i geneti kih zbivanja tijekom kojih se indiferentne gonade razvijaju u testise ili ovarije s odgovaraju im urogenitalnim i sekundarnim spolnim karakteristikama. Spolna determinacija je kona an ishod spolne diferencijacije (Lance, 1997).

Danas nam je poznato da oboje, i okoliš i unutarnji mehanizmi odre ivanja spola mogu djelovati u razli itih vrsta. Determinacija spola može biti pod genetskom ili okolišnom kontrolom pa razlikujemo kromosomsku te okolišno uvjetovanu determinaciju spola (Gilbert, 2003). Zanimljivo je kod mehanizma determinacije spola da ako imamo jedan tip determinacije to ne zna i da on isklju uje drugi tip. Kod nekih organizama kao što su daždevnjaci koji imaju heteromorfne kromosome XY ako razvoj gonada te e na 20 C onda se odvija genetska determinacija spolova i odnos spolova potomaka je 1:1, me utim ako iz bilo kojeg razloga do embrionalnog razvoja dolazi na višim temperaturama od 30°C, uklju uje se temperaturna determinacija spolova i u tom slu aju omjer spolova nije više 1:1.

2.3.1. Kromosomska determinacija spola

Postoji mnogo načina na koji kromosomi mogu odrediti spol u embriju. U sisavaca prisutnost X ili Y kromosoma na drugom mjestu određuje koji će embriji biti ženski (XX homogametna), a koji muški (XY heterogametna). Y kromosom sadrži gen koji dešifriraju testis-determinirajući faktor. Taj faktor usmjerava razvoj gonada u sjemenike, a ne jajnike. Y kromosom je odlučujući i mehanizam za određivanje spola u sisavaca. U ptica, situacija je obrnuta: mužjaci imaju dva istovrsna spolna kromosoma (ZZ), dok ženke imaju različit par (ZW). U kukaca letelaca Y kromosom nije značajan za određivanje spola, ali omjer X kromosoma prema autosomima određuje spolni fenotip. U drugih kukaca (naročito u *Hymenoptera*, kao što su pčele, ose i mravi), oplođena, diploidna jaja razvijaju se u ženke, dok neoplođena, haploidna jaja postaju mužjaci (Gilbert, 2003).

2.3.2. Okolišno uvjetovana determinacija spola (temperaturna determinacija)

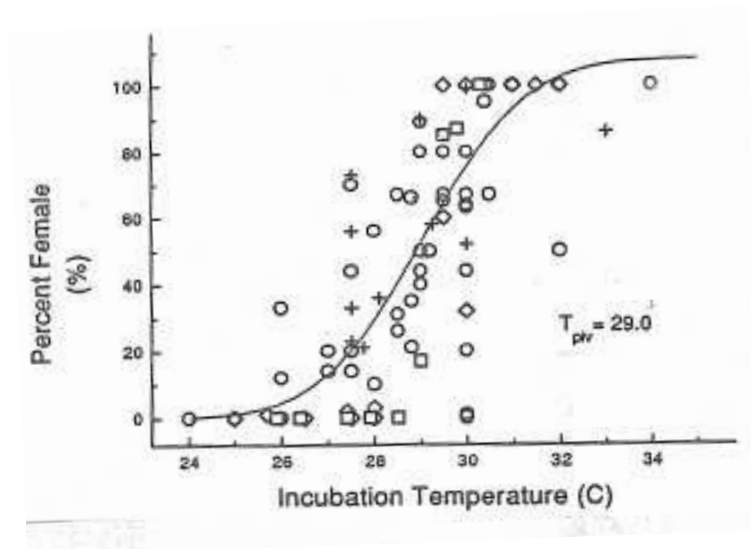
Kod kralježnjaka osim XY i ZW kromosomske determinacije postoji i treći mehanizam koji je ustanovljen kod nekih vrsta gmazova bez spolnih kromosoma. Kod njih je temperatura najvažniji faktor koji određuje spol (Malnado i sur., 2002). Molekularni mehanizmi temperaturne determinacije spola (temperature-dependent sex determination TSD, također i environmental sex determination ESD) do danas još nisu poznati, ali se zna nešto o genima i faktorima koji utječu na ovaj mehanizam. Kod kromosomske determinacije spola omjer spolova je najčešće 1:1 što nije slučaj kod temperaturne determinacije spola.

