

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/urn:nbn:hr:217:629425>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ODREĐIVANJE SPOLA KOD MORSKIH
KORNJAČA POD UTJECAJEM TEMPERATURE

TEMPERATURE DEPENDENT SEX
DETERMINATION IN SEA TURTLES

SEMINARSKI RAD

Mija Marinković

Prediplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate study of molecular biology)

Mentor: prof. Dr. sc. Gordana Lacković Venturin

Zagreb, 2010.

Sadržaj

1. Uvod.....	2
2.1. Morske kornjače.....	3
2.2. Spolni život morskih kornjača.....	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 kornjača u spolnoj determinaciji.....	15
2.8. Utjecaj poliklornih bifenilnih spojeva na TSD kod kornjača.....	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 vrsta.

Spol većine kornjača određen je okolišnim čimbenikom. U ovih gmazova temperatura jaja, za vrijeme određenog razdoblja razvitka, predstavlja odlučujući čimbenik u određenju spola. Ona djeluje poput prekidača koji se pri određenim temperaturama pali i pokreće molekularne procese koji će u konačnici 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 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 čovjekova 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 opće 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 kornjače

Kornjače (*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 kornjače su gmazovi koji potječu s kopna, otkud su prije otprilike 200 milijuna godina prešle u more. U prvih 50 do 100 milijuna godina evolucija se pobrinula za čitav 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 kornjača obuhvaća 11 porodica sa 25 rodova i oko 250 vrsta.

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

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

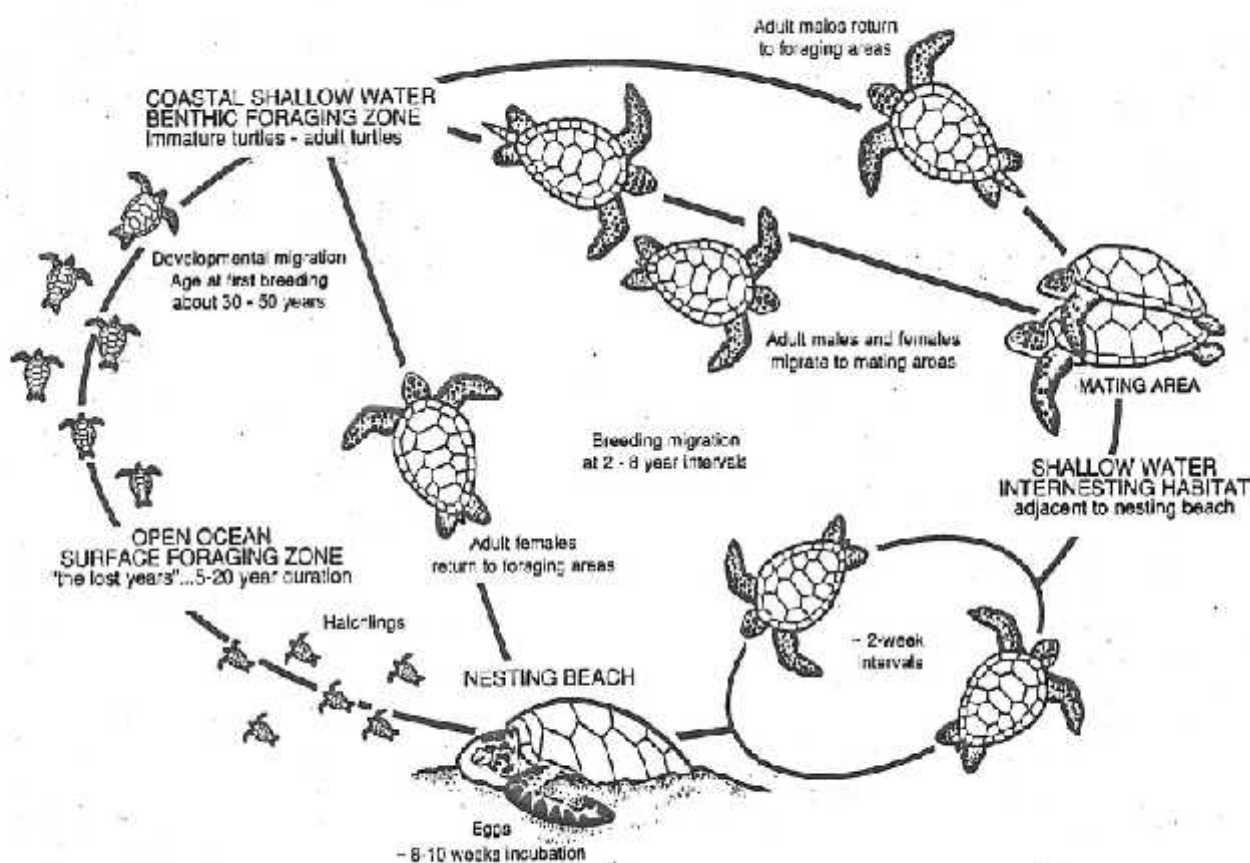
U *Dermochelyidae* jedino spada vrsta *Dermochelys coriacea* jer se fiziološki poprilično razlikuje od ostalih vrsta morskih kornjača.

