

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana-Marija Sulić

**Određivanje spola nekih vrsta kitova (Cetacea)
umnažanjem dijela gena *sry***

Diplomski rad

Zagreb, 2004. godina

Ovaj rad, izrađen u laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, pod vodstvom prof. dr. sc. Hrvoja Gomerčića i doc. dr. sc. Zorana Tadića, u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta "Zdravstvene i ostale biološke osobitosti sisavaca Jadranskog mora" (0053317, glavni istraživač H. Gomerčić) Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske i uz Dopuštenje Ministarstva zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva Republike Hrvatske, te uz financijsku pomoć Gesellschaft zur Rettung der Delphine e. V. (GRD) iz Münchena, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Određivanje spola nekih vrsta kitova (Cetacea) umnažanjem dijela gena *sry*

Ana-Marija Sulić
Zavod za animalnu fiziologiju, Rooseveltov trg 6, Zagreb
Prirodoslovno-matematički fakultet

SAŽETAK

Pri istraživanju biologije kitova često se nailazi na probleme prilikom prikupljanja informacija. Promatranjem jedinke u prirodi je iznimno teško odrediti njezin spol jer većina vrsta kitova nema izražen spolni dimorfizam. Ponekad čak ni na mrtvoj jedinki određivanje spola nije moguće zbog raspadanja tkiva. Ovim istraživanjem pokušalo se uvesti pouzdanu, brzu i jednostavnu molekularnu metodu kojom bi se određivao spol kitova na uzorcima tkiva uzetih s lešina, kao i na biopsatima kože. Ukupna DNA je izolirana iz tkiva 48 lešina različitih stupnjeva raspadanja: 29 dobrih dupina (*Tursiops truncatus*), 9 plavobijelih dupina (*Stenella coeruleoalba*), 6 glavatih dupina (*Grampus griseus*), 2 krupnozuba dupina (*Ziphius cavirostris*) i 2 velika sjeverna kita (*Balaenoptera physalus*). Jedan uzorak je bio biopsat kože žive jedinke dobrog dupina. Lančanom reakcijom polimerazom uz četiri oligonukleotidne početnice je umnožen dio gena *sry* na Y kromosomu uz umnožavanje kontrolne regije, gena *ZFX/ZFY*, na X i Y kromosomima. Umnoženi fragmenti, različite duljine i specifični za spol, su razdvajani na 1% agaroznom gelu. Uspješno je određen spol 37 jedinki. Metoda se pokazala pouzdanom i primjenjivom na potpuno svježim i relativno dobro očuvanim tkivima, ali nije pogodna u slučajevima vrlo raspadnutog tkiva.

(27 stranica, 8 slika, 4 tablice, 47 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: Cetacea, *sry*, lančana reakcija polimerazom, određivanje spola

Voditelj: Hrvoje Gomerčić, prof. dr. sc.
Suvoditelj: Zoran Tadić, doc. dr. sc.
Pomoćni voditelj: Ana Galov, mr. sc.

Ocjenitelji: Zoran Tadić, doc. dr. sc.
Hrvoje Gomerčić, prof. dr. sc.
Tatjana Bakran-Petricioli, doc. dr. sc.
Zlatko Liber, doc. dr. sc.

Rad prihvaćen 5. srpnja 2004.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Sex determination in some cetacean species by amplification of a part of the *sry* gene

Ana-Marija Sulić
Department of Animal Physiology, Rooseveltov trg 6, Zagreb
Faculty of Science

ABSTRACT

Investigations of cetacean biology often encounter problems in obtaining information. Determining the gender of living cetaceans is very difficult since in most species sexually dimorphic characters are poorly marked. Sometimes it is not even possible to morphologically determine sex of a dead animal due to its advanced state of decomposition. The purpose of this study was to introduce a reliable, fast and simple method for molecular sexing of cetaceans that could be used on tissue samples from carcasses, as well as on skin biopsies from living animals. Total DNA was extracted from tissues of 48 cetacean carcasses; 29 bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), 9 striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), 6 Risso's dolphins (*Grampus griseus*), 2 Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*) and 2 fin whales (*Balaenoptera physalus*). One sample was a skin biopsy from a living bottlenose dolphin. The introduced method uses polymerase chain reaction (PCR) and four oligonucleotide primers to simultaneously amplify a part of the *sry* gene located on the Y chromosome and regions of ZFX/ZFY, gene located on Y and X chromosomes, respectively. Amplification products differed in length and therefore gave distinct, sex-specific bands on 1% agarose gel after electrophoresis. The sex of 37 cetacean specimens was successfully determined. Method was shown to be reliable and efficient when applied on fresh or relatively well preserved samples, but failed in cases of strongly decomposed tissues.

(27 pages, 8 figures, 4 tables, 47 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in Central biological library.

Key words: Cetacea, *sry*, polymerase chain reaction, sex determination

Supervisor: Hrvoje Gomerčić, prof. dr. sc.

Co-supervisor: Zoran Tadić, doc. dr. sc.

Helping supervisor: Ana Galov, mr. sc.

Reviewers: Zoran Tadić, doc. dr. sc.

Hrvoje Gomerčić, prof. dr. sc.

Tatjana Bakran-Petricioli, doc. dr. sc.

Zlatko Liber, doc. dr. sc.

Thesis accepted: July 5, 2004.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Spolna diferencijacija sisavaca	1
1.1.1. Građa i uloga Y kromosoma	2
1.2. Gen <i>sry</i>.....	4
1.3. Kitovi (Cetacea).....	5
1.4. Metode određivanje spola.....	6
1.4.1. Određivanja spola kod kitova.....	7
1.5. Cilj rada	10

2. MATERIJAL I METODE

2.1. MATERIJAL.....	11
2.1.1. Standardne kemikalije	11
2.1.2. Otopine	11
2.1.3. Materijal za umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom.....	11
2.1.4. Tkivo kitova	12
2.1.5. Izolirana DNA.....	12
2.2. METODE	13
2.2.1. Sterilizacija materijala i pribora	13
2.2.2. Izolacija genomske DNA iz tkiva kitova	13
2.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	14
2.2.4. Elektroforeza	15

3. REZULTATI

3.1. Određivanje spola	17
3.2. Provjera specifičnosti početnica za druge vrste	19

4. RASPRAVA	20
--------------------------	-----------

5. ZAKLJUČAK.....	22
--------------------------	-----------

6. LITERATURA.....	23
---------------------------	-----------

KRATICE

DNA = deoksiribonukleinska kiselina

HMG = grupa visoke pokretljivosti

ORF = otvoreni okvir čitanja

PAR = pseudoautosomalna regija

PCR = lančana reakcija polimerazom

TDF = faktor koji određuje sjemenike

1.1. Spolna diferencijacija u sisavaca

Spol jedinke je kod većine kralježnjaka i beskralježnjaka određen kromosomskim ustrojem same jedinke. No kod nekih vrsta glavnu ulogu u spolnoj diferencijaciji imaju vanjski faktori, kao što su temperatura okoliša i vanjska primjena steroida. Takav slučaj nalazimo kod nekih vrsta riba, vodozemaca i gmazova. Te vrste su stoga osjetljive i na razne otpadne tvari, poput kadmija i raznih fenolnih derivata, koje mogu značajno utjecati na spolnu determinaciju i diferencijaciju jedinke u razvoju (Uguz i sur., 2003). Nedavna istraživanja su također pokazala da ptice možda mogu utjecati na spol svojih potomaka iako mehanizmi tog procesa još nisu poznati (Pike i Petrie, 2003).

Uloga kromosoma u spolnoj diferencijaciji je otkrivena na kukcima (McClung, 1902; Wilson, 1905; Morgan, 1910). U vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) spol je određen brojem X kromosoma, bez obzira na prisutnost Y kromosoma. Tako će se ženka razviti iz embrija s dva X kromosoma (XX ili XXY), a mužjak iz embrija s jednim X kromosomom (XY ili X0) (Bridges, 1914).

