

Utvrđivanje i analiza haplotipova kontrolne regije mitohondrijske DNA dobrih dupina (*Tursiops truncatus*, Montagu, 1821) Jadranskog mora

Medved, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:973591>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Magdalena Medved

**UTVRĐIVANJE I ANALIZA HAPLOTIPOVA KONTROLNE REGIJE
MITOHONDRIJSKE DNA DOBRIH DUPINA (*Tursiops truncatus*
Montagu, 1821) JADRANSKOG MORA**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Galov, PMF Sveučilište u Zagrebu, i izv. prof. dr. sc. Martine Đuras, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Veliko hvala mojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Ana Galov i izv. prof. dr. sc. Martini Đuras koje su me vodile kroz izradu ovog diplomskog rada. Hvala gđi Gordani Žakman na pomoći pri laboratorijskom radu te dr. Eleni Bužan koja me primila u svoj Odsjek za biodiverzitet pri Fakultetu za matematiku, naravoslovje in informacijske tehnologije u Kopru gdje je omogućila sekvenciranje mojih uzoraka i naučila me genetičkim analizama. Zahvale i mag. biol. exp. Idi Svetličić te dr.sc. Lauri Iacolina na pomoći pri obradi podataka. Najveće hvala mojoj obitelji koja mi je pružala punu podršku kroz sve godine studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UTVRĐIVANJE I ANALIZA HAPLOTIPOVA KONTROLNE REGIJE MITOHONDRIJSKE DNA DOBRIH DUPINA (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) JADRANSKOG MORA

MAGDALENA MEDVED
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Dobri dupin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) jedina je vrsta morskog sisavca koja u Jadranu obitava cijelu godinu. Populacija dupina, ne samo Jadrana već i globalno, sve je ugroženija djelovanjem klimatskih promjena, litoralizacije, izlovom ribe, sve intenzivnijim morskim prometom. Istraživanja dupina Sredozemnog mora malobrojna su, a čine osnovu za daljnje postupke u zaštiti i konzervaciji populacija. U ovom radu utvrđeni su i analizirani haplotipovi kontrolne regije mitohondrijske DNA populacije dobrih dupina Jadranskog mora te uspoređeni s ostalim objavljenim haplotipovima. Nakon izolacije DNA provela sam PCR reakciju, purifikaciju te sekvenciranje kontrolne regije, a zatim i računalne analize te izradila mreže. Istraživanje je pokazalo da populacija dobrih dupina Jadranskog mora ima 13 haplotipova kontrolne regije mtDNA od kojih su u ovom radu utvrđena dva nova (DD12 i DD13). Haplotipska raznolikost (H_d) iznosi 0,6831 a nukleotidna (π) 0,01085 što ukazuje na relativno visoku razinu genetičke raznolikosti. Mreža haplotipova dobivenih u ovom radu i onih preuzetih s GenBanka ne pokazuje jasnu filogeografsku strukturiranost populacija dobrih dupina Jadranskog, Sredozemnog, Crnog mora te sjeveroistočnog Atlantika.

(stranica 36, slika 5, tablica 4, literaturni navodi 35, web izvori: 5, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: molekularna ekologija, molekularni markeri, dobri dupin, Jadransko more, mitohondrijska DNA, haplotipovi, struktura populacije

Voditelj: Dr. sc. Ana Galov, izv. prof.
Dr. sc. Martina Đuras, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Ana Galov, izv. prof.
Dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof.
Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

Rad je prihvaćen: 06.02.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

DETERMINATION AND ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION HAPLOTYPES OF THE BOTTLENOSE DOLPHIN (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) FROM THE ADRIATIC SEA

MAGDALENA MEDVED
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

The bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) is the only species of marine mammals that lives in the Adriatic Sea throughout the entire year. The population of dolphins, not only in the Adriatic but also globally, is increasingly threatened by climate change, littoralisation, fishing and growing marine traffic. Studies of the Mediterranean Sea dolphins are few, and form the basis for further action for the protection and conservation of their populations. In this graduation thesis, the mitochondrial DNA control region haplotypes of the bottlenose dolphin population in the Adriatic Sea have been identified and compared with other published haplotypes. After isolating the DNA, I performed the PCR reaction, purification and sequencing of the control region, followed by computer analysis, after which I constructed the haplotype networks. The study has shown that the common bottlenose dolphin population of the Adriatic Sea has 13 mtDNA control region haplotypes, of which two new haplotypes (DD12 and DD13) have been identified in this graduation thesis. The haplotype diversity (H_d) is 0,6831 and nucleotide diversity (π) is 0,01085, which points to a relatively high level of genetic diversity. The haplotype network showing a comparison of haplotypes determined in this graduation thesis and haplotypes downloaded from GenBank does not show a clear phylogeographic structure of populations of the Adriatic, the Mediterranean, the Black Sea and the northeast Atlantic.