Većina vrsta je široko rasprostranjena, osim *L. kemp*, koja je ograničena na područje Meksičkog 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 pličine. Iznimka je vrsta *D. coriacea* koja obitava u hladnijim morima i na većim dubinama. Glavne lokacije za gniježđenje vrsta *Dermochelys coriacea*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys olivacea*, *L. kemp* i *Natator depressus* su smještene na otočnim i kontinentalnim plažama između sjeverne i južne obratnice.

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 provede u moru ne izlazeći 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 kornjače prelaze velike distance. 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 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 gniježđenja (Slika 1.). Neke vrste prevale i više od 3000 km kako bi pronašle svoju plažu.

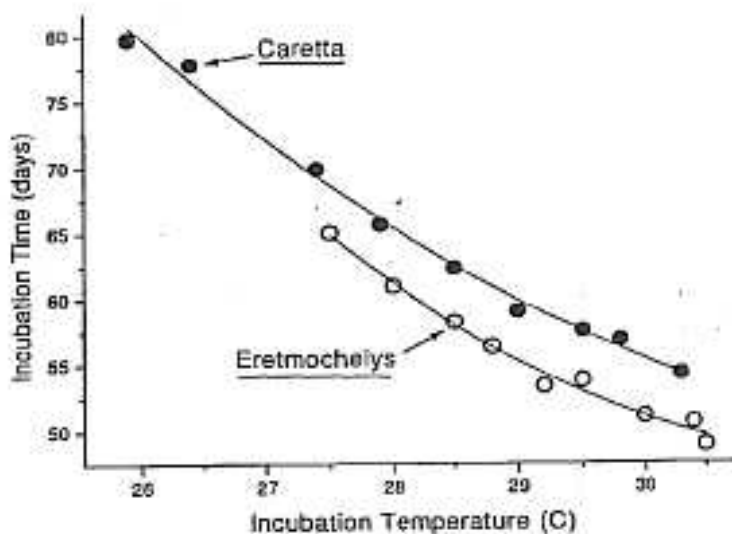


Slika 1. Životni ciklus morskih kornjača; trajanje pojedine faze ovisi o vrsti

(Preuzeto iz: Lutz i Musick, 1997)

Polaganje jaja se uvijek dešava noću, osim kod *Lepidochelys kemp*i koja pretežno danju polaže svoja jaja. Kao što je već spomenuto, polaganje jaja je jedini razlog zašto morske kornjače izlaze na kopno. Udaljenost od mora može biti i do 100 metara, gdje morske kornjače traže pogodno mjesto za polaganje svojih jaja i gdje iskopavaju ovalnu rupu. U nju polažu stotinjak jaja koja potom zatrpaju te se vrte u more. Ovisno o vrsti, vremenski period polaganja jaja može varirati od 15 minuta do više sati. Nakon polaganja jaja, kornjača zakopa rupu i briše tragove, tako da je gnijezdo teško pronaći. Nakon uspješnog polaganja jaja, izmorene kornjače se vraćaju u more i odlaze na hranidbena područja te se pripremaju za novo reproduksijsko razdoblje. Jaja se razvijaju od 105 do 110 dana. Kada se izvale iz jaja, male morske kornjače 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 sličnih životinja. One koje dostignu do mora, izložene su opasnostima od većih 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. Reprodukivne karakteristike variraju od vrste do vrste (Tablica 1.). Sve vrste morskih kornjača prave nekoliko gnijezda s jajima za vrijeme sezone gniježđenja. 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 gniježđenja	Broj gnijezda po sezoni	Intervali gniježđenja (dani)	Remigracijski interval (godine)	Broj jaja u gnijezdu
<i>Dermochelys coriacea</i>	Noć	6.17 (0.47) 4	9.5, 9-10	2.28 (0.14) 5	81.5 (3.6) 12
<i>Chelonia mydas</i>	Noć	2.93 (0.28) 9	12, 10-17	2.86 (0.23) 9	112.8 (3.7) 24
<i>Natator depressus</i>	Noć 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>	Noć	2.21 (0.79) 2	17, 22, 30, 45	1.70 (0.30) 2	109.9 (1.8) 11
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Noć 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>	Noć	3.49 (0.20) 4	14, 13-17	2.59 (0.15) 5	112.4 (2.2) 19