Kod kralježnjaka postoje dva gonosomalna sustava: XX/XY i ZZ/ZW. Kod sisavaca se javlja XX/XY sustav u kojem heteromorfni par kromosoma (XY) imaju mužjaci, a homomorfni par (XX) ženke, dok se kod ptica javlja ZZ/ZW sustav u kojem ženke imaju heteromorfni par (ZW), a mužjaci homomorfni (ZZ). Gmazovi, vodozemci i ribe mogu imati bilo koji od ta dva sustava ovisno o vrsti.

Spolna diferencijacija u sisavaca je uređeni proces koji se sastoji od nekoliko koraka: određivanja genetskog ili kromosomskog spola, zatim gonadalnog ili primarnog spola i na kraju fenotipskog ili somatskog spola. Cijeli proces započinje oplodnjom kojom je određen genetski spol, ženski, ako se jajna stanica spojila sa spermijem koji nosi X kromosom, ili muški, ako se spojila sa spermijem koji nosi Y kromosom. Gonadni spol je u sisavaca programiran da se razvije u ženski spolni sustav, ali u prisutnosti Y kromosoma razvit će se muški spolni sustav. Nakon razvoja gonada slijedi fenotipska spolna diferencijacija koja traje sve do puberteta (Nagai, 1992).

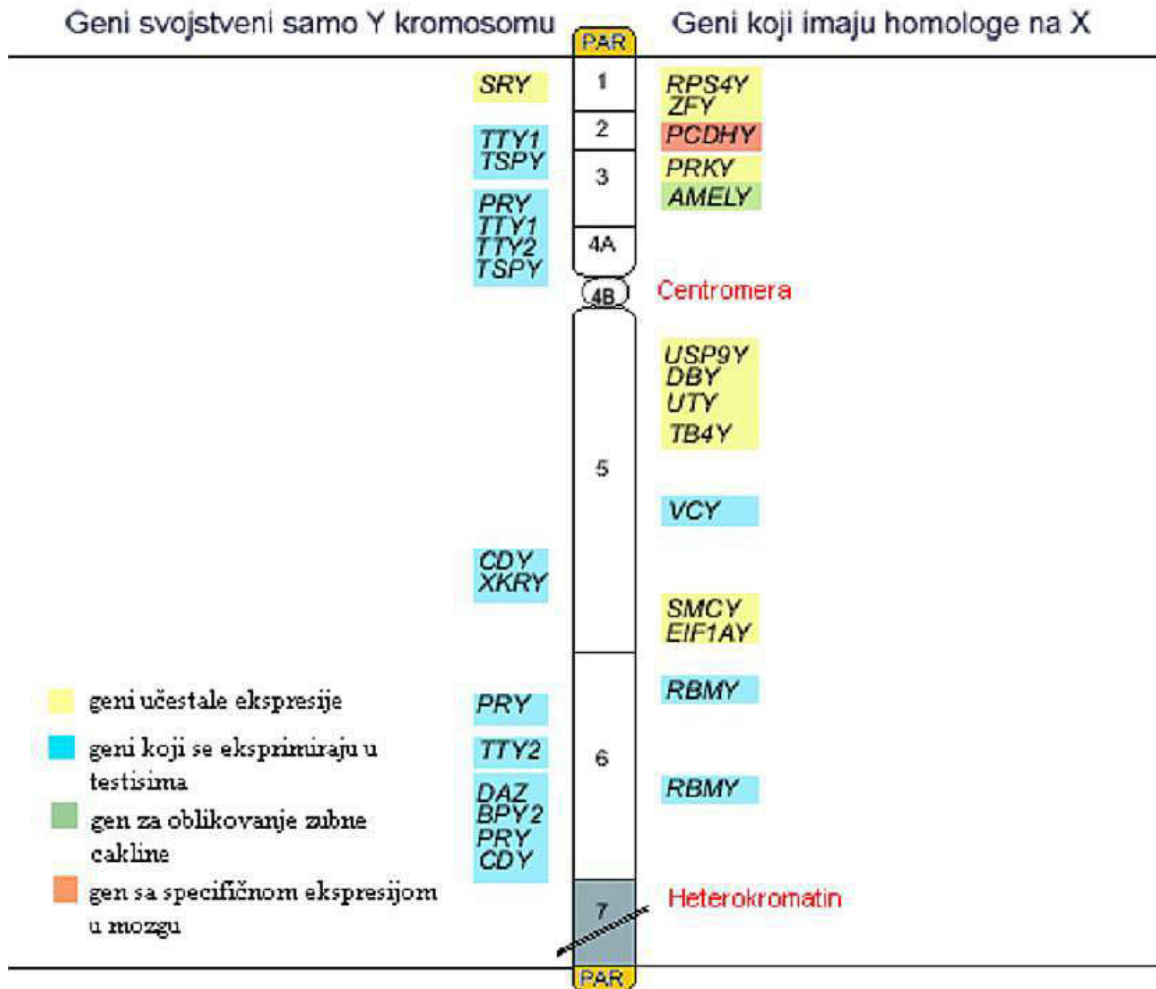
1.1.1. Građa i uloga Y kromosoma

Kromosom Y je najmanji kromosom ljudskog genoma. Dug je oko 60 Mb i čini 2% haploidnog genoma. Sastoji se od pseudoautosomalnog područja koje je podijeljeno na dva dijela (PAR1 i PAR2) i eukromatinskog i heterokromatinskog područja.

PAR1 se nalazi u terminalnoj regiji kraćeg kraka (Yp), a PAR2 na vrhu dugog kraka (Yq). Ta područja su homologna dijelovima X kromosoma i odgovorna za točno sparivanje X i Y kromosoma tijekom mejoze u muškim spolnim stanicama, a geni koji se nalaze u tom području se nasljeđuju na isti način kao i autosomalni geni. Eukromatinsko područje zauzima cijeli kraći krak, centromeru i proksimalni dio dugog kraka, dok heterokromatinsko područje zauzima distalni dio dugog kraka. To područje je polimorfno u duljini kod različitih populacija mužjaka (Quintana-Murci i Fellous, 2001) i smatra se da je genetički inertno, iako je kod vinske mušice u tom području otkriveno više gena (Carvalho i sur., 2000).

PAR čini svega 5% Y kromosoma, dok ostalih 95% čini nerekombinirajuća regija (NRY, eng. non-recombining region of Y). Jednu trećinu eukromatina te regije čine visokoponavljajuće sekvence (Tilford i sur., 2001). Više od 20 aktivnih gena ili skupina gena otkivenih u NRY se može podijeliti u dvije skupine. Prva skupina su geni koji imaju ekspresiju u mnogim tkivima i njihovi homolozi na X kromosomu nisu podložni inaktivaciji X kromosoma kod ženki. U drugu skupina ulaze geni koji imaju testis-specifičnu funkciju, gotovo su svi prisutni u višestrukim kopijama i nemaju homologe na X kromosomu (Bachtrog i Charlesworth, 2001) (Slika 1.1).

Na Y kromosomu u području eukromatinske regije kratkog kraka se kod ljudi nalazi faktor koji određuje sjemenike (TDF, eng. testis-determining factor). TDF je odgovoran za razvoj testisa iz indiferentne embrionalne gonade. Ako nema TDF-a razvit će se jajnici. Gen za koji se danas smatra da je TDF je *sry*.



