

Određivanje spola dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) i plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) metodom lančane reakcije polimerazom

ŽELJKA PEZER

*Zavod za animalnu fiziologiju, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Biološki odsjek
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu*

Sažetak

Poznavanje populacijske strukture vrste doprinosi pravilnom gospodarenju i očuvanju populacije određenog staništa. Podaci o spolu pojedinih jedinki nužni su za proučavanje populacija, no često ih je teško pribaviti promatranjem životinja u prirodi, odnosno morfološkim određivanjem. Molekularna biologija omogućava određivanje spola jedinki analizom njihovog genetičkog materijala. Ispitivana je mogućnost određivanja spola iz ukupno 37 uzoraka tkiva uginulih jedinki dobrog i plavobijelog dupina. Izolirana je ukupna DNA koja je potom korištena za određivanje spola metodom lančane reakcije polimerazom, pri čemu su upotrebene tri oligonukleotidne početnice specifične za ZFY i ZFX homologne regije na Y i X kromosomu. Dobiveni produkti razlikovali su se pokretljivošću na agaroznom gelu. Uspješno je određen spol 22 od 28 jedinki dobrog dupina, te svih 9 jedinki plavobijelog dupina. Budući da metoda zahtijeva određenu kvalitetu genomske DNA, nije pogodna za određivanje spola izrazito raspadnutih lešina dupina, ali je pogodna za određivanje spola na uzorcima biopsije.

Uvod

Otkrića na polju molekularne tehnologije u posljednjih nekoliko godina otvorila su novo poglavlje u populacijskoj biologiji. Molekularne metode kojima znanost danas raspolaže pružaju uvid u odnose između jedinki, populacija i vrsta (Haig 1998), te omogućavaju praćenje onih vrsta koje je vrlo teško pratiti u prirodi. Jedna od takvih vrsta je i posljednji jadranski morski sisavac – dobri

dupin (*Tursiops truncatus*). Procjenjuje se da je u Jadranu trajno nastanjeno oko 220 jedinki ove vrste dok ostale vrste dupina i kitova poput plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) ovdje borave samo povremeno. Podaci su utemeljeni na višegodišnjem promatranju životinja u prirodi i fotodokumentaciji sa terena (Gomerčić i sur. 1998).

Za istraživanje populacija određene vrste životinja nužni podaci o jedinkama uključuju poznavanje spola pojedine jedinke. Spol dupina određuje se morfološki na uginulim životinjama, no ponekad je truplo toliko raspadnuto ili se pronađu samo dijelovi trupla (ostaci kože ili kostiju), da takvim jedinkama nije moguće morfološki odrediti spol. Promatranjem dupina u prirodi također je gotovo nemoguće odrediti im spol budući da spolni dimorfizam kod njih nije izražen. Međutim modernim molekularnim analizama moguće je dobiti informacije o spolu jedinke iz minimalnih količina kožnih biopsija (Caldwell i sur. 2002), izmeta (Parsons 2001) pa čak i odbačene kože kitova (Valsecchi i sur. 1998).

Razvijeno je nekoliko metoda određivanja spola kod sisavaca koje se zasnivaju na lančanoj reakciji polimerazom (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction) (Fernando i Melnick 2001; Matsubara i sur. 2001; Nakahori i sur. 1991; Palsbøll i sur. 1992). Metoda koju sam upotrijebila zasnovana je na umnožavanju X-Y homologne regije za gen cinkova prsta (engl. zinc finger) (Bérubé i Palsbøll 1996). Autori su početnice dizajnirali prema slijedu regije kitova zubana, Odontoceti, i njihovu učinkovitost ispitali na nekoliko vrsta iz te skupine ali ne i na vrstama dobri i plavobijeli dupin. Korištene početnice su dizajnirane tako da jedna od tri prijanja samo slijedu specifičnom za genom mužjaka a druga za genom ženke, dok treća prijanja uz slijedove oba spola. Ta su dva slijeda dovoljno udaljena jedan od drugog tako da se produkti PCR reakcije razlikuju duljinom. Umnožavanjem kod uzoraka ženki dobiva se jedan PCR fragment duljine 383 baznih parova (bp), dok se umnožavanjem kod uzoraka mužjaka dobivaju dva fragmenta duljina 383 i 227 bp.

Cilj ovog istraživanja bio je uvesti u naš laboratorij molekularnu metodu određivanja spola koja bi se mogla primijeniti na uzorcima tkiva s izuzetno raspadnutih lešina i s nepotpunih lešina, kod kojih nije moguće odrediti spol morfološki, te na uzorcima biopsija uzetih sa živih životinja. Također sam pokušala procijeniti informativnost uzoraka mišićnog tkiva s lešina različitih stupnjeva raspadanja.

Materijali i metode

Tkivo. Uzorci tkiva sakupljeni su sa uginulih jedinki dobrog i plavobijelog dupina duž istočne jadranske obale u razdoblju od 1997. do 2002. godine. Svi su uzorci bili iz mišićnog tkiva osim jednog koji je uzet s kože dobrog dupina zajedno s masnim tkivom. Uzorci su čuvani u 96% etanolu na -20°C .