* Intervali između arribada

Napomena: Brojčane 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 zbivanja 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 okoliš i unutarnji mehanizmi određivanja spola mogu djelovati u različitim 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 znači da on isključuje 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 iz bilo kojeg razloga do embrionalnog razvoja dolazi na višim temperaturama od 30°C, uključuje se temperaturna determinacija spolova i u tom slučaju omjer spolova nije više 1:1.

2.3.1. Kromosomska determinacija spola

Postoji mnogo načina na koji kromosomi mogu odrediti spol u embrija. U sisavaca prisutnost X ili Y kromosoma na drugom mjestu određuje koji će embriji biti ženski (XX homogametan), a koji muški (XY heterogametan). Y kromosom sadrži gen koji dešifrira testis-determinirajući faktor. Taj faktor usmjerava razvoj gonada u sjemenike, a ne jajnike. Y kromosom je odlučujući čimbenik 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 letača 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), oplodena, diploidna jaja razvijaju se u ženke, dok neopložena, haploidna jaja postaju mužjaci (Gilbert, 2003).

2.3.2. Okolišno uvjetovana determinacija spola (temperaturna determinacija)

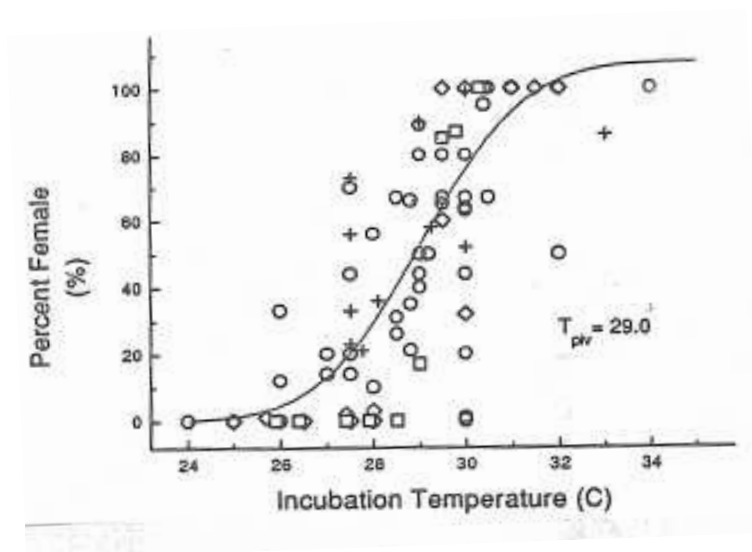
Kod kralježnjaka osim XY i ZW kromosomske determinacije postoji i treći mehanizam koji je ustanovljen kod nekih vrsta gmazova bez spolnih kromosoma. Kod njih je temperatura najvažniji faktor koji određuje spol (Malnado i sur., 2002). Molekularni mehanizmi temperaturne determinacije spola (temperature-dependent 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 kornjača i svih vrsta krokodila određen je okolišem. U ovih gmazova temperatura jaja, za vrijeme određenog razdoblja razvitka, predstavlja odlučujući čimbenik u određenju 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 će uvjetovati 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 kornjače 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. Thermo senzibilni 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 kraćem kraku Y kromosoma kod većine placentalnih sisavaca, uključujući i tobolčare, 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 tobolčara 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 tobolčara i viših sisavaca. Zbog toga, monotremata, za razliku od tobolčara i viših sisavaca imaju ZW determinaciju spola. Tobolčari 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 kornjača 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).