Slika 1.1. Shematski prikaz ljudskog kromosoma Y. Prikazani su položaji gena u nekodirajućoj regiji (NRY). Heterokromatinsko područje je označeno sivom bojom. (preuzeto od Bachtrog i Charlesworth, 2001)

1.2. Gen *sry*

Gen *sry* (eng. sex-determining region Y) se nalazi na kraćem kraku kromosoma Y, u blizini pseudoautosomalne regije (Sinclair i sur.,1990). Visoko je konzerviran i nalazimo ga kod velikog broja sisavaca. Homologe gena *sry* nalazimo i kod ostalih kralježnjaka ali čini se da kod njih nema specifičnu ulogu u razvoju testisa (Sinclair, 1998). *Sry* nema introna, osim kod jedne vrste tobolčara (O'Neill i sur., 1998), a sastavljen je od tri domene različitih funkcija i svojstava. Gen ima dva promotora i dva otvorena okvira čitanja (ORF, eng. open reading frame) od kojih onaj duži kodira slijed od 204 aminokiseline. Unutar te regije je otkriven motiv koji je homologan proteinu Mc koji ima ulogu u određivanju tipa parenja kod *Schizosaccharomyces pombe* i konzerviranom DNA-vežućem motivu prisutnom u jezgrinim nehistskim proteinima HMG (eng. high mobility group) (Sinclair i sur., 1990). Ta regija gena *sry* je nazvana HMG kutija (eng. HMG box) i konzervirana je kod većine vrsta (Slika 1.2), dok su područja N-terminalno i C-terminalno od te domene vrlo različita čak i kod blisko srodnih vrsta (Hacker i sur., 1995).

```

      10          20          30          40          50          60
      |          |          |          |          |          |
MQSYASAMLS VFNSDDYSPA VQENIPALRR SSSFLCTESC NSKYQCETGE NSKGNVQDRV

      70          80          90          100         110         120
      |          |          |          |          |          |
KRPMNAFIVW SRDQRRKMAL ENPRMRNSEI SKQLGYQWKM LTEAEKWPFQ QEAQKLQAMH

      130         140         150         160         170         180
      |          |          |          |          |          |
REKYPNYKYR PRRKAKMLPK NCSLLPADPA SVLCSEVQLD NRLYRDDCTK ATHSRMEHQL

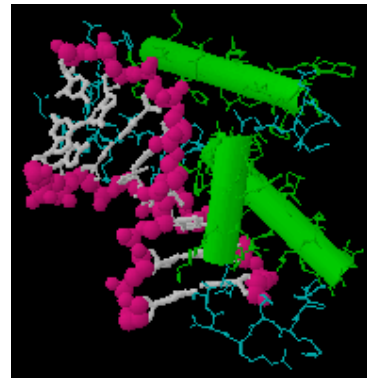
      190         200
      |          |
GHLPPINAAS SPQQRDRYSH WTKL

```

Slika 1.2. Proteinska sekvenca ljudskog gena *sry*. Slijed od 60 do 128 aminokiseline označen zelenom bojom je HMG kutija. Sekvenca dobivena iz National Center for Biotechnology Information (NCBI).

HMG kutije su DNA vežuci proteini koje nalazimo u proteinima kromatina, transkripcijskim faktorima jezgrinih i mitohondrijskih RNA polimeraza i genski i tkivno specifičnih transkripcijskih regulatora. HMG kutija gena *sry* se veže za DNA koja sadrži specifičnu

sekvencu AACAAAG i savija je pod kutem od 90° (Slika 1.3). To ima višestruku funkciju, kao što je smatanje DNA u kromatin ili savijanje segmenata DNA s vezanim transkripcijskim faktorima u produktivne komplekse (Ferrari i sur., 1992). Za *sry* se smatra da je glavni gen u kaskadi determinacije testisa te vjerojatno savijanjem DNA utječe na transkripciju ciljnih gena u kaskadi.



Slika 1.3. Interakcija *sry* i DNA. *Sry* (zeleno) se veže za DNA (ružičasto) i savija je. (preuzeto iz NCBI)

Sry se eksprimira u urogenitalnom grebenu točno prije početka formacije testisa (Gubbay i sur., 1990). Nalazimo ga i u odraslim testisima, a kod čovjeka (Clepet i sur., 1993) i tobolčara (Harry i sur., 1995) i u raznim drugim tkivima.

1.3. Kitovi (Cetacea)

Kitovi su sisavci koji su u potpunosti vodene životinje. Cijeli svoj život provode u moru. Razvili su se iz kopnenih sisavaca koji su se prije oko 50 milijuna godina vratili u more. Iako oblikom tijela podsjećaju na ribe, kitovi dišu atmosferski zrak kojim se opskrbljuju prilikom izrona iz vode, a repna peraja koja je kod riba postavljena vertikalno kod kitova je horizontalno. To su toplokrvne životinje koje rađaju žive mlade koji se hrane majčinim mlijekom, a kod mladih životinja se mogu naći ostaci dlaka u koži. Kitovi su jako dobri plivači, a neke vrste mogu dugo roniti na velikim dubinama. Za neke kitove se smatra da su najinteligentnije životinje osim primata.

Taksonomski kitovi se dijele na tri podreda: Mysticeti (kitovi usani), Odontoceti (kitovi zubani) i izumrli Archaeoceti (prakitovi) za koje se smatra da su preci prva dva podreda. Podred Mysticeti čine vrlo veliki kitovi, svi duži od sedam metara. Umjesto zubiju imaju u

ustima velike rožnate ploče (usi) koje im služe kao filter tijekom hranjenja. Hrane se uglavnom planktonom i sitnim organizmima. Gotovo svi pripadnici ovog podreda imaju sezonske migracije i češće ih nalazimo na Antarktici i u arktičkim područjima. U ovu skupinu pripada i najveća životinja na svijetu, plavetni kit, koji može doseći dužinu od 33,5 metara i masu od 160 tona.

Podred Odontoceti čine uglavnom manje i srednje velike životinje. U usnoj šupljini imaju zube ili bar njihove rudimente kojima hvataju plijen. Hrane se uglavnom ribama i mekušcima. Društveniji su od kitova usana. Neke vrste žive u rijekama.

U Jadranskom moru je prije Drugog svjetskog rata prevladavao obični dupin (*Delphinus delphis*). Međutim danas tu živi još samo dobri dupin (*Tursiops truncatus*), a prema procjenama u Hrvatskoj je nastanjeno oko 220 jedinki (Gomerčić i sur., 1998; Gomerčić i sur., 2002). Ostale vrste kitova u Jadranskom moru borave samo povremeno, npr. plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*), glavati dupin (*Grampus griseus*), krupnozubi dupin (*Ziphius cavirostris*) i veliki sjeverni kit (*Balaenoptera physalus*).

1.4. Metode određivanja spola

Razvoj molekularnih tehnika je u posljednjih nekoliko godina otvorio nove mogućnosti u području populacijske i konzervacijske biologije, kao i evolucije. Pomoću njih smo dobili bolji uvid u dinamiku populacija, naročito onih vrsta koje je teško promatrati i pratiti u prirodi (Haig, 1998). Molekularnom analizom je moguće dobiti podatke o jedinki iz minimalne količine tkiva. Uzorak tkiva žive jedinke se može dobiti invazivnim i neinvazivnim metodama. Invazivne metode, kao što je uzimanje biopsata kože, nam pružaju bolju vezu između uzorka i jedinke, ali iako se čini da sam postupak nema negativnog učinka na jedinke teško je predvidjeti koji je stvarni popratni učinak. Neinvazivne metode su manje precizne, ali im je prednost veći broj uzoraka koji se dobijaju sakupljanjem odbačene kože (Valsecchi i sur., 1998), izmeta (Kohn i Wayne, 1997; Parsons, 2001), dlaka i krvavih mrlja (Gilson i sur., 1998).

Molekularno određivanje spola je važno za mnoga područja: populacijsku i konzervacijsku biologiju, molekularnu ekologiju, forenziku, arheologiju. Spol nije uvijek moguće odrediti vanjskim pregledom, pogotovo kod vrsta koje nemaju naglašen spolni dimorfizam ili imaju unutarnje gonade. Taj problem se javlja i kod određivanja spola lešina jer im spolne karakteristike mogu uništiti životinje mesojedi ili bakterijsko raspadanje.

Kod vrsta kod kojih je spol točno genetski utvrđen za njegovo određivanje se koriste molekularni biljezi na DNA. Postoji nekoliko genetičkih metoda, kao što su kariotipiziranje staničnih kultura i Southern blotting, ali danas se najviše koristi određivanje spola lančanom reakcijom polimerazom (eng. polymerase chain reaction, PCR). Osnova te metode je određivanje postojanja ili nepostojanja određenih gena na spolnim kromosomima. PCR reakcija je vrlo osjetljiva te s toga prikladna za određivanje spola iz minimalnih količina genskog materijala.