Dok je spol većine zmija i većine guštera određen spolnim kromosomima za vrijeme oplodnje, spol većine kornjaka i svih vrsta krokodila određen je okolišem. U ovih gmazova temperatura jaja, za vrijeme određenog razdoblja razvitka, predstavlja odlučujući i mehanizam u određivanju spola. Samo male promjene u temperaturi mogu uzrokovati dramatične 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.). Međutim, 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 maskulinizirajuća temperatura ona pri kojoj je isključivo produkcija muškog spola (male producing temperature MPT). Raspon između temperatura koje se uvjetovani maskulinizaciju odnosno feminizaciju populacije naziva se tranzicijski raspon temperature. Kod mnogih krokodila i guštera na nižim se temperaturama rađaju ženke, a na višim mužjaci. Za kornjake je situacija obrnuta (Crews i sur., 1995).

Kod morskih kornja a se pri višim temperaturama u ve ini legu ženke, dok je pri nižim ve i udio muških potomaka. Termo senzibilni period za determinaciju je druga tre ina inkubacije. Pivotalne temperature su oko 28°C do 30°C (Tablica 2.) i (Slika 3.).

Tablica 2. Pivotalne temperature (°C) kod nekih vrsta morskih kornja a (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. Razli ite oznake na grafikonu odnose se na razli ite vrste morskih kornja a. (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 kratkom kraku Y kromosoma kod većine placentalnih sisavaca, uključujući i tobočare, ali nije utvrđeno 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 tobočara i primitivnom Y kromosomu. Uloga *Sox3* gena u determinaciji spola je još uvijek nepoznata. Kromosomska determinacija spola evolucijski je nastala genskom duplikacijom *Sox3* gena smještenom na X kromosomu prilikom čega je nastao *Sry* gen i to nakon odvajanja monotremata od tobočara i viših sisavaca. Zbog toga, monotremata, za razliku od tobočara i viših sisavaca imaju ZW determinaciju spola. Tobočari 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 članu 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 kornjaka pa se smatra da je uloga *Sox9* gena u determinaciji testisa evolucijski konzervirana (Lance, 1997).

Za mnoge gene koji su uključeni u kromosomsku determinaciju spola potvrđena je prisutnost i kod vrsta s temperaturnom determinacijom spola. Tako je *Sox9* koji se eksprimira u testisima miševa pronađen ekspimiran u embrionalnim testisima gmazova. Također, zajednički geni za sisavce i gmazove tj. geni za koje se smatra da sudjeluju i u kromosomskoj 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. Srodan je Sry genu i visoko je konzerviran tijekom evolucije kralježnjaka. Produkti 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).