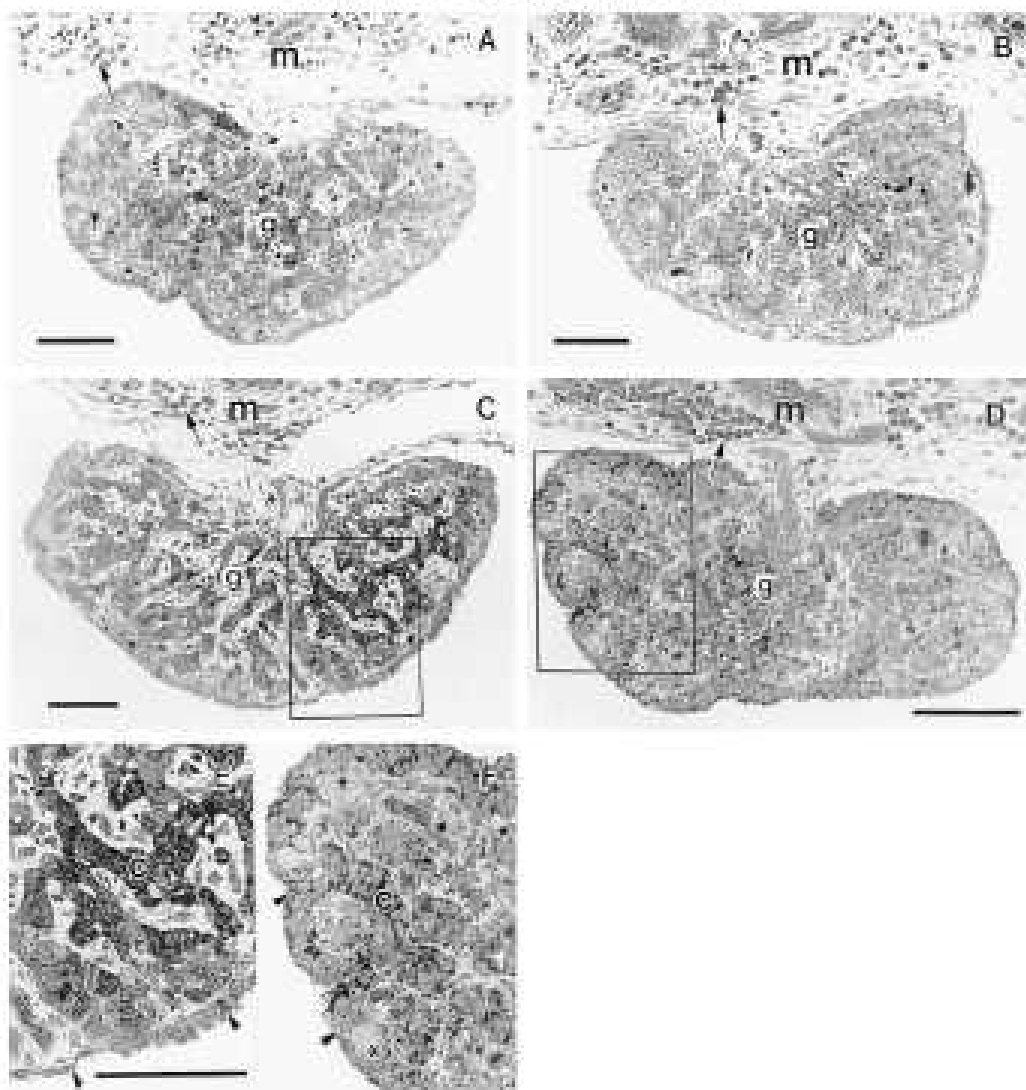
Lepidochelys olivacea je jako osjetljiva vrsta i njena najveća gnjezdišta nalaze se u Indiji, Mexicu i Kostarici tj. u Tihom i Indijskom oceanu. Za nju je karakteristična pojava zvana arribada tj. gniježđenje danju u velikim skupinama. 1947. godine zabilježeno je 40000 ženki koje su se na plaži gniježdile u jednom danu. 1999. godine proučavana je ekspresija Sox9 gena kod te kornjače koristeći antitijela za detekciju ekspresije. Temperatura pri kojoj se rađa veći udio mužjaka je 27°C (male promoting temperature MPT), dok je veći 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 sa 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 uočavaju i na površini je formiran epitel sastavljen od kubičnih ili cilindričnih stanica (Slika 4. A i B).

