

VETERINARSKI FAKULTET
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

Tanja Cafuk

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

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2011.

**ZAVOD ZA BIOLOGIJU
VETERINARSKI FAKULTET, Sveučilište u Zagrebu**

Mentori: Dr. sc. Tomislav Gomerčić
Doc. dr. sc. Martina Đuras Gomerčić

Povjerenstvo za ocjenu diplomskog rada:

1. Dr. sc. Tomislav Gomerčić
2. Doc. dr. sc. Martina Đuras Gomerčić
3. Doc. dr. sc. Hrvoje Lucić

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biologiju pod vodstvom dr. sc. Tomislava Gomerčića u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske "Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu" (053-0533406-3640). Rad je temeljen na studentskom znanstvenom radu **Određivanje spola sredozemne medvjedice (*Monachus monachus*) metodom lančanom reakcijom polimerazom** koji je nagrađen Rektorovom nagradom akademske godine 2009./2010.

Sadržaj

Uvod	5
Materijali i metode	9
Rezultati	12
Rasprava	14
Zaključci	15
Zahvala	16
Literatura	17
Sažetak	19
Abstract	20
Životopis	21

Uvod

Sredozemna medvjedica (morski čovik, morsko tele ili Adrijana), jedini je tuljan Sredozemlja. Nekada je bila redoviti stanovnik čitavog hrvatskog dijela jadranske obale i otoka, a u današnje doba jedna je od najrjeđih i najugroženijih životinjskih vrsta na svijetu, pa ju je u hrvatskom dijelu Jadrana moguće susresti samo ponekad (GOMERČIĆ, 1998a.). Populacija je bila samородna vjerojatno do kraja 1960-tih godina (ANTICA, 1999.), a posljednje poznato stanište sredozemne medvjedice u Jadranu bilo je u blizini otoka Paga. Od godine 1992. se smatra da više ne živi u Jadranu (GOMERČIĆ i sur., 2006.). Razlozi ugroženosti populacije u prošlosti uglavnom su bili ribari koji su je masovno ubijali zbog uništavanja ribarskih mreža, a u novije doba urbanizacija obale.



Slika 1.- Sredozemna medvjedica (*Monachus monachus*)

Sistematika:

Regnum (carstvo)- ANIMALIA –životinje

Phyllum (koljeno)- CHORDATA – svitkovci

Subphyllum (potkoljeno)- VERTEBRATA –kralježnjaci

Classis (razred)- MAMMALIA- sisavci

Ordo (red)- CARNIVORA- zvijeri (vodene)

Subordo (podred)- PINNIPEDIA- perajari

Familia (porodica)- PHOCIDAE- pravi tuljani

Genus (rod)- MONACHUS- morske medvjedice

Species (vrsta)- monachus- sredozemna medvjedica

- schauinsland- havajska

- tropicalis- karipska (izumrla!)

Sredozemna je medvjedica prvi puta znanstveno opisana 1779. godine na temelju lešine pronađene kod Osora na otoku Cresu.

Rađaju se sa oko 80 cm dužine, a u odrasloj dobi mogu doseći oko 2,40 metara. Ženke su nešto lakše, a mužjaci mogu imati i do 320 kilograma kada odrastu. Krzno im je crno (mužjaci i mladunčad) ili smeđe do tamno sivo (ženke) sa svjetlijim trbuhom koji je kod mužjaka gotovo bijele boje. Spolnu zrelost dosežu u dobi od 4 godine, a očekivani životni vijek im je dvadesetak godina.

Ženka koti jedno mlado svake druge godine te ga doji do tri mjeseca starosti. Za okot traži nepristupačnu špilju mirnijeg dijela obale na kojem boravi. Hranidba im se pretežno sastoji od glavonožaca i riba. Živi u izoliranim skupinama od 5 do 7 jedinki.

Dobro je prilagođena životu u moru i na njoj se, za razliku od kitova, još uvijek mogu vrlo dobro uočiti karakteristike kopnenih predaka poput nogu oblikovanih u peraje.