Postoje dva pristupa određivanju spola PCR reakcijom: umnažanjem homolognih fragmenata na X i Y kromosomu i umnožavanjem fragmenata specifičnih samo za Y kromosom. Kod umnažanja homologa na X i Y kromosomu koriste se geni za amelogenin kod kojih je bitan polimorfizam veličine fragmenata (Nakahori i sur., 1991) i ZFX/ZFY (eng. zinc finger) geni kod kojih je bitno jedinstveno restrikcijsko mjesto (Aasen i Medrano 1990). Iz uzoraka dobivenih neinvazivnim putem (Bradley i sur., 2001), kao i kod degradirane DNA (Bérubé i Palsbøll, 1996) je često teško dobiti umnažanje ZFX/ZFY fragmenata zbog njihove dužine, dok se umnažanjem kraćeg dijela fragmenta može izgubiti jedinstveno restrikcijsko mjesto (Bérubé i Palsbøll, 1996).

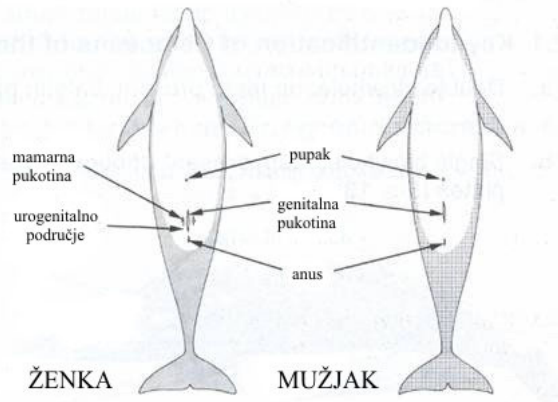
Kod drugog pristupa se umnaža *sry* gen koji je specifičan za Y kromosom pa na elektroforetskom gelu samo mužjaci daju pozitivne rezultate (Gilson i sur., 1998). Negativni rezultat ne mora nužno značiti ženku već može nastati zbog problema s PCR reakcijom ili početnicama. Iz tog razloga se koristi paralelno umnožavanje kontrolnih regija na DNA, a to su najčešće ZFX/ZFY geni (Gilson i sur., 1998), geni za amelogenin (Hasegawa i sur., 2000; Phua i sur., 2003), mikrosatelitni lokusi (Takahashi i sur., 1998; Abe i sur., 2001) ili mitohondrijska DNA (Palsbøll i sur., 1992). Pri ovakvoj koamplifikaciji se mogu javiti problemi s osjetljivošću i usklađivanjem optimalnih uvjeta za različite setove početnica (Fernando i Melnick, 2001).

1.4.1. Određivanje spola kod kitova

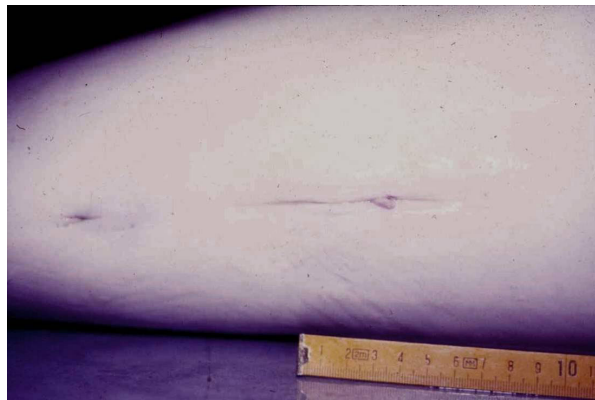
U većini slučajeva kitovi nemaju dimorfnih karakteristika po kojima bi mogli razlikovati mužjaka od ženke kod živih jedinki koje se slobodno kreću u divljini. Iako je fotoidentifikacija korisna za raspoznavanje jedinki, njome je iznimno teško odrediti i spol same jedinke (Slika 1.4). Morfološki spol možemo odrediti na mrtvim jedinkama, ali ponekad je truplo toliko raspadnuto, ili su pronađeni samo njegovi dijelovi, da je morfološka

identifikacija nemoguća. Iz ovih razloga je molekularno određivanje spola kod kitova vrlo važno.

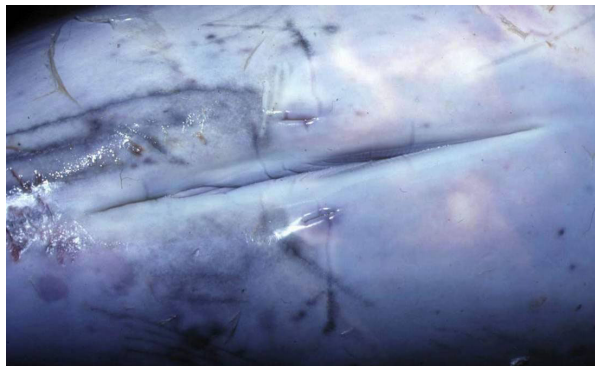
a)



b)



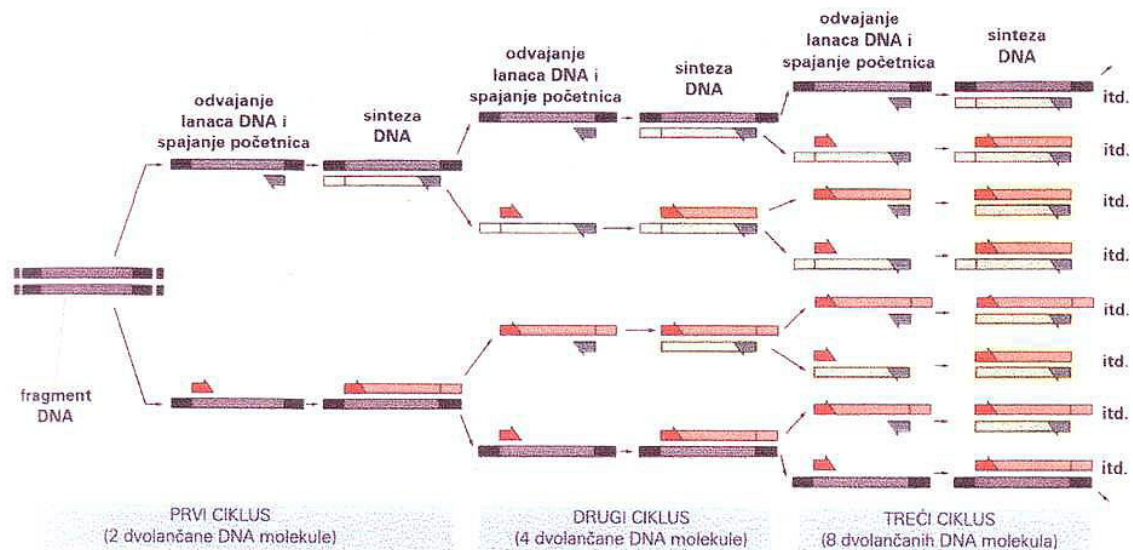
c)



Slika 1.4. Genitalno područje kod dobroga dupina (*Tursiops truncatus*). a) shematski prikaz (preuzeto od Jefferson i sur., 1993). b) mužjak (lešina) c) ženka (lešina) (fotografije ustupila Martina Đuras Gomerčić, Veterinarski fakultet, Zagreb).

Za uzimanje uzoraka od jedinke u divljini najčešće se koristi uzimanje biopsata kože pomoću strelica. Ta metoda omogućuje sakupljanje uzoraka na izravan i kontroliran način, s jasnom vezom između uzorka tkiva i jedinke.

Metoda koju sam koristila u ovom radu (Gilson i sur., 1998), se zasniva na lančanoj reakciji polimerazom. Osnova PCR reakcije je denaturacija dvolančane DNA, hibridizacija komplementarnih početnica na DNA kalup, te sinteza DNA pomoću termostabilne DNA polimeraze (Slika 1.5).



Slika 1.5. Shematski prikaz lančane reakcije polimerazom. (preuzeto od Alberts i sur., 1994)

PCR reakcijom se umnožavaju fragmenti na X i Y kromosomu. Početnice koje su dizajnirali Fain i LeMay (1995) se koriste za umnažanje fragmenta gena *sry* koji se nalazi na Y kromosomu mužjaka sisavaca. Kao kontrola uspjeha PCR reakcije služe početnice za gene *ZFX/ZFY* (Aasen i Medrano, 1990), visoko konzervirane homologe na X i Y kromosomu (Page i sur., 1987). Budući da se metoda bazira na nepostojanju PCR produkta gena *sry* kod ženki, očekivani rezultat je umnožavanje dva fragmenta kod mužjaka, *sry* i *ZFY* fragmenti, i jedan fragment kod ženke, kontrolni *ZFX* fragment.