(36 pages, 5 figures, 4 tables, 35 references, 5 web sources, original language: Croatian)

Thesis is deposited in the Central biological library.

Key words: molecular ecology, molecular markers, bottlenose dolphin, Adriatic Sea, mitochondrial DNA, haplotypes, population structure

Supervisors: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.
Dr. Martina Đuras, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.
Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.
Dr. Sandra Radić Brkanac, Asst. Prof.

Thesis accepted: 06.02.2020.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Molekularna ekologija i molekularni markeri.....	1
1.1.1. Mitohondrijska DNA.....	2
1. 2. Dobri dupin.....	5
1.2.1. Dosadašnja istraživanja populacija dobrih dupina.....	8
2. MATERIJALI I METODE.....	10
2. 1. Izolacija DNA iz tkiva i mjerenje koncentracije DNA.....	10
2. 2. PCR i elektroforeza.....	11
2. 3. Purifikacija i sekvenciranje.....	12
2. 4. Analiza podataka.....	14
3. REZULTATI.....	16
3. 1. Uspješnost izolacije DNA.....	16
3. 2. Uspješnost umnažanja odsječka kontrolne regije mitohondrijske DNA pomoću lančane reakcije polimerazom.....	19
3. 3. Rezultati sekvenciranja i dobiveni haplotipovi.....	20
4. RASPRAVA.....	27
5. ZAKLJUČAK.....	31
6. LITERATURA.....	32
6.1. WEB izvori.....	36

POPIS KRATICA

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

mtDNA – mitohondrijska DNA

RAPD – random amplified polymorphic DNA (engl.)

AFLP – amplified fragment length polymorphism (engl.)

IUCN – International Union for Conservation of Nature (engl.)

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

tRNA – transferna ribonukleinska kiselina

ATP – adenzin-trifosfat

cpDNA – kloroplastna DNA

EN – endangered species (engl.) / ugrožene vrste

pb – parovi baza

rpm – revolutions per minute (engl.) / broj okretaja u minuti

PCR – polymerase chain reaction (engl.) / lančana reakcija polimerazom

TBE pufer – Tris /Borate/EDTA pufer

EDTA – etilendiamintetraacetna kiselina

1. UVOD

1.1. MOLEKULARNA EKOLOGIJA I MOLEKULARNI MARKERI

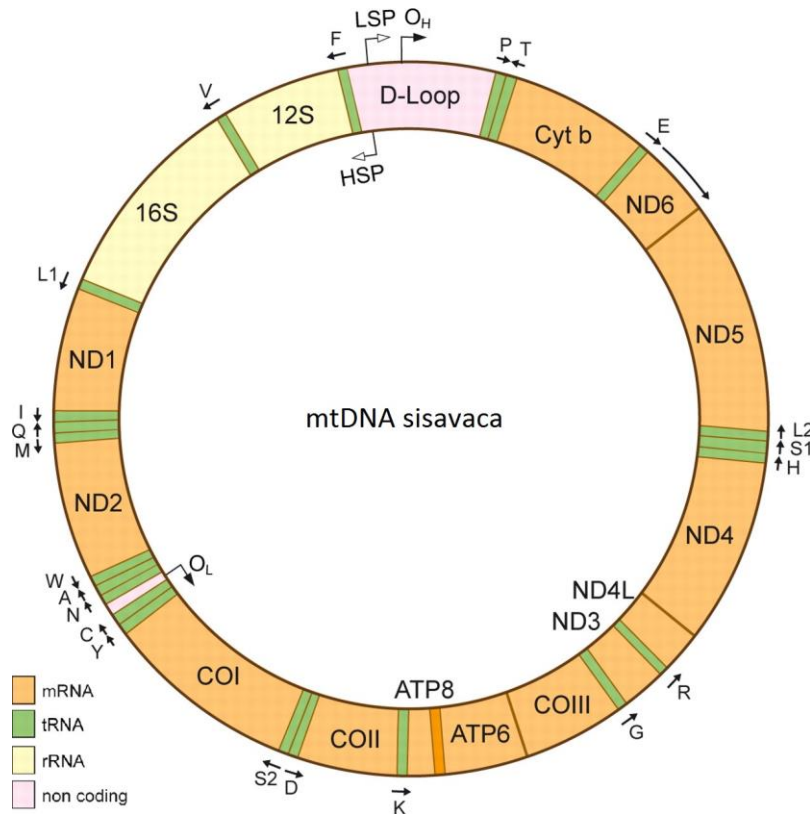
Molekularna ekologija je disciplina koja je svoj razvoj započela relativno kasno, tek od sredine osamdesetih godina 20. stoljeća iako se kamenom temeljcem ove discipline smatra otkriće kvantificiranja genetskih varijacija uz pomoć strukturnih promjena u proteinima prije otprilike 60-ak godina (Freeland i sur. 2011). Ova disciplina spoj je znanja i rada ekologa i molekularnih biologa, a bavi se rješavanjem problema u ekologiji molekularnim genetičkim metodama (Beebee i Rowe 2008). Molekularna ekologija se bavi kvantificiranjem genetičke raznolikosti, mjerenjem parenja u srodstvu, praćenjem kretanja individua, ali i povijesnim obrascima kretanja populacija, karakterizacijom novih vrsta i podvrsta, utvrđivanjem funkcije i evolucije pojedinih gena i konstrukcijom mogućih događaja vezanih za prilagodbu neke vrste na ekološke promjene (Freeland i sur. 2011). Uključuje populacijsku genetiku, ekologiju ponašanja, ekologiju bakterija i virusa, filogeografiju, konzervacijsku biologiju i niz drugih poddisciplina. Najznačajniji časopis i temelj ove discipline jest *Molecular Ecology* koji je prvi put izašao 1992. godine (Beebee i Rowe 2008).