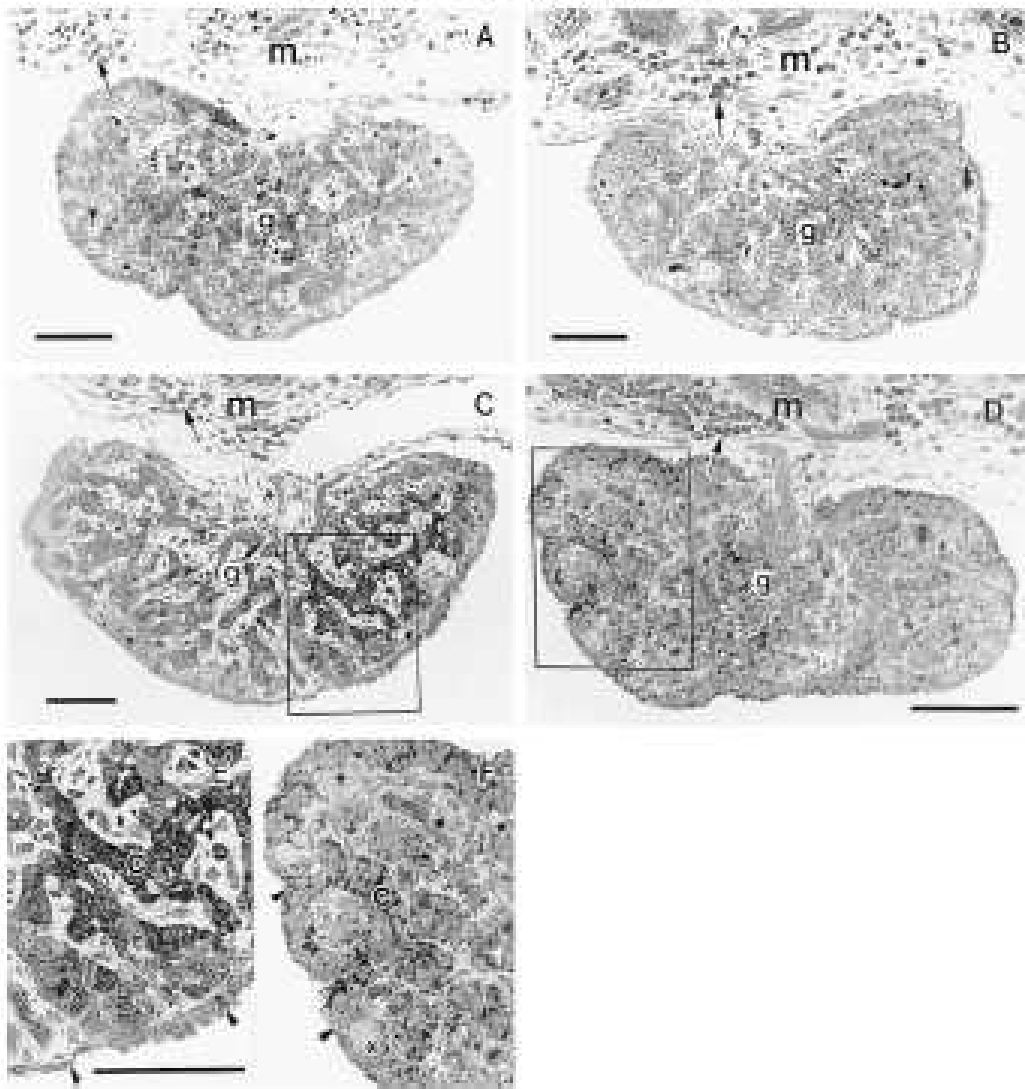
Lepidochelys olivacea je jako osjetljiva vrsta i njena najveća gnjezdišta nalaze se u Indiji, Mexicu i Kostarici tj. u Tihom i Indijskom oceanu. Za nju je karakteristična pojava zvana arribada tj. gniježenje danju u velikim skupinama. 1947. godine zabilježeno je 40000 ženki koje su se na plaži gnijezdile u jednom danu. 1999. godine proučavana je ekspresija *Sox9* gena kod te kornjače koristeći antitijela za detekciju ekspresije. Temperatura pri kojoj se rađa i udio mužjaka je 27°C (male promoting temperature MPT), dok je udio ženki pri 32°C (female promoting temperature FPT). Temperaturno senzitivni 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.-tog dana, iako na MPT, spol je determiniran 24.-tog dana, dok se kod FPT spol determinira nešto kasnije tj. 26.-tog dana.

Sakupljena su jaja s četiri legla *L. olivacea* na plaži La Escobilla u Mexicu 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 ustanovljeno je da sve do 24.-tog stadija (24 dana embrionalnog razvoja), histologija gonada embrija inkubiranih na MPT i FPT se ne razlikuju. Medularni tračci se u obaju i na površini je formiran epitel sastavljen od kubičnih ili cilindričnih stanica (Slika 4. A i B).