Odabrala sam ovu metodu jer se njome umnažaju relativno mali fragmenti DNA budući da su uzorci tkiva često u poodmaklom stanju raspadanja. Naime, u stanicama takvih tkiva se odvijaju apoptozi i nekrozi slični procesi za koje je karakteristična aktivacija endogenih endonukleaza koje cijepaju kromatin stanice na fragmente dužine oko 200 bp (Ueda i Shah,

1994; Trump, 1996). Ovu metodu sam izabrala jer sam smatrala da je jednostavnija, brža i preciznija od metode koja je do sada korištena u ovom laboratoriju (Pezer, 2003).

1.5. Cilj rada

Ciljevi ovog istraživanja su bili:

1. Uvesti u laboratorijski rad jednostavnu, brzu i preciznu molekularnu metodu određivanja spola kitova umnažanjem dijela gena *sry*.
2. Odrediti primjenjivost metode (Gilson i sur., 1998) na više različitih vrsta kitova, iz oba podreda Cetacea.
3. Ovom metodom potvrditi spol 42 jedinke različitih vrsta kitova čiji je spol bio poznat morfološki.
4. Odrediti spol na kožnom biopsatu žive jedinke dobrog dupina.
5. Ispitati univerzalnost početnica i mogućnost kontaminacije stranom DNA primjenom ove metode na DNA drugih vrsta (čovjek, miš, štakor).
6. Usporediti ovu metodu (Gilson i sur., 1998) s ranije primjenjivanom metodom molekularnog određivanja spola kitova (Bérubé i Palsbøll, 1996; Pezer, 2003).

2.1. MATERIJAL

2.1.1. Standardne kemikalije:

EDTA, etilendiamintetraoctena kiselina (Kemika, Hrvatska)
etanol, 100% (Kemika, Hrvatska)
etidijev bromid, 2.5 mg/ml (Serva, Njemačka)
kloridna kiselina (Kemika, Hrvatska)
natrijev hidroksid (Kemika, Hrvatska)
natrijev dodecilsulfat, SDS (Serva, Njemačka)
natrijev klorid (Kemika, Hrvatska)
PCR agaroz (Bio-Rad, SAD)
Tris-(hidroksimetil)-aminometan, C₄H₁₁NO₃ (Kemika, Hrvatska)

2.1.2. Otopine:

- otopine za izolaciju DNA:
pufer TNE: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,5
pufer TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4
proteinaza K, 50 mg/ml (Sigma, Njemačka)
- otopine za elektroforezu u agaroznom gelu:
pufer TBE: 45 mM Tris borat, 1 mM EDTA
pufer za nanošenje uzoraka na gel: 0,25 % bromfenol plava, 0,25 % ksilencijanол
fluorofosfat, 15 % fikol
DNA biljeg: 100 bp Molecular Ruler, 100 µg/ml (Bio-Rad, SAD)

2.1.3. Materijal za umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom

Multiplex PCR Kit (QIAGEN, SAD)

početnice (VBC-Genomics, Austrija):

Y53-3C (5' – CCC ATG AAC GCA TTC ATT GTG TGG – 3')

Y53-3D (5' – ATT TTA GCC TTC CGA CGA GGT CGA TA - 3')

P1-5EZ (5' – ATA ATC ACA TGG AGA GCC ACA AGC T - 3')

P2-3EZ (5' – GCA CTT CTT TGG TAT CTG AGA AAG T - 3')

2.1.4. Tkivo kitova

Uzorci tkiva su sakupljeni s ukupno 49 jedinki (Tablica 2.1). Sa lešina nađenih duž hrvatskog dijela jadranske obale u razdoblju od 1997. do 2003. godine prikupljena su 43 uzorka, pet uzoraka je uzeto s dobrih dupina iz Sredozemnog mora, područje Izraela, a jedan uzorak je biopsat sa žive jedinke dobrog dupina s područja Jadranskog mora sjeverozapadno od otoka Iža, N44°05'30", E15°03'38".

Biopsat i šest uzoraka s lešina su uzeti s kože dobrog dupina, tri uzorka su uzeta iz jetre dobrog dupina, dok su svi ostali uzorci bili iz mišićnog tkiva. Uzorci su čuvani u 96 % etanolu na -20 °C.

Morfološki je određen spol 42 jedinke (Tablica 2.1.). Te podatke sam iskoristila kao kontrolu pouzdanosti metode. Spol žive jedinke dobrog dupina mi nije bio unaprijed poznat.

Tablica 2.1. Prikaz broja jedinki po vrsti i morfološki određenom spolu.

Vrsta	Spol morfološki			Broj jedinki
	Ženke	Mužjaci	Nepoznato	
dobri dupin (<i>Tursiops truncatus</i>)	12	11	7	30
plavobijeli dupin (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	4	5	0	9
glavati dupin (<i>Grampus griseus</i>)	1	5	0	6
krupnozubi dupin (<i>Ziphius cavirostris</i>)	1	1	0	2
veliki sjeverni kit (<i>Balaenoptera physalus</i>)	1	1	0	2
Ukupno	19	23	7	49

Uzorci prikupljeni s lešina su bili u različitim stadijima raspadanja. Najlošije očuvani su bili uzorci iz jetre, a najbolje uzorci iz kože.

2.1.5. Izolirana DNA

Koristila sam prije izoliranu DNA ženke i mužjaka kućnog miša (*Mus musculus*) i štakora selca (*Rattus norvegicus*), te žene i muškarca (*Homo sapiens*). DNA je izolirana iz krvi i čuvana u TE puferu na -20 °C.

2.2. METODE

2.2.1. Sterilizacija materijala i pribora

Tijekom cijelog eksperimenta koristila sam sterilni pribor kako bih smanjila rizik od zagađenja uzoraka stranom DNA ili prijenosom DNA iz drugih uzoraka. Metalni pribor sam sterilizirala etanolom i zatim spaljivala, a kemikalije otporne na ultraljubičasto svjetlo i plastični pribor sam izlagala ultraljubičastom svjetlu. Prostorije za izolaciju DNA, pripremu uzoraka za PCR, te pripremu PCR-produkata za elektroforezu, kao i prostorija za samu elektroforezu, su bile fizički odvojene.

2.2.2. Izolacija genomske DNA iz tkiva kitova

Genomsku DNA iz tkiva sam izolirala metodom isoljavanja (Miller i sur., 1988) u kojoj se denaturirani proteini talože velikom koncentracijom natrijevog klorida. Ova metoda je brža i sigurnija od izolacije fenol-kloroformom, a izolirana DNA je zadovoljavajuće čistoće.

Izolacija genomske DNA iz tkiva metodom isoljavanja

1. Staviti 1 ml 1X TNE pufera, pH 7,5, u plastične epruvete s čepom volumena 2 ml.
2. Oko 50 mg tkiva macerirati skalpelom u petrijevki ili na filter papiru i komadiće dodati u epruvetu s 1X TNE puferom.
3. Dodati 1,5 µl proteinaze K, koncentracije 50 mg/ml.
4. Dodati 30 µl 20% SDS-a i promiješati nekoliko puta.
5. Preko noći inkubirati uz miješanje na 45 °C (od 37 °C do 50 °C).
6. Dodati 0,5 ml NaCl i snažno promućkati 15 sekundi.
7. Centrifugirati 10 minuta na 2 500 okretaja u minuti.
8. U novu epruvetu prenijeti 0,5 ml supernatanta. Ovisno o čistoći supernatanta može se ponoviti postupak od 7. koraka.
9. Dodati 2,5 volumena 100% etanola ohlađenog na -20 °C.
10. Pažljivo miješati izvrtanjem epruvete do pojave taloga DNA, a zatim centrifugirati 5 minuta na 13 000 okretaja u minuti.
11. Etanol pažljivo izliti iz epruvete, a talog DNA isprati s 1 ml 70% etanola.
12. Centrifugirati 5 minuta na 13 000 okretaja u minuti.