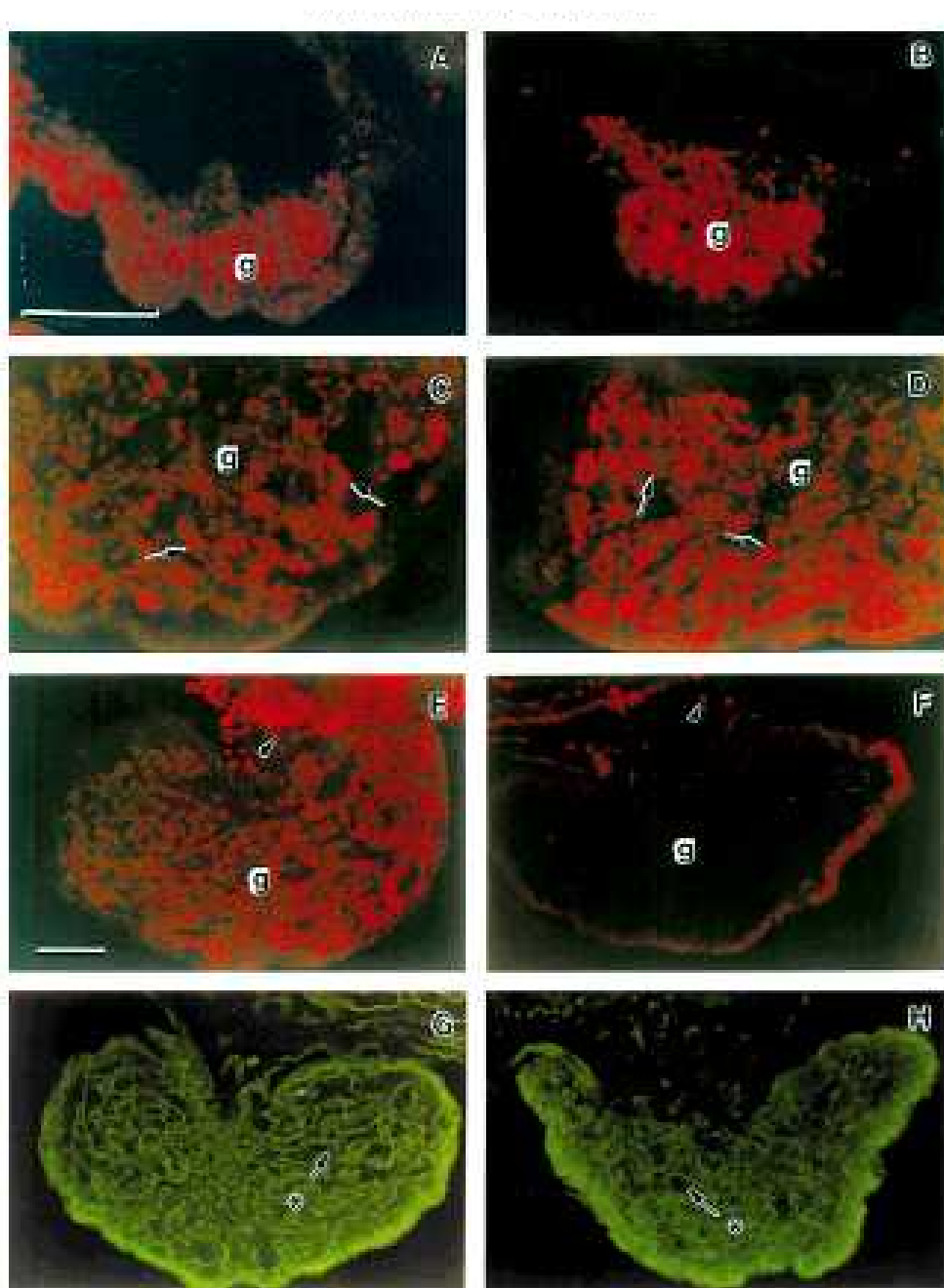
26.-tog i 27.-og dana uočavaju se histološke razlike. Gonade embrija inkubiranog na MPT pokazuju izražene medularne tračke, okružene stanicama strome. Na površini je formiran jednoslojni kubični epitel (Slika 4. C i E). Na FPT, površinski epitel postaje cilindričan i višeslojan, a medularni tračci se 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 tračcima 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 povećanjem se uočava prisutnost obojanog SOX9 proteina u jezgrama stanica medularnih tračaka. 25.-tog dana se uočavaju prve razlike. Pri MPT, medularni tračci ostaju SOX9 pozitivni, ali na FPT nije detektirana prisutnost SOX9 proteina u medularnim tračcima. Naposljetku, od 26.-tog dana pa na dalje na MPT se konstantno uočava prisutnost SOX9 u medularnim tračcima (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).