Slika 2.- Sredozemna medvjedica (*Monachus monachus*)

Jedini poznati uzorci tkiva sredozemnih medvjedica koje potječu iz hrvatskog dijela Jadranskog mora su dvije lubanje koje su kranimetrijski i opisane (GOMERČIĆ i HUBER, 1989.; GOMERČIĆ i sur., 2009.) te uzorak tkiva mišića, kože i kosti od lešine pronađene 2008. godine na otoku Lopudu. Svi su uzorci pohranjeni u zbirci tkiva na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

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

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

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

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

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

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

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

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

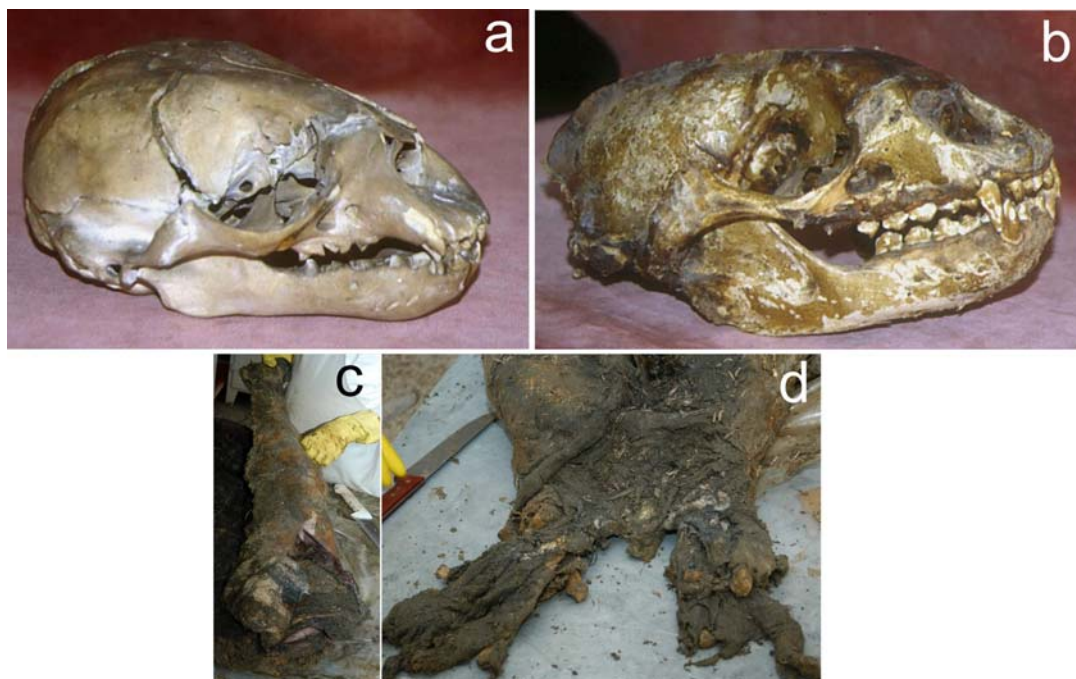
Materijali i metode

U radu sam koristila uzorke od tri različite jedinke sredozemne medvjedice stradale u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Od dvije sredozemne medvjedice (SM1 i SM2) jedino su sačuvane lubanje, dok je od treće sredozemne medvjedice (SM3) sačuvan jedan članak prsta i uzorak vrlo trulog mišića i kože. Svi su uzorci pohranjeni u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilište u Zagrebu.

Lubanja SM1 (Slika 3a., Tablica 1.) pripadala je muškoj životinji, staroj oko 2 mjeseca i teškoj oko 80 kg, ubijenoj u vodama otoka Visa vjerojatno 1978. godine (GOMERČIĆ i HUBER, 1989). Na njoj nije bilo nikakvih ostataka mekih tkiva.

Lubanja SM2 (Slika 3b., Tablica 1.) pronađena je u Komizi 1964. godine, a najvjerojatnije je ubijena od ribara na otoku Biševu kraj Visa. Pripadala je odrasloj životinji nepoznatog spola. Na lubanji se nalazi sasušenog mekog tkiva.