13. Odliti etanol i epruvetu ostaviti preko noći okrenutu naopako da se DNA osuši.
14. Otopiti DNA u 50 µl TE pufera (može i u deioniziranoj sterilnoj vodi) i ostaviti preko noći na 4 °C da se DNA dobro otopi.
15. DNA dalje čuvati na -20 °C.

2.2.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Dio gena *sry* na Y kromosomu i gene *ZFX* i *ZFY* na X, odnosno Y kromosomu sam umnožila lančanom reakcijom polimerazom na GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems). Volumen reakcijske smjese je bio 7 µl. Njezin sastav za jedan i za deset uzoraka se nalazi u Tablici 2.2.

Da bih smanjila pogreške pri pipetiranju vrlo malih volumena reagensa napravila sam zajedničku reakcijsku smjesu (engl. "master mix") za nekoliko uzoraka u kojoj se nalazilo sve osim genomske DNA. Volumen zajedničke reakcijske smjese je uvijek bio 10% veći od potrebnog za ukupni broj reakcija koje sam kanila napraviti. Zbog korištenja HotStarTaq DNA polimeraze cijeli postupak nije bilo potrebno izvoditi na ledu jer je ta polimeraza stabilna na sobnoj temperaturi. U svaku epruvetu za PCR sam stavila po 6 µl zajedničke reakcijske smjese i 1 µl DNA uzorka.

Tablica 2.2. Sastav zajedničke reakcijske smjese za lančanu reakciju polimerazom

REAGENS	POČETNA KONCENTRACIJA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN	VOLUMEN
			ZA JEDNU REAKCIJU (µl)	ZA 10 REAKCIJA (µl)
Multiplex master mix	2 X	0.42X	1.5	15
Smjesa početnica*	10X (2 µM)	0.2 µM**	0.7	7
H ₂ O, deionizirana			3.8	38
DNA kalup			1	
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 (Tablica 2.3).

Tablica 2.3. Reakcijski uvjeti lančane reakcije polimerazom

	Temperatura (°C)	Vrijeme	
Aktivacija polimeraze	95	15 min	} 35 ciklusa
Denaturacija kalupa	94	45 s	
Prianjanje početnica	60	90 s	
Produženje lanca	72	60 s	
Završno produženje	72	10 min	

2.2.4. Elektroforeza

PCR produkte sam razdvojila elektroforezom u agaroznom gelu. Tom metodom moguće je razdvojiti molekule DNA različite veličine. Elektroforeza je kretanje nabijenih molekula u električnom polju, tako da se pri neutralnom pH negativno nabijena DNA kreće prema pozitivnom polu, anodi. Brzina kretanja molekule ovisi o veličini i konformaciji molekule DNA, naponu struje, smjeru električnog polja, sastavu elektroforetskog pufera, koncentraciji i vrsti agaroze i prisutnosti etidijevog bromida (Maniatis i sur., 1989).

Koristila sam 1% agarozni gel koji sam napravila otapanjem 0,5 g agaroze u 50 ml 0,5X TBE pufera. Smjesu sam u Erlenmeyerovoj tikvici uz miješanje zagrijavala do vrenja u mikrovalnoj pećnici, a nakon što se sva agarozna otopila ohladila sam otopinu pod mlazom hladne vode na oko 60 °C i zatim je izlila u kalup za gel. Postavila sam češalj za jažice. Gel se polimerizirao za 30 minuta kada sam izvadila češalj i stavila gel u sustav za elektroforezu u kojem se nalazio 0,5X TBE pufer koji je u potpunosti prekrivao gel.

Na parafilmu sam izmješala 2 µl pufera za nanošenje sa 3 µl PCR-produkta i to nanijela u jažice. U prvu jažicu sam nanijela 3,5 µl DNA biljega pomoću kojeg sam procijenila veličinu DNA fragmenta. Elektroforeza se odvijala na sobnoj temperaturi, pri konstantnom naponu od 90 V, 50 minuta.

Nakon završene elektroforeze gel sam na 30 minuta uronila u otopinu etidijevog bromida koncentracije 0,5 µg/ml (Maniatis i sur., 1989). Otopinu sam pripremila otapanjem 75 µl etidijevog bromida u 1.5 l 0,5X TBE pufera. Etidijev bromid je interkalirajući agens koji se

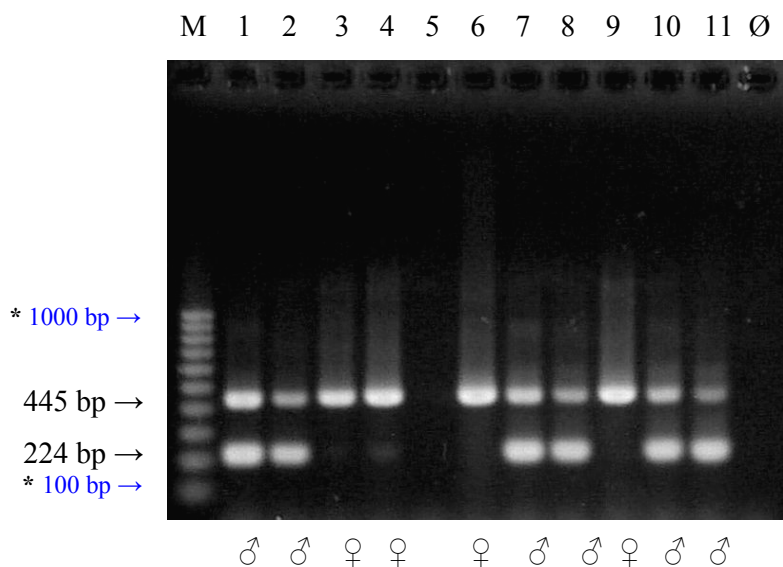
2. MATERIJAL I METODE

ugrađuje između baza u molekuli DNA i fluorescira narančastom svjetlošću kada se gel obasja ultraljubičastom svjetlošću, što nam omogućuje vizualizaciju uzoraka DNA.

Nakon tretmana etidijevim bromidom gelove sam promatrala u transiluminatoru i zatim fotografirala.

3.1. Određivanje spola

Kod mužjaka sam dobila produkt od 224 bp, koji je nastao umnažanjem dijela gena *sry* početnicama Y53-3C i Y53-3D. Kod mužjaka i kod ženki dobila sam fragment od 445 bp nastao umnažanjem gen ZFX/ZFY početnicama P1-5EZ i P2-3EZ. Taj fragment je služio kao unutarnja kontrola. Dakle, kod mužjaka sam lančanom reakcijom polimerazom dobivala dva fragmenta veličine 224 i 445 bp, a kod ženki samo jedan od 445 bp (Slika 3.1).



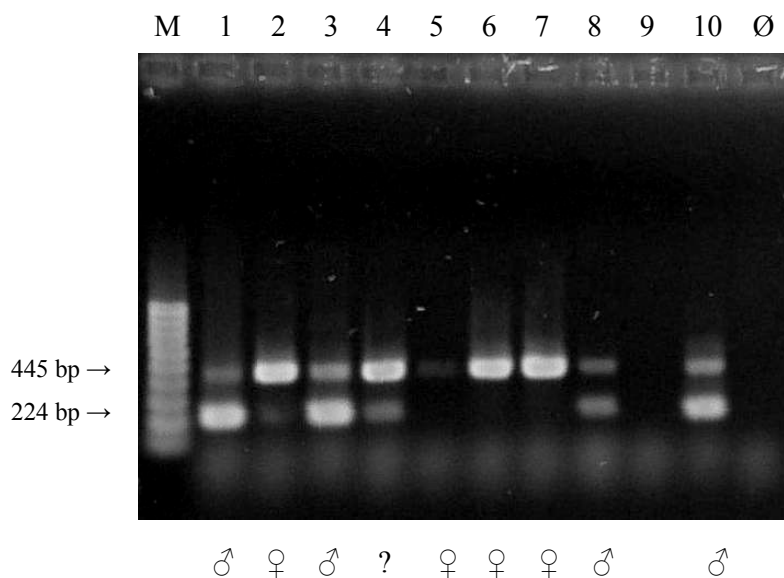
Slika 3.1. Rezultati lančane reakcije polimerazom. DNA biljeg (M), dobri dupin (1), veliki sjeverni kit (2, 3), krupnozubi dupin (4, 5), glavati dupin (6 – 8), plavobijeli dupin (9 – 11), negativna kontrola (Ø; dodana voda umjesto DNA). Spol je označen ispod svakog uzorka.