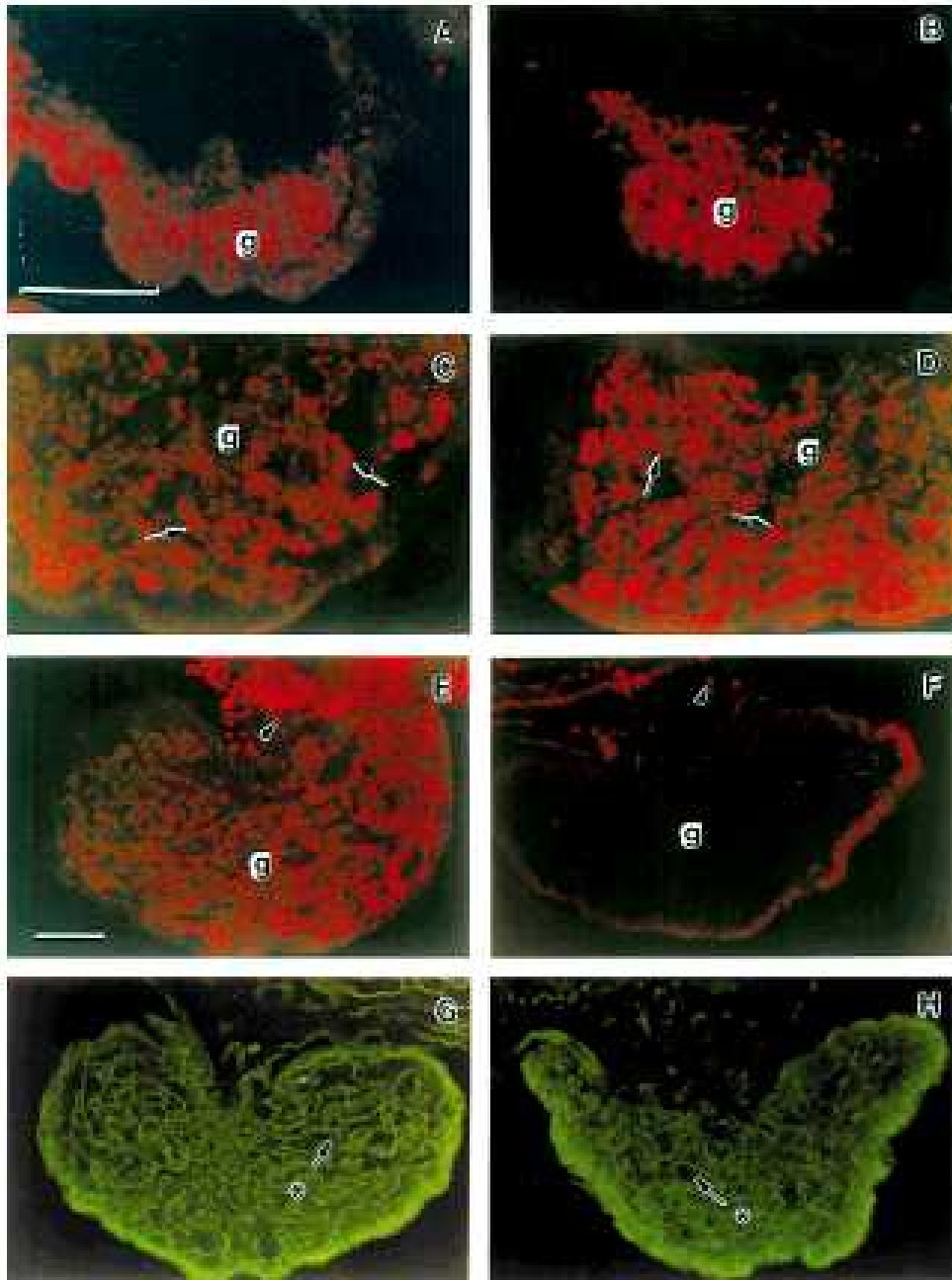
26.-tog i 27.-og dana u obaju se histološke razlike. Gonade embrija inkubiranog na MPT pokazuju izražene medularne tračke, okružene stanicama strome. Na površini je formiran jednoslojni kubični epitel (Slika 4. C i E). Na FPT, površinski epitel postaje cilindričan i višeslojan, a medularni tračci se 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).