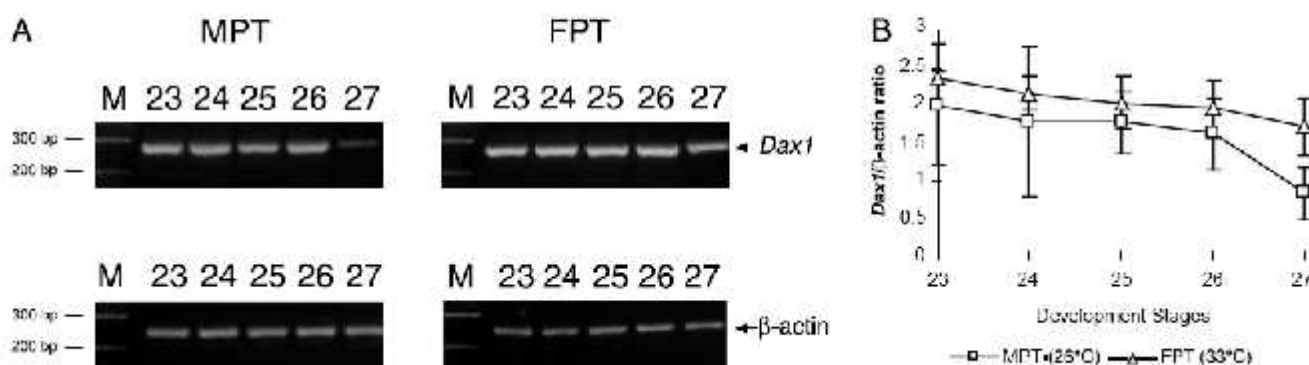
(Preuzeto iz: Moreno-Mendoza i sur., 1999.)

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 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 homolozi nekih drugih gena uključenih u biokemijske putove determinacije spola. *Sox9*, *Dax1* i *Dmrt1* se ekspimiraju 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 karakteristična za proteine uključene u biokemijske putove determinacije spola). Njegova ekspresija ovisi o spolu i obično je jače ekspimiran na MPT nego na FPT tijekom termosenzitivnog razdoblja. Kod *L. olivacea*, vrsti sa temperaturnom determinacijom spola, gen *Sox9* je ekspimiran u nediferenciranim gonadama na MPT kao i na FPT. Pri MPT taj gen je ekspimiran 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 termo senzibilnog 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.

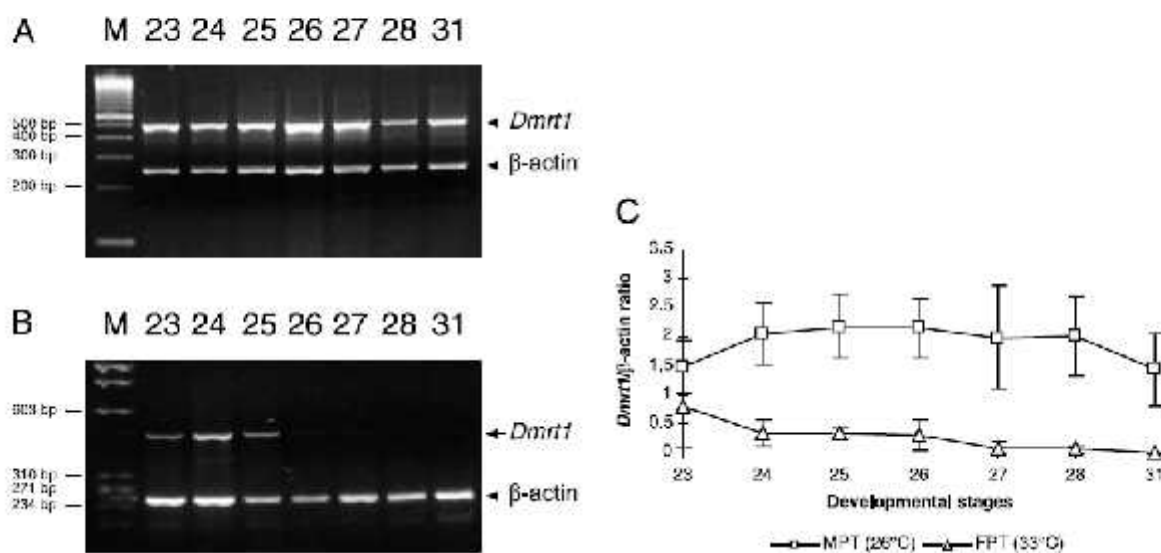


Slika 6. Ekspresija *Dax1* mRNA

(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). β -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 jačina njegove ekspresije razlikuje. Dok je u stadijima od 23.-26.-tog dana intenzitet sličan 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).