* DNA biljeg. Razlika između fragmenata je 100 bp.

Uspješno sam odredila spol 37 kitova (Tablica 3.1). Rezultate sam, gdje je bilo moguće, usporedila s morfološkim podacima i oni su se u potpunosti podudarali s podacima koje sam dobila lančanom reakcijom polimerazom.

Samo u jednom slučaju je ženka pogrešno identificirana kao mužjak (Slika 3.2, linija 4). Nakon ponovljene izolacije DNA i PCR reakcije tog uzorka utvrdila sam da se radi o ženki dobrog dupina (Slika 3.3, linija 1).

3. REZULTATI



Slika 3.2. Intenzitet fluoresciranja fragmenata umnoženih lančanom reakcijom polimerazom. Intenzitet fluorescencije u liniji 4 ukazuje na vjerojatnu kontaminaciju s DNA iz drugog uzorka. DNA biljeg (M), dobri dupin (1 - 10), negativna kontrola (Ø). Spol je označen ispod svakog uzorka.

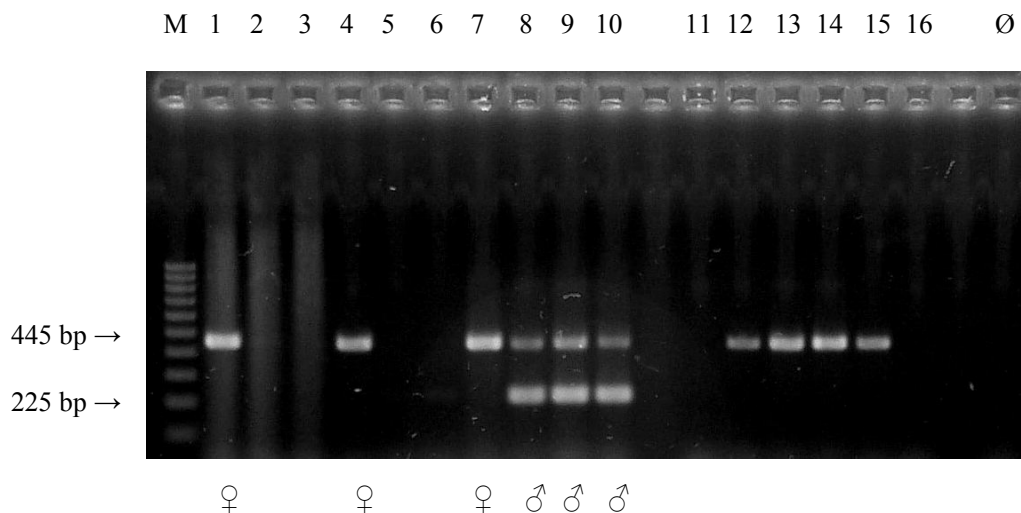
U 12 slučajeva (Tablica 3.1) nisam mogla odrediti spol jer je tkivo bilo u podmakloj fazi raspadanja. DNA izolirana iz biopsata se umnožila u velikoj količini, a analiza na gelu je pokazala da se radi o ženki dobrog dupina (Slika 3.3, linija 7).

Tablica 3.1. Rezultati određivanja spola lančanom reakcijom polimerazom.

Vrsta	Ženke	Mužjaci	PCR reakcija nije uspjela	Broj jedinki
dobri dupin (<i>Tursiops truncatus</i>)	9	11	10	30
plavobijeli dupin (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	4	5	0	9
glavati dupin (<i>Grampus griseus</i>)	1	4	1	6
krupnozubi dupin (<i>Ziphius cavirostris</i>)	1	0	1	2
veliki sjeverni kit (<i>Balaenoptera physalus</i>)	1	1	0	2
Ukupno	16	21	12	49

3.2. Provjera specifičnosti početnica za druge vrste

Primjenom istih početnica na DNA kućnog miša, štakora selca i čovjeka lančanom reakcijom polimerazom dobila sam samo fragment od 445 pb (Slika 3.3). Fragment se umnožio kod žene, mušjaka i ženke kućnog miša i mušjaka štakora.



Slika 3.3. Rezultati amplifikacije DNA kitova i nekih drugih vrsta. DNA biljeg (M), dobri dupin (1, 7-10), plavobijeli dupin (4), muškarac (11), žena (12), mušjak miša (13), ženka miša (14), mušjak štakora (15), ženka štakora (16), negativna kontrola (Ø). Spol je označen ispod svakog uzorka.

Metoda određivanja spola umnažanjem dijela gena *sry* se pokazala uspješnom za oba podreda Cetacea. Jednostavna je, brza i pouzdana. Ovdje prikazani reakcijski uvjeti favoriziraju kod mužjaka jače umnožavanje *sry* fragmenta (dugog 224 bp), koji je manji od fragmenta nastalog umnožavanjem *ZFX/ZFY* gena (dugog 445 bp). Pojava intenzivnijeg *ZFX/ZFY* fragmenta na gelu, u odnosu na *sry* fragment (Slika 3.2), ukazuje na moguću kontaminaciju DNA ženke s DNA mužjaka te je poželjno daljnje ispitivanje (Gilson i sur., 1998; Charalsawad i Limprasert, 2000). Kod metoda čiji uvjeti favoriziraju jače umnažanje gena zajedničkog i ženki i mužjaku (Bérubé i Palsbøll, 1996; Pezer, 2003) ovakva mogućnost kontrole nije moguća, a rezultati mogu biti nejasni (Abe i sur., 2001).

U nekoliko slučajeva sam opazila umnažanje samo fragmenta od 224 bp, ali optimizacijom uvjeta PCR reakcije uspjela sam dobiti umnažanje oba fragmenta. Odsutnost fragmenta od 445 bp nije imala nikakvog utjecaja na interpretaciju rezultata i utvrđivanje muškog spola te jedinke.

Određivanje spola kod 12 uzoraka nije bilo moguće. Ti uzorci su uzeti s lešina u podmakloj fazi raspadanja te je vjerojatno došlo do prevelike degradacije DNA. Smatram da bi primjenom početnica za kraći fragment gena *sry* mogli odrediti spol i kod uzoraka s jače degradiranom DNA (Takahashi i sur., 1998). Rezultati dobiveni iz uzoraka tkiva tek uginulih životinja i iz biopsata žive jedinke su bili jasni i fragmenti su se dobro umnožili.

Primjenom ove metode na uzorke za koje su metodom opisanom u Bérubé i Palsbøll (1996) dobiveni rezultati suprotni morfološkim podacima (Pezer, 2003) nisam uspjela dobiti umnožavanje fragmenata i vjerujem da je DNA u tim uzorcima bila previše degradirana te da su umnoženi fragmenti rezultat kontaminacije drugim uzorkom tijekom pripreme reakcijske smjese.

Oba para početnica koja sam koristila funkcioniraju kod više vrsta sisavaca (Aasen i Medrano, 1990; Gilson i sur., 1998). Čovjek, miš i štakor su najčešći mogući uzrok kontaminacije u laboratoriju u kojem sam radila pa sam zato pokušala ovom metodom odrediti spol tih vrsta da utvrdim rizik od kontaminacije. Koristila sam već izoliranu DNA čovjeka, kućnog miša i štakora selca. Niti u jednom slučaju nisam uspjela dobiti umnožavanje *sry* fragmenta iako su Gilson i sur. (1998) ovom metodom uspješno odredili spol muškarca i žene. Fragment gena *ZFX/ZFY* se uspješno umnožio u četiri slučaja (Slika 3.3). Vjerujem da bi se promjenom reakcijskih uvjeta svi fragmenti uspješno umnožili. Budući da je za moje istraživanje bitno utvrditi koliki je rizik od kontaminacije u ovim određenim reakcijskim uvjetima, nisam vršila daljnja ispitivanja jer sam zaključila da rizik od kontaminacije ljudskom, mišjom i štakorskom DNA postoji. Da bi rizik sveli na najmanju moguću mjeru, u

primjeni ove metode na kitove treba paziti na sterilnost pri postupku i za svaku skupinu DNA izolata i PCR reakcija obavezno uključiti i negativnu kontrolu.