Uzorak SM3 (Slika 3c. i 1d., Tablica 1.) je uzet od lešine sredozemne medvjedice pronađene 10. studenog 2008. godine nasukane u uvali Šunj na otoku Lopudu. Truplo je bilo bez vrata i glave, jako trulo, koža je potpuno macerirana, bez ikakvih utrobnih organa. U sklopu rutinskih pretraga lešina morskih sisavaca na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilište u Zagrebu, sačuvane su i pohranjen je jedan članak prsta i uzorak mišića s kožom u 96% alkoholu i smrznut na -20 C.



Slika 3. a) lubanja sredozemne medvjedice (SM1) iz 1978. s otoka Biševa;
 b) lubanja sredozemne medvjedice (SM2) iz 1964. sa otoka Visa; c) i d) truplo sredozemne medvjedice (SM3) pronađeno 2008. godine na otoku Lopudu

U radu sam koristila još i uzorke tkiva mišića drugih životinja poznatog spola za kontrolu PCR reakcije te usporedbu i to dvije ženke psa, jedne ženke mačke, jednog muškog psa, vuka i čunjastog tuljana (Tablica 1.). Ovi uzorci se čuvaju u banci tkiva u Zavodu za biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 1. Popis korištenih uzoraka

Oznaka uzorka	Vrsta jedinke	spol životinje	od kuda je izolirana DNA	Godina pronalaska	Mjesto pronalaska
SM1	sredozemna medvjedica	mužjak	korijen zuba i zubna alveola	1978.	otok Biševo
SM2	sredozemna medvjedica	nepoznat	korijen zuba	1964.	otok Vis, Komiža
SM3	sredozemna medvjedica	nepoznat	članak prsta	2008.	otok Lopud
pas1	pas	ženka	mišić		
pas2	pas	ženka	mišić		
mačka	mačka	ženka	mišić		
pas3	pas	mužjak	mišić		
vuk	vuk	mužjak	mišić		
tuljan	čunjasti tuljan	mužjak	mišić		

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

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

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

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

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

Tablica 2. Sastav zajedničke reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom

reagens	početna koncentracija	konačna koncentracija	volumen za jednu reakciju
Smjesa početnica *	10 X (2 µM)	0.2 µM**	0.7
Multiplex master mix	2 X	0.42 X	1.5
DNA kalup			1
H ₂ O, deionizirana			3.8
Ukupni volumen			7

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

**Odnosi se na koncentraciju svake početnice.

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

Tablica 3. Reakcijski uvjeti lančane reakcije polimerazom

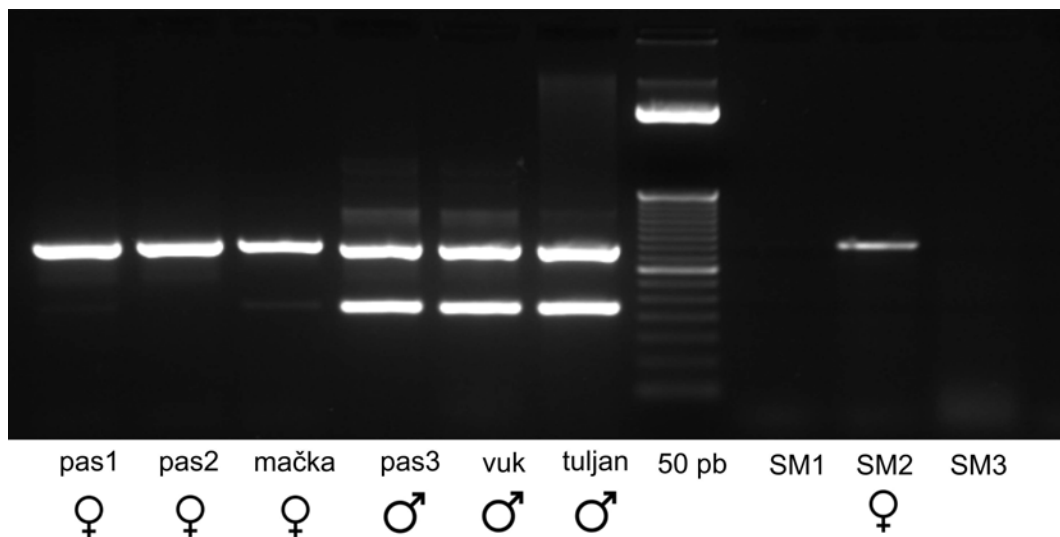
	Temperatura (°C)	Vrijeme	} 35 i 45 ciklusa
Aktivacija polimeraze	95	15 min	
Denaturacija kalupa	94	30 s	
Prianjanje početnica	48	90 s	
Produženje lanca	72	90 s	
Završno produženje	72	10 min	