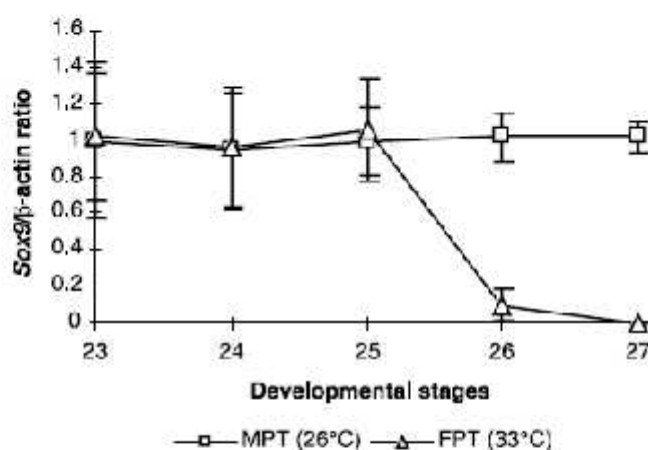
Slika 7. Ekspresija *Dmrt1* mRNA
(Preuzeto iz: Torres i sur., 2002)

Ekspresija *Sox9* ukazuje na sličan 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 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 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 termo senzibilnog perioda ekspresijski profil *Dmrt1* i *Sox9* gena je izrazito sličan pri obim temperaturama. To ukazuje na moguće ulogu ovog gena u temperaturnoj determinaciji spola (Torres i sur., 2002).



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

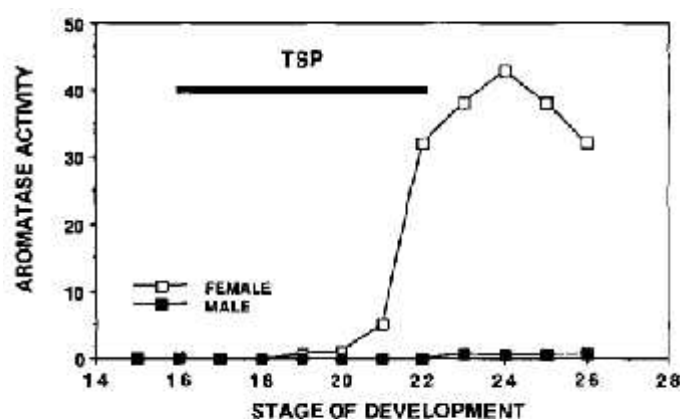
(Preuzeto iz : Torres i sur., 2002)

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 značajnu ulogu u spolnoj determinaciji. Sinteza estrogena u nediferenciranim gonadama inhibira razvoj testisa, a stimulira razvoj jajnika neovisno u 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 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 izleći 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

dihidrotestosteron 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).

Čini se da je enzim aromataza, koji pretvara testosteron u estrogen, ključan u temperaturno ovisnom određivanju spola. Inhibitori sinteze estrogena, blokiraju enzim aromatazu, pokazujući 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.).