5. ZAKLJUČAK

1. Korištena metoda je jednostavna, brza i precizna te je pogodna za primjenu na biopsatima i uzorcima relativno dobro očuvanog tkiva.
2. Metoda nije pogodna za primjenu na uzorcima tkiva koja su u uznapređovalom stanju raspadanja, zbog prevelike degradiranosti DNA kalupa.
3. Metoda je primjenjiva za vrste podreda Mysticeti, kao i za vrste podreda Odontoceti.
4. Postoji mala mogućnost kontaminacije stranom DNA zbog univerzalnosti početnica za više vrsta sisavaca, ali je ona zanemariva ako se koriste kontrolne reakcije i pazi na sterilnost prilikom izvođenja reakcija.
5. Ovdje opisana metoda je jasnija i pouzdanija od ranije korištene molekularne metode određivanja spola (Bérubé i Palsbøll, 1996; Pezer, 2003) jer ima bolju unutarnju kontrolu.

Aasen E. i Medrano J.F. (1990): Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* **8**: 1279-1281.

Abe H., Goto M., Pastene L.A. (2001): Practical use of multiplex fluorescent PCR for cetacean sex identification. *Marine Mammal Science* **17**: 657-664.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1994): *Molecular biology of the cell*. 3rd edition, Garland Publishing Inc., New York i London.

Bachtrog D. i Charlesworth B. (2001): Towards a complete sequence of a human Y chromosome. *Genome Biology* **2**: 1016.1-1016.5.

Bérubé M. i Palsbøll P. (1996): Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers. *Molecular Ecology* **5**: 283-287.

Bradley B.J., Chambers K.E., Vigilant L. (2001): Accurate DNA-based sex identification of apes using non-invasive samples. *Conservation Genetics* **2**: 179-181.

Bridges C.B. (1914): Direct proof through non-disjunction that the sex-linked genes of *Drosophila* are borne on the X-chromosome. *Science* **15**: 107-109.

Carvalho A.B., Lazzaro B.P., Clark A.G. (2000): Y chromosomal fertility factors *kl-2* and *kl-3* of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *PNAS* **97**: 13239-13244.

Clepet C., Schafer A.J., Sinclair A.H., Palmer M.S., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. (1993): The human SRY transcript. *Human Molecular Genetics* **2**: 2007-2012.

Charalsawad C. i Limprasert P. (2000): Rapid and simple sex determination by PCR using SRY and ATL1 primers. *Songkla Medical Journal* **18**: 115-119.

Fain S.R. i LeMay J.P. (1995): Gender identification of humans and mammalian wildlife species from PCR amplified sex-linked genes. *Proceedings of American Academy of Forensic Sciences*, str. 34.

Fernando P. i Melnick D.J. (2001): Molecular sexing eutherian mammals. *Molecular Ecology Notes* **1**: 350-353.

Ferrari S., Harley V.R., Pontiggia A., Goodfellow P.N., Lovell-Badge R., Bianchi M.E. (1992): SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *The EMBO Journal* **11**: 4497-4506.

Gilson A., Syvanen M., Levine K., Banks J. (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., Huber Đ., Gomerčić A., Gomerčić T. (1998): Geographical and historical distribution of the cetaceans in Croatian part of the Adriatic Sea. *Rapport du Commission Internationale pour L'exploration Scientifique de la Mer Méditerranée* **35**: 440-441.

Gomerčić H., Huber Đ., Mihelić D., Lučić H., Đuras M. (2002): Estimation of the bottlenose dolphin (*Turiops 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, str. 43.

Gubbay J., Collignon P., Koopman P., Capel B., Economou A., Münsterberg A., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. (1990): A gene mapping of the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embrionically expressed genes. *Nature* **346**: 245-250.

Hacker A., Capel B., Goodfellow P., Lovell-Badge R. (1995): Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene. *Development* **121**: 1603-1614.

Haig S.M. (1998): Molecular contributions to conservation. *Ecology* **79**: 413-425.

Harry J.L., Koopman P., Brennan F.E., Graves J.A., Renfree M.B. (1995): Widespread expression of the testis-determining gene SRY in a marsupial. *Nature Genetics* **11**: 347-349.

Hasegawa T., Sato F., Ishida N., Fukushima Y., Mukoyama H. (2000): Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. *Journal of Veterinary and Medical Science* **62**: 1109-1110.

Jefferson T.A., Leatherwood S., Webber M.A. (1993): *Marine mammals of the world*. United Nations Environment Programme and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rim.

Kohn M.H. i Wayne R.K. (1997): Facts from feces revisited. *Tree* **12**: 223-227.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1989): *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

McClung C.E. (1902): The accessory chromosome – sex determinant? *Biological Bulletin* **3**: 43-84.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16**: 1215.

Morgan T.H. (1910): Chromosomes and heredity. *The American Naturalist* **44**: 449-496.

Nagai Y. (1992): Primary sex determination in mammals. *Zoological Science* **9**: 475-498.

Nakahori Y., Hamano K., Iwaya M., Nakagome Y. (1991): Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *American Journal of Medical Genetics* **39**: 472-473.

National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

O'Neill R.J.W., Brennan F., Delbridge M.L., Graves J.A.M. (1998): *De novo* insertion of an intron into the mammalian sex determining gene, SRY. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 1653-1657.

Page D.C., Mosher R., Simpson E.M., Fisher E.M.C., Mardon G., Pollack J., McGillivray B., de la Chapelle A., Brown L.G. (1987) The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* **51**: 1091-1104.

Palsbøll P.J., Vader A., Bakke I., El-Gewely M.R. (1992): Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Zoology* **70**: 2166-2170.

Parsons K.M. (2001): Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces. *Molecular Ecology Notes* **1**: 341-344.

Pezer Ž. (2003): Određivanje spola u nekih vrsta kitova (Cetacea) lančanom reakcijom polimerazom. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Pike T.W. i Petrie M. (2003): Potential mechanisms of avian sex manipulation. *Biological Review* **78**: 553-574.

Phua A.C.Y., Abdullah R.B., Mohamed Z. (2003): A PCR-based sex determination method for possible application in caprine gender selection by simultaneous amplification of the *Sry* and *Aml-X* genes. *Journal of Reproduction and Development* **49**: 307-311.

Quintana-Murci L. i Fellous M. (2001): The human Y chromosome: the biological role of a "functional wasteland". *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **1**: 18-24.

Sinclair A.H. (1998): Human sex determination. *The Journal of Experimental Zoology* **281**: 501-505.

Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA motif. *Nature* **346**: 240-244.

Takahashi M., Masuda R., Uno H., Yokoyama M., Suzuki M., Yoshida M.C., Ohtaishi N. (1998): Sexing of carcass remains of the Sika deer (*Cervus nippon*) using PCR amplification of the *Sry* gene. *Journal of Veterinary and Medical Science* **60**: 713-716.

Tilford C.A., Kuroda-Kawaguchi T., Skaletsky H., Rozen S., Brown L.G., Rosenberg M., McPherson J.D., Wylie K., Sekhon M., Kucaba T.A., Waterston R.H., Page D.C. (2001): A physical map of the human Y chromosome. *Nature* **409**: 943-945.

Trump B.F. (1996): Characteristics and mechanisms of cell injury and cell death: the role of $[Ca^{2+}]_i$. *Marine Environmental Research* **42**: 57-63.

Ueda N. i Shah S.V. (1994): Apoptosis. *Jornal of Laboratory and Clinical Medicine* **124**: 169-177.

Uguz C., Iscan M., Togan I. (2003): Developmental genetics and physiology of sex differentiation in vertebrates. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **14**: 9-16.

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.

Wilson E.B. (1905): The chromosomes in relation to the determination of sex in insects. *Science* **22**: 500-502.