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

Rezultati

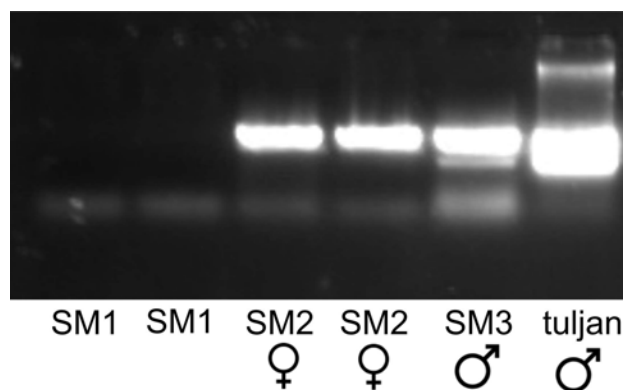
Elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu dobiveni su PCR fragmenti različite veličine. Kod mužjaka vidljiva su dva fragmenta od 224 i 445 parova baza (bp), a kod ženki samo jedan od 445 bp.

U prvoj PCR reakciji (Slika 4.) sa 35 ciklusa kod svih kontrolnih uzoraka psa, mačke, vuka i tuljana kod kojih je DNA izolirana iz svježeg mišića koji je bio čuvan u 96% alkoholu na -20 C dobiveni su lijepo jasno vidljivi jedan ili dva PCR fragmenta, ovisno o spolu životinje. Dok se kod uzorka sredozemne medvjedice SM2 slabije ističe jedan PCR produkt od 445 bp, kod uzorka SM1 i SM3 nisam dobila PCR produkt.



Slika 4. Prikaz gela sa PCR produktima nakon elektroforeze, 35 ciklusa u PCR reakciji

U drugoj PCR reakciji zbog povećanja broja ciklusa na 45, uzorak čunjastog tuljana ima jači intenzitet fluoresciranja fragmenata. Ovdje se zapravo radi o 2 fragmenta što potvrđuje da je uzorak pripadao jedinki muškog spola. U ovoj PCR reakciji sam i pored PCR produkta od uzorka SM2 koji potvrđuje da je SM2 ženka, dobila i dva PCR produkt od uzorka SM3 i time utvrdila da je sredozemna medvjedica SM3 bila muškog spola (Slika 5.). Primjećuje se da je kraći fragment od 224 bp slabijeg intenziteta. Uzorak SM1 ni u ovoj PCR reakciji nije dao nikakav produkt.



Slika 5. Prikaz gela sa PCR produktima nakon elektroforeze, 45 ciklusa u PCR reakciji

Rasprava

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

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

U ovom radu su korišteni muzejski primjerci strogo zaštićene i jedne od najugroženijih životinjskih vrsta na zemlji. Zbog toga su bilo kakvi podaci o ovoj vrsti vrlo dragocjeni i teško je do njih doći. Zbog toga je ova molekularna metoda određivanja značajna jer je neinvazivna, tj. mogu se koristiti bilo koji uzorci koji sadrže DNA a da se ne ometa sama životinja, na primjer izmet i dlaka životinje koje bi se mogle naći u njihovom staništu.

Zaključci

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

Zahvala

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

Posebno zahvaljujem mentorima dr. sc. Tomislavu Gomerčiću i doc.dr.sc. Martini Đuras Gomerčić na velikoj pomoći tijekom cjelokupne izrade ovog rada.

Na kraju najveća zahvala cijeloj mojoj obitelji i svim dragim prijateljima i kolegama koji su bili tu svih ovih godina, na ovaj ili onaj način.