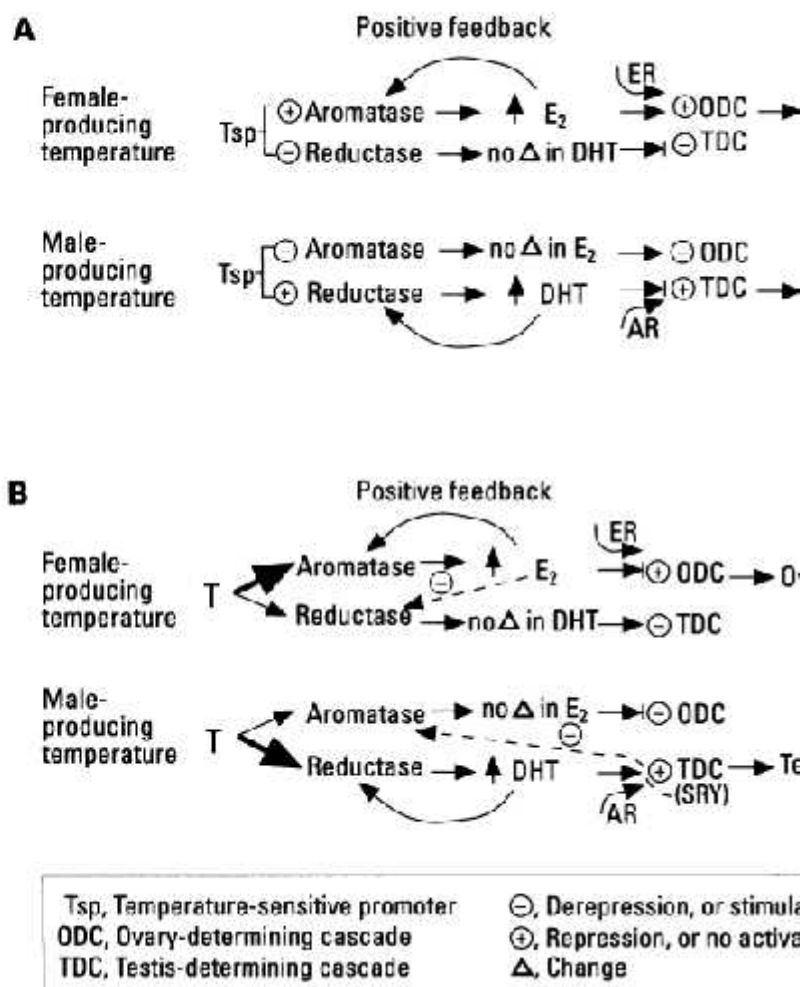


Slika 9. Aktivnost aromataze u gonadama mužjaka i ženki za vrijeme temperaturno senzitivnog perioda (Preuzeto iz: Lance, 1997).

Aromataza se proizvodi na dva mjesta u embriju: u gonadama i mozgu. Međutim, razina gonadalne aromataze čini 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, uočena 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 staničnoj razini koje u konačnici rezultiraju stvaranjem muškog ili ženskog spola. Geni koji se aktiviraju u ovom slučaju 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 kornjača (Preuzeto iz: Crews i sur., 1995).

2.8. Utjecaj poliklornih bifenilnih spojeva na TSD kod kornjača

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

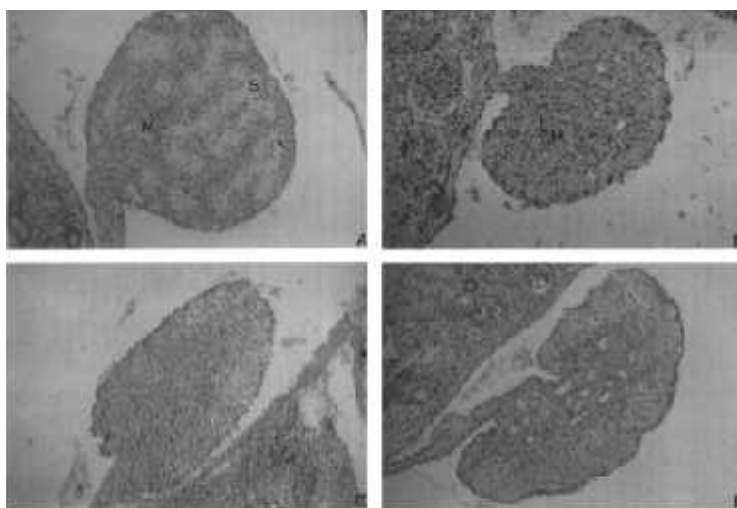
Eksperimentom je ispitano djelovanje jedanaest različitih PCB-a na jajima inkubiranim na 27.8°C odnosno na temperaturi pri kojoj se legu mužjaci. Svaki spoj dodan je u visokoj i niskoj koncentraciji. Rezultati su pokazali da 2',4',6'-trikloro-4-bifenil i 2',3',4',5'-tetrakloro-4-bifenil imaju estrogenski 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 2,3,5'-Dichloro-3-biphenylol	0/0	0/14
B 2,2',4'-Trichlorodiphenyl ether	7/0	21/0
C 2,2',5'-Trichloro-4-biphenylol	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 očuvanja okoliša i zaštiti ugroženih vrsta, kao što su kornjače 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'-T 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 mogućnost 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. Povećanjem 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 otklonjen prema ženkama. Odnos između temperature zraka i pijeska je izuzetno koreliran. U zadnjih sto godina temperatura pijeska u gnjezdštima 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 kornjače 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 kornjače koje gnijezde tijekom cijele sezone. To su dva načina kojim bi morske kornjače 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 kornjače su rijetka skupina životinja kod kojih okolišni čimbenik utječe na put diferencijacije gonada. Taj odlučujući čimbenik je temperatura inkubacije njihovih jaja za vrijeme termo senzibilnog 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 čovjekovoj 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 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 neizmjereno velikom brzinom?

4. Sažetak

Na određivanje 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 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 toksični spojevi kao što su poliklorirani bifenili (PCBs) mogu imati djelovanje slično estrogenu i uzrokovati reproduktivne anomalije. Ovo je očiti dokaz da utjecaj čovjeka 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 effects 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.
- Torrese Maldonado 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/>