Izolacija ukupne DNA. Izolirala sam DNA metodom isoljavanja (Hoelzel 1998) gdje se visokom koncentracijom natrijevog klorida postiže taloženje denaturiranih proteina. Spomenuta metoda je sigurnija i brža od standardne izolacije fenol-kloroformom, a dobiveni izolat je zadovoljavajuće čistoće.

Lančana reakcija polimerazom (PCR). Za umnožavanje homolognih fragmenata na X i Y kromosomu upotrijebila sam tri oligonukleotidne početnice specifične za dio posljednjeg eksona ZFY/ZFX gena (Bérubé i Palsbøll 1996). Početnica ZFYX0582F prijanja uz slijed na oba kromosoma dok su ZFY0767R i ZFX0923R komplementarne slijedu na samo Y odnosno samo X kromosomu. PCR reakcija je provedena na GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) u 10 μl reakcijske smjese sastava 1xPCR pufer, 1.5mM MgCl_2 , 0.2mM dNTP, 0.5 μM svake početnice, 0.5% Tween20, 0.025U/ μl AmpliTaq Gold DNA polimeraze (Roche®) i 1 μl izolata DNA. Nakon denaturacije kalupa na 94°C 5 minuta uslijedili su 37 ciklusa amplifikacije: 60s na 94°C , 60s na 52°C i 90s na 72°C . Završno produljenje lanca provedeno je na 72°C 10 minuta.

Elektroforeza. Po 3 μl produkta PCR reakcije stavila sam na 1% agarozni gel koji je sadržavao 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ etidijevog bromida. Gel sam podvrgla elektroforezi na 90V kroz 40 minuta.

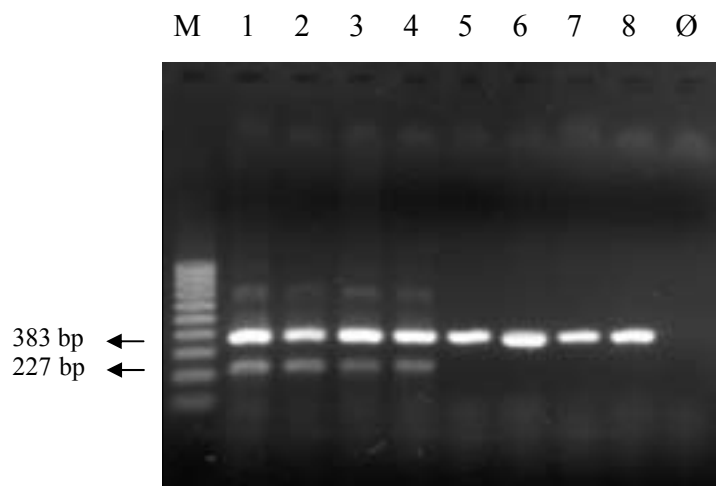
Rezultati

Uspješno sam odredila spol 22 od 28 jedinki dobrog te svih 9 jedinki plavobijelog dupina. Od toga, spol šest jedinki (četiri dobrog i dva plavobijelog dupina) mi je bio unaprijed poznat što sam iskoristila za utvrđivanje pouzdanosti metode i njezinu optimizaciju. Spol preostalih jedinki nije mi bio poznat već sam ga sama odredila, a svoje sam rezultate naknadno usporedila s podacima dobivenima morfološkim istraživanjima uginulih jedinki. U dva slučaja rezultati dobiveni metodom PCR nisu se podudarali s morfološkim podacima: PCR je pokazao mužjaka i ženku gdje je morfološki utvrđeno da se radilo o ženki i mužjaku. U četiri slučaja gdje su uzorci tkiva također bili u stanju truljenja nisam uspjela odrediti spol. Kad sam izolirala DNA iz kože s

pripadajućim masnim tkivom i izolat podvrgla PCR reakciji, elektroforeza je pokazala bogato umnožen fragment specifičan mužjaku. Uzorak je pripadao truplu tek uginulog dupina.

Primjer rezultata određivanja spola PCR-om, odnosno izgled gela nakon elektroforeze, prikazan je na slici 1. Fragment veličine 383 bp nastaje umnožavanjem pomoću ZFYX0582F i ZFX0923R početnica kod oba spola a fragment veličine 227 bp nastaje uz ZFYX0582F i ZFY0767R početnice samo kod mužjaka.

Fragmenti veličine oko 720 bp predstavljaju nespecifične produkte PCR reakcije koji su se javljali u nekim slučajevima ali nisu utjecali na određivanje spola.