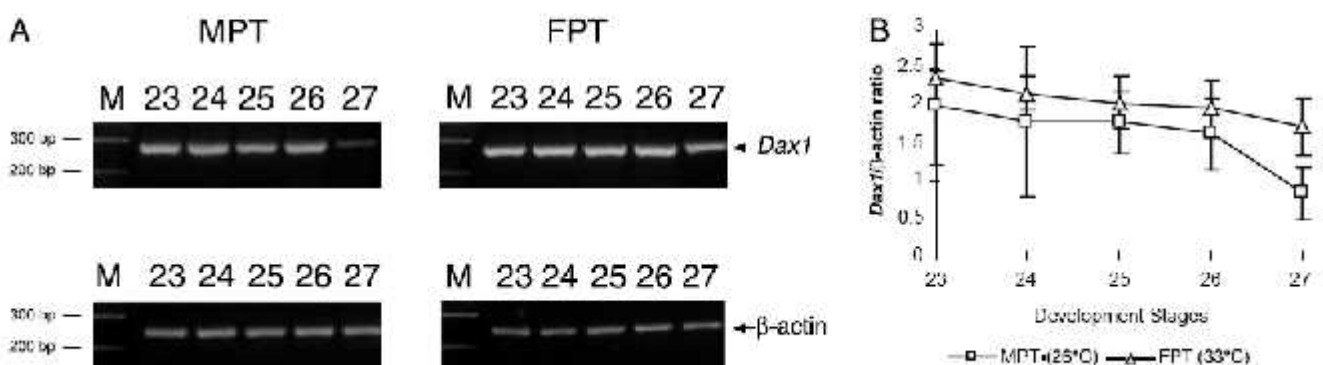
(Preuzeto iz: Moreno-Mendoza i sur., 1999.)

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 ekspresije i determinacije spola u maslinaste želve. 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 utišan i diferencijacija ide prema formiranju ženskih gonada, ovarija.

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 homologe nekkih drugih gena ukljuenih 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 uključene u biokemijske putove determinacije spola). Njegova ekspresija ovisi o spolu i obično je jače 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.

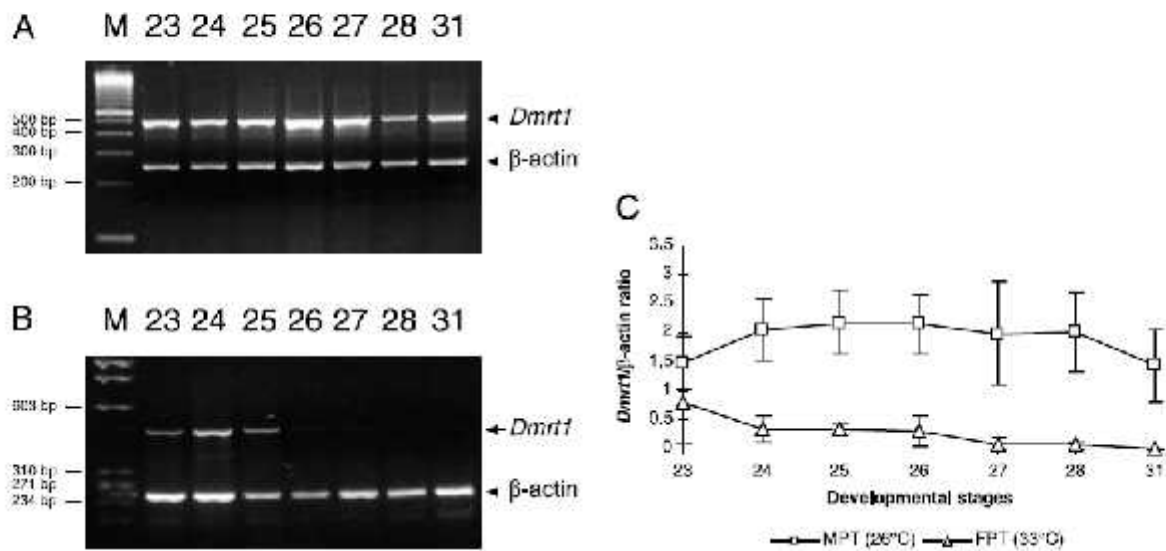
mRNA ekspresijski profil *Dax1* i *Dmrt1* u gonadama *L. olivacea* za vrijeme i nakon termosenzibilnog perioda uspoređen je sa ekspresijskim profilom *Sox9* na temelju rezultata dobivenih RT-PCR-om. Za određivanje ekspresijskog profila ovih gena tijekom temperaturne determinacije spola kod *L. olivacea* 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 četiri gonade sa 23.-tog, dvije sa 24.-tog 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 detektiram u svim uzorcima, ali se ja ina njegove ekspresije razlikuje. Dok je u stadijima od 23.-26.-tog dana intenzitet sli an i 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.-tog dana (Slika 7. B).