Molekularni markeri, koji su među ostalim disciplinama važni i za molekularnu ekologiju i to zbog svoje visoke varijabilnosti, počeli su se koristiti prije otprilike stotinu godina. Definiramo ih kao tek mali dio genoma za čije se značajke vjeruje da ih se može primijeniti i na puno veći dio DNA (Beebee i Rowe 2008). Prvi molekularni markeri bili su alozimi, odnosno varijante istog proteina. Pokusi s alozimima mogli su nam dati nekoliko odgovora, kao naprimjer je li organizam homozigot ili heterozigot na pojedinom lokusu, a u prisustvu većeg broja pojedinaca iz iste populacije mogla se i kvantificirati genetička raznolikost te populacije te ju usporediti i s drugim populacijama. Danas se sve manje koriste zbog toga jer daju nedovoljnu i nepotpunu količinu podataka pa ih se zamjenjuje nekim drugim markerima (Freeland i sur. 2011). DNA molekularni marker može, ali i ne mora biti funkcionalni gen (npr. u ovom radu koristim kontrolnu regiju mtDNA koja se ne eksprimira). Također, treba znati da nije baš svaki dio DNA, baš svaki lokus dovoljno kvalitetan za biti marker. Ono što je bitno je da je lokus, tj. njegov alel identificiran i da znamo da nam on može dati one odgovore koje tražimo. Danas se pri izboru molekularnog markera može birati ovisno o cilju istraživanja – od alozima, mtDNA, RAPDs (random amplified polymorphic DNA, tj. nasumično umnožavanje polimorfne DNA) i AFLPs (amplified fragment length polymorphism, tj. polimorfizam dužine umnoženog fragmenta) do minisatelita, mikrosatelita i introna, a najbolje je kada se može raditi s više njih kako bi dobili što točnije rezultate i bolju sliku (Beebee i Rowe 2008).

1.1.1. MITOHONDRIJSKA DNA

Već 40 godina, za utvrđivanje određenih evolucijskih i demografskih pitanja, a koji se najčešće koristi u svrhu dodatnih informacija u molekularnoj ekologiji, filogeografiji i populacijskoj genetici, koristi se mitohondrijska DNA. Ovu izvanjezgrenu DNA karakterizira specifična priroda te se od nuklearne razlikuje po broju parova baza, ploidnosti, nasljeđivanju, rekombinaciji, mutacijskim stopama, brojem introna (Ballard i Whitlock 2004). MtDNA kao marker posebno je osjetljiva na efekt uskog grla te je značajni pokazatelj te pojave, a koristi se i pri informacijama vezanim za razliku u spolovima zbog nasljeđivanja samo s majčine strane (Beebee i Rowe 2008). Problem genetičkih markera mtDNA jest što ponekad postoje kopije cijele ili dijela mtDNA unutar jezgre pa nam te, jezgrene kopije slučajno umnožene PCR-om mogu umanjiti kvalitetu istraživanja (Beebee i Rowe 2008).