Literatura

- AASEN, E., J. F. MEDRANO (1990.): Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8, 1279-1281.
- ANTICA, G. (1999.): Stanje sredozemne medvjedice u hrvatskom dijelu Jadrana. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu. Zagreb.
- BÉRUBÉ, M., P. PALSBOÏLL (1996.): Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology* 5, 283-287.
- FAIN, S. R., J. P. LEMAY (1995.): Gender identification of humans and mammalian wildlife species from PCR amplified sex-linked genes. *Proceedings of American Academy of Forensic Sciences*.
- GILSON, A., M. SYVANEN, K. LEVINE, J. BANKS (1998.): Deer gender determination by polymerase chain reaction: validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *Fish and Game* 84, 159-169.
- GOMERČIĆ, H. (1998.): Čovjek je njezin (ne)prijatelj. *Eurocity* (1330-0555) 1998 (1998), 2: 31-33.
- GOMERČIĆ, H. (1998.): Zaštita morskih sisavaca – etičko i racionalno pitanje. *Etika u odnosu čovjeka i životinja*, 51-73.
- GOMERČIĆ, H., ĐURAS GOMERČIĆ, M., GOMERČIĆ, T., HUBER, Đ., GOMERČIĆ, V. (2006.): Sredozemna medvjedica se ponovno pojavila u sjevernom Jadranu? II. znanstveni skup Prirodoslovna istraživanja riječkog područja : Knjiga sažetaka / 2006. 96-96.
- GOMERČIĆ, H., HUBER, Đ. (1989.): Craniometric characteristics of the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) from the Adriatic Sea. *Period. biol.* 91, 132.
- GOMERČIĆ, T., FARKAŠ, V., ĐURAS GOMERČIĆ, M., HUBER, Đ. GOMERČIĆ, H. (2009): Cranial morphometry of adult Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) from the Adriatic sea. In: *Proceedings of the International Scientific Meeting of Anatomy and Physiology Fundamentals of Medicine*. Zagreb. 12-13

June 2009. (Mihelić, D., M. Šimpraga, S. Tkalcic, urednici). Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. 120-128.

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

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

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

SINDIČIĆ, M. (2005.): Određivanje spola smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*) metodom lančane reakcije polimerazom. Studentski znanstveni rad.

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

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

Tanja Cafuk

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

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

SAŽETAK

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

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

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

ABSTRACT

The Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*) is the only seal species that inhabits Mediterranean Sea and one of the most endangered animal species of the world. Once found throughout Croatian part of the Adriatic Sea, the Mediterranean monk seal is considered extinct since 1992, although some individuals from the neighbouring populations enter the Adriatic Sea and stay there temporarily. Conservation of a population in a certain habitat relies strongly on the understanding of the population structure. Any kind of data considering the highly endangered Mediterranean monk seal contributes to a better understanding of the species biology. In this study polymerase chain reaction (PCR) has been applied to identify sex from the bone tissue samples. Genome DNA has been extracted from 2 museum monk seal skulls and one from a phalanx. Six other mammals of different species and of known sex have been used as control samples. With the four oligonucleotide primers, used in the PCR, fragments (445 bp and 224 bp) of different length have been obtained. Primers were used to simultaneously amplify a part of the *sry* gene located on the Y chromosome which exists only in males, and control regions of ZFX/ZFY, which exist in males and females. The sex of 2 monk seal samples has been successfully determined, while sex determination of one sample failed.

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

Životopis

Rođena sam 14.7.1984. godine u Varaždinu. Nakon osnovne škole upisala sam srednju veterinarsku školu Arboretum Opeka u Vinici koju završavam 2003. godine te sam nakon toga upisala Veterinarski fakultet.

Tijekom studiranja sudjelovala sam u mnogobrojnim grupnim razmjenama studenata veterine, organiziranih od Međunarodnog udruženja studenata veterine (IVSA-Hrvatska). Od 2004. do 2008. godine bila sam demonstrator na Zavodu za biologiju.

Godine 2008. dobila sam CEEPUS stipendiju u trajanju od mjesec dana koju sam odradila na Klinici za internu Veterinarskog fakulteta u Wrocławu, Poljska.

Sudjelovala sam na studentskim znanstvenim kongresima te sam u slobodno vrijeme volontirala u nekoliko veterinarskih ambulanti.

Napisala sam jedan studentski znanstveni rad koji je nagrađen Rektorovom nagradom.