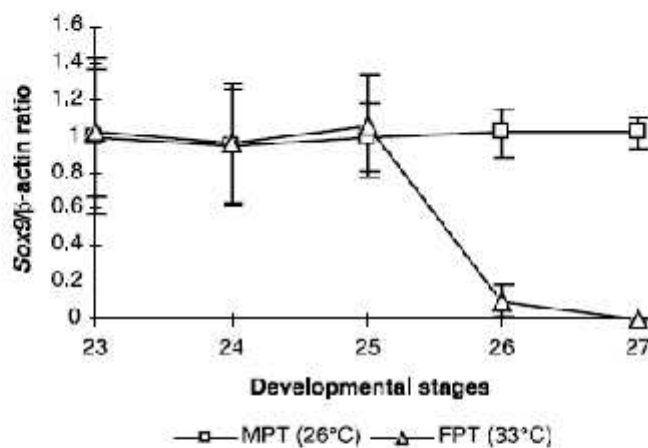
Slika 7. Ekspresija *Dmrt1* mRNA
(Preuzeto iz: Torres i sur., 2002)

Ekspresija *Sox9* ukazuje na sli an intenzitet ekspresije za period od 23.-25.-tog 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 zna ajno raste na FPT, ali tek nakon termo senzibilnog perioda odnosno kad je ve mogu e ustanoviti morfološke razlike izme u gonada koje se usmjeravaju u razvoj testisa ili ovarija. To ukazuje da gen *Dax1* nije uklju en u biokemijski put temperature

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

Ekspresija *Dmrt1* pokazuje značajnu jaču ekspresiju pri MPT u svim stadijima nego pri FPT, za razliku od *Sox9* gena koji pokazuje sličnu jačinu ekspresije 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

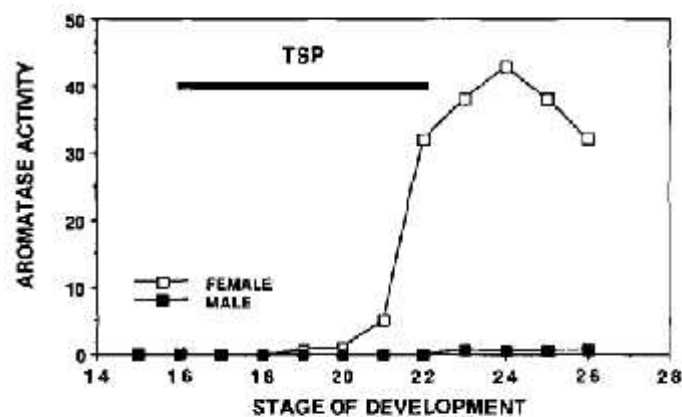
(Preuzeto iz : Torres i sur., 2002)

2.7. Uloga estrogena kod kornjaka 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 značajnu 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 kornjaka efektivno djelovanje estrogena je utvrđeno u periodu diferencijacije gonada. Ako je temperatura inkubacije 1-2°C oko pivotalne temperature, ali je bliže temperaturama koje će 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 izležiti i muški potomci, čak i kad su jaja inkubirana na temperaturi pri kojoj se obično izlegu ženke (Gilbert, 2003). Djelovanje dihidrotestosterona na pivotalnoj temperaturi rezultira rađanjem mužjaka. Na temperaturama kada je 100%-tno izvaljivanje ženki

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

ini se da je enzim aromataza, koji pretvara testosteron u estrogen, ključan u temperaturno ovisnom određivanju 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 određivanja spola (Slika 9.).