Slika 1. Fotografija PCR-produkata nakon elektroforeze. M, DNA marker (100 bp Molecular Ruler, BIO-RAD; veličine fragmenata: od 100-1000 bp); Ø, negativna kontrola; 1-4, uzorci mužjaka; 5-8, uzorci ženki; 1,3,4,5,6,7, dobri dupin; 2 i 8, plavobijeli dupin

Rasprava

Uspješno umnožavanje kod istraživanih vrsta upućuje na zaključak visoke konzerviranosti ZFY/ZFX slijeda unutar skupine Odontoceti. Međutim, primijećeno je redovito slabije umnožavanje fragmenta od 227 bp u odnosu na fragment duljine 383 bp. Ono bi moglo biti uzrokovano razlikom između primijenjene i izračunate optimalne temperature prijanjanja početnica uz kalup (Hoelzel 1998) koja za ZFY0767R iznosi 49°C a za ZFX0923R i ZFYX0582F 55°C. Moguće je da je na temperaturi od 52°C, pri kojoj se provodilo prijanjanje, vezivanje ZFY0767R početnice bilo otežano, što je rezultiralo slabijim umnožavanjem. Slabiji intenzitet pruge na 227 bp mogla bi uzrokovati i nepotpuna komplementarnost kalupa i

ZFY0767R početnice te bi daljnje istraživanje u ovom smjeru zahtijevalo određivanje nukleotidnog slijeda gena za cinkov prst spomenutih vrsta.

Četiri uzorka tkiva iz kojih nisam uspjela odrediti spol jedinki pripadala su truplima u uznapredovanom stanju truljenja pa smatram da je DNA bila previše degradirana da bi se umnožili fragmenti potrebne duljine. U jednakom stanju je bilo i tkivo u dva slučaja gdje je spol pogrešno određen. U oba slučaja sam produkte uspjela dobiti samo jednom iako sam izolaciju DNA i PCR reakciju ponovila najmanje dva puta s oba uzorka. Pritom su se umnoženi fragmenti jedva vidjeli na gelu, te stoga smatram da su rezultat kontaminacije drugim uzorcima prilikom pripreme reakcijske smjese. U jedinom slučaju gdje sam DNA izolirala iz kože tek uginulog dupina, dakle tkivo je bilo u dobrom stanju, reakcija je bila vrlo uspješna i potvrdila je mužjaka. Stoga zaključujem da je upotrijebljena metoda pogodna za primjenu na uzorcima biopsije, no nije učinkovita za određivanje spola iz uzoraka s lešina visokog stupnja raspadanja.

Iako je opisana metoda (Bérubé i Palsbøll 1996) razvijena za određivanje spola u nekih vrsta kitova zubana, nije mi poznato iz literature da je dosad korištena za spolno određivanje u dobrog i plavobijelog dupina. Ovo istraživanje je pokazalo da je metoda sasvim primjenjiva i na navedene vrste.

Poznavanje spolne strukture populacija dobrog i plavobijelog dupina samo je dio ukupne populacijske slike koja se može dobiti analizom tkivnih uzoraka i korak je bliže očuvanju i zaštiti posljednjih morskih sisavaca u Jadranu.

Zahvale

Rad je izrađen u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta "Zdravstvene i ostale biološke osobitosti sisavaca Jadranskog mora" (053317, glavni istraživač H.Gomerčić) Ministarstva znanosti i tehnologije R.Hrvatske i uz Dopuštenje Ministarstva zaštite okoliša i prostornog uređenja R.Hrvatske, te uz financijsku pomoć Gesellschaft zur Rettung der Delphine e. V. iz Münchena. Hvala dr. Hrvoju Gomerčić kao i svim sudionicima projekta koji su pribavljanjem tkivnih uzoraka omogućili istraživanje i nastanak ovog rada.

Ani Galov i Ivni Tomašković hvala na korisnim savjetima, nesebičnoj pomoći i beskrajnoj strpljivosti prilikom izrade ovog rada.

Rad je napravljen u laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

Literatura

- Bérubé M & Palsbøll P (1996) Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology*, **5**, 283-287.
- Caldwell M, Gaines MS, Hughes CR (2002) Eight polymorphic microsatellite loci for bottlenose dolphin and other cetacean species. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 393-395.
- Fernando P & Melnick DJ (2001) Molecular sexing eutherian mammals. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 350-353.
- Gomerčić H, Huber Đ, Mihelić D, Lučić H, Gomerčić T, Đuras M (2002) Estimation of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) population in the Croatian part of the Adriatic Sea. U: 9th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and adjacent Regions, The Hellenic Zoological Society, 2002: 43
- Haig SM (1998) Molecular contributions to conservation. *Ecology*, **79**, 413-425.
- Hoelzel AR (1998) *Molecular Genetic Analysis of Populations*. Oxford University Press, Oxford,
- Matsubara K, Ishibashi Y, Ohdachi S, Matsuda Y (2001) A new primer set for sex identification in the genus *Sorex* (Soricidae, Insectivora). *Molecular Ecology Notes*, **1**, 241-242
- Nakahori Y, Hamano K, Iwaya M, Nagakome Y (1991) Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *American Journal of Medical Genetics*, **39**, 472-473.
- Palsbøll PJ, Vader A, Bakke I, El-Gewely MR (1992) Gender determination in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Zoology*, **70**, 2166-2170.
- Parsons KM (2001) Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 341-344.
- Valsecchi E, Glockner-Ferrari D, Ferrari M (1998) Molecular analysis of the efficiency of sloughed skin sampling in whale population genetics. *Molecular Ecology*, **7**, 1419-1422.