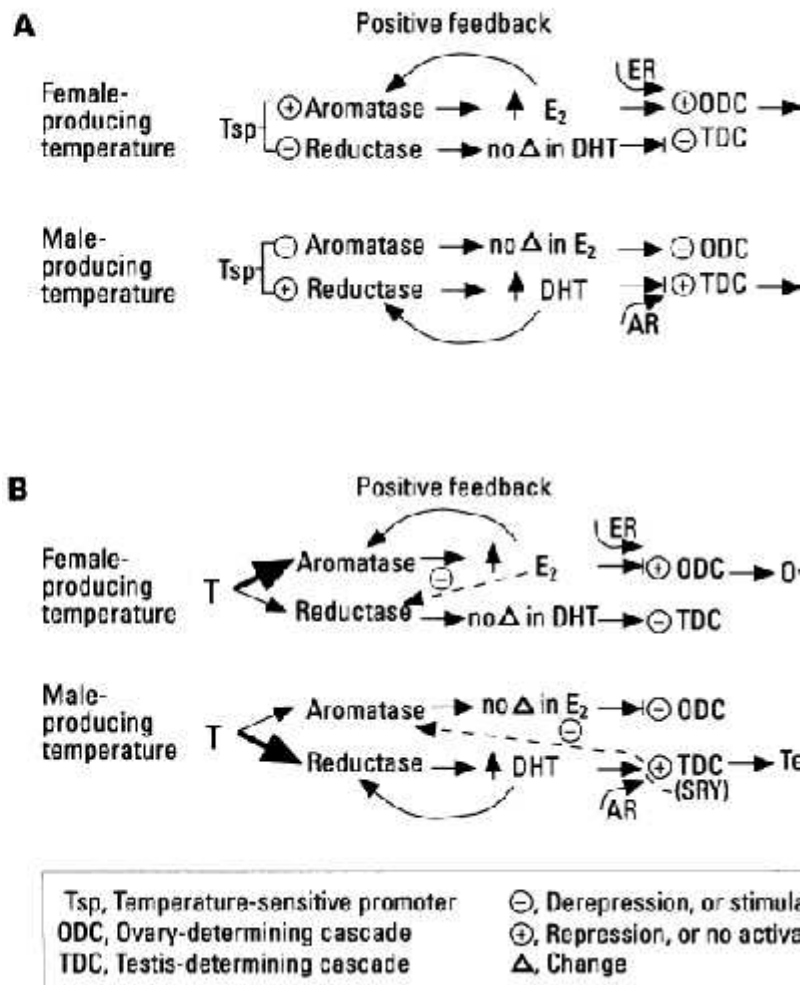


Slika 9. Aktivnost aromataze u gonadama mužjaka i ženki za vrijeme temperaturno senzitivnog perioda (Preuzeto iz: Lance, 1997).

Aromataza se proizvodi na dva mjesta u embriju: u gonadama i mozgu. Međutim, razina gonadalne aromataze ini se da 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, uočajna je znatno viša aktivnost aromataze, viša 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, točan 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 određivanje 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 ovarije ili testise. 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 slu aju kodiraju za hormonske receptore. MPT aktivira gene koji kodiraju za androgene, a FPT za estrogene receptore (Slika 10).



Slika 10. Dva predložena molekularna modela temperaturene 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 zaga iva a, mogu djelovati sli no estrogenu. Iznimno niske koncentracije PBC mogu promijeniti spol kornja a povišenjem temperature na muški spol.

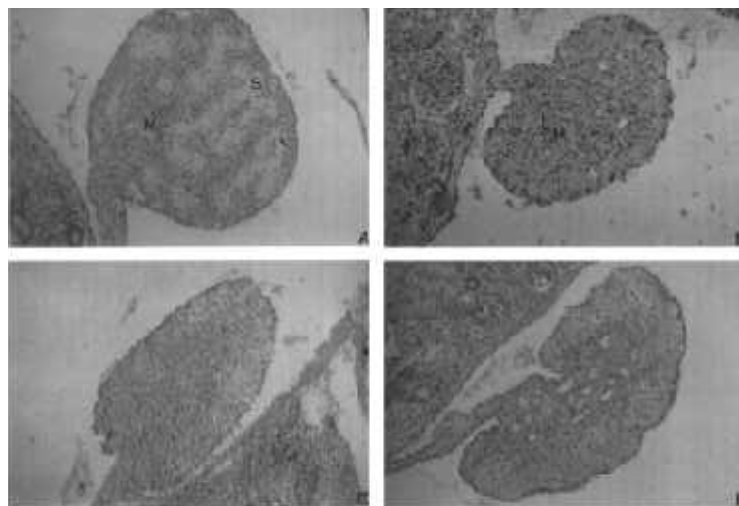
Ekspirimentom je ispitano djelovanje jedanaest razli itih PCB-a na jajima inkubiranim na 27.8°C odnosno na temperaturi pri kojoj se legu mužjaci. Svaki spoj dodan je u visokoj i niskoj koncentraciji. Rezultati su pokazali da 2',4',6'-trikloro-4-bifenil i 2',3',4',5'-tetrakloro-4-bifenil imaju estrogenski 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',5'-Dichloro-3-biphenylol	0/0	0/14
B. 2,2',4'-Trichlorodiphenyl ether	7/0	21/0
C. 2,2',5'-Trichloro-4-biphenyl	0/0	7/0
D. 2,3,4'-Trichlorobiphenyl	7/0	0/0
E. 2,3',5'-Trichlorobiphenyl	0/8	7/8
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- <i>p</i> -terphenyl	0/0	0/7
I. 2',3',4',5,5'-Pentachloro-2-biphenylol	0/0	0/0
Ethanol control	0	0
E ₂ control	100	100

Ove spoznaje mogu imati veliku važnost u očuvanju okoliša i zaštiti ugroženih vrsta, kao što su kornjaci i vodozemci, u kojih hormoni mogu utjecati na promjene u primarnom određivanju 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-bifenil 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 mogućnost poremećaja omjera spolova koji je potreban za normalan nastavak vrste. Odnos spolova sa TSD-om nije 1:1, ali odstup 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 dali će to u konačnici uzrokovati pre malo mužjaka koji će biti ženkama na raspolaganju.

Plaže s tamnim pijeskom jače apsorbiraju sunčevu svjetlost pa je na tim plažama veći udio ženki, dok odnos spolova na svjetlijim plažama nije toliko odstupljen prema ženkama. Odnos između temperature zraka i pijeska je izuzetno koreliran. U zadnjih sto godina temperatura pijeska u gnjezdištima je porasla za 0.5°C. Za organizme s temperaturnom determinacijom spola to je značajno i promjena u samo 0.5°C može drastično promijeniti omjer spolova.

Morske kornjake su migratorni organizmi pa je moguće da će u budućnosti kolonizirati nova područja na kojim trebaju postojati osnovni uvjeti za formiranje gnjezdišta. Druga stvar koja bi se mogla desiti je pomak reproduktivne sezone, ali to predstavlja problem za morske kornjake koje gnijezde tijekom cijele sezone. To su dva načina kojim bi morske kornjake mogle riješiti negativan utjecaj globalnog zatopljenja, ali pitanje je dali 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. dali će razvoj gonada krenuti prema stvaranju testisa (muških spolnih žlijezda) ili možda prema razvoju ovarija (ženskih spolnih žlijezda). Morske kornjake 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 uvijek velika nepoznanica za znanost, ali se poprilično dobro zna o faktorima i genima koji su uključeni u taj mehanizam. *Sox9*, *Dmrt1* su geni čija 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 okolišnoj 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 mana je da temperaturna determinacija ograničava uvjete 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 neizmjerljivo velikom brzinom?

4. Sažetak

Na određivanje spola djeluju i genetički i okolišni faktori. Kod mnogih gmazova, tip gonada je određen inkubacijskom temperaturom jaja i taj je proces poznat kao temperaturna determinacija spola (TSD). Gmazovi sa TSD pokazuju različite 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 toksini spojevi kao što su poliklorirani bifenili (PCBs) mogu imati djelovanje slično estrogenu i uzrokovati reproduktivne anomalije. Ovo je očit 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. Natl. 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.
- Torrese 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/>