MtDNA izvanjezarena je DNA smještena unutar mitohondrija. To je kružna, dvostruka, zatvorena DNA koja se nasljeđuje po majčinskoj liniji, a u kralježnjaka je duga između 15.000 do 17.000 parova baza (Freeland i sur. 2011). MtDNA u kralježnjaka sadrži 37 kodirajućih regija - dva gena za rRNA, 22 gena za tRNA te 13 protein – kodirajućih gena, od kojih bi posebno istaknula one za proteine oksidativne fosforilacije (citokrom b, citokrom c, ATPazni kompleks) (Ballard i Whitlock 2004). Većina mtDNA ima nerepetativne nukleotidne sljedove, a sama veličina, struktura i uređenje su konzervirani (slika 1.) (Freeland i sur. 2011). S obzirom da nije podložna rekombinaciji i nije pod selekcijskim pritiskom (ovo je generalno mišljenje, istraživanja pokazuju da neka vrsta selekcije ipak postoji), ovaj dio DNA nam omogućuje rekonstrukciju srodnosti među jedinkama unutar i izvan populacije, ali naravno, prateći samo majčinsku liniju. Svojstva ove izvanjezrene DNA su da sama stopa mutacije mtDNA jest veća nego u jezgrene DNA, ali da mitohondrijska genetička raznolikost ne ovisi o veličini populacije (veća populacija ne znači i veća mitohondrijska raznolikost, kao ni obrnuto), tako da ovim markerom dobivamo kvalitetan uvid u genetičke razlike unutar populacije (Beebee i Rowe 2008).



Slika 1. Prikaz mtDNA sisavaca. Preuzeto iz Park i Larsson 2011.

MtDNA prvi je izbor kada se rade filogeografska istraživanja. Pojednostavljeno, filogeografska istraživanja započinju izborom markera, zatim se provodi obrada podataka, konstrukcija filogenetičkog stabla ili mreže kako bi vidjeli povezanost različitih populacija iste vrste te na kraju povezivanje ovih podataka s geografijom kako bi dobili ne samo genetičke nego i geografske udaljenosti više populacija iste vrste. Danas je više od 80% filogeografskih istraživanja temeljeno na mtDNA, iako ju polako zamjenjuju mikrosateliti i cpDNA kod biljaka (Beebee i Rowe 2008). Potrebno je naglasiti kako bilo kakva geneologija ili filogeografija temeljena na jednoj molekuli ne pokazuje istinsku povijest neke vrste ili populacije već povijest te molekule; skica ili stablo temeljeno na jednom molekularnom markeru daje ideju, odnosno jednu od mogućih povijesnih zbivanja vezanih za neku populaciju (Ballard i Whitlock 2004). Također, mtDNA služi kao marker u još jednoj poddisciplini molekularne ekologije, a to je konzervacijska biologija. Konzervacijska biologija jest poddisciplina koja je postala vrlo popularna i sve snažnija, posebno u današnje vrijeme kada neki znanstvenici tvrde da smo u dobu šestog masovnog izumiranja, a to podupiru činjenicom da je u prošlih 400 godina izumrlo nekoliko stotina vrsta. Također, vjeruje se da će se trend ugroženosti i smanjenja populacija današnjih vrsta povećavati, a sve

zbog klimatskih promjena, sve ekstremnijih vremenskih nepogoda, ali i ljudskog utjecaja, zagađenosti izvora vode i hrane te nedostatka staništa (Freeland i sur. 2011). Glavna zadaća ove poddiscipline jest utvrđivanje genetičke varijabilnosti unutar populacije i održivost same populacije, a sve sa svrhom očuvanja visoke varijabilnosti koja direktno utječe i na uspješniju prilagodbu novim uvjetima u okolišu. U konzervacijskoj se biologiji koriste i markeri pod selekcijom i oni neutralni, i to prvenstveno iz razloga što nam rad samo s jednim markerom može dati jednostranu, a time i krivu sliku (Beebee i Rowe 2008). Zanimljivo je kako se mtDNA, uz druge markere, koristi u forenzici kada se primjerice želi utvrditi životinjska vrsta koja stoji iza nekog proizvoda ilegalne trgovine divljim životinjama ili kada se želi utvrditi geografsko podrijetlo. MtDNA služi i kod potvrde uspješnog kloniranja životinja usporedbom mitohondrijskog genotipa donora i genotipa domaćina (Beebee i Rowe 2008).

MtDNA ima nekoliko povoljnih svojstava koja se koriste pri istraživanjima u području molekularne ekologije vezane za životinje: a) prilagodljive i univerzalne početnice omogućuju vezanje na konzervirana mjesta na mtDNA te mogu umnožiti određeno područje u više različitih vrsta; isto tako, ako uz njihovu pomoć umnožimo samo željeni dio DNA izbjegavamo dodatnu purifikaciju koja osim nepotrebnog može oštetiti i dio potrebitog DNA lokusa (Beebee i Rowe 2008; Freeland i sur. 2011); b) veliki broj kopija mtDNA u gotovo svim tkivima što omogućava rad na arheološkim uzorcima; c) visoka mutacijska stopa (oko deset puta veća nego kod jezgrene DNA i to prvenstveno zbog nusprodukata staničnog disanja i smanjena kvaliteta mehanizama popravka DNA u mitohondrija; otprilike 2% mutacijskih promjena na milijun godina) rezultira genetičkim varijacijama iz kojih se može iščitati parenje u srodstvu ili efekt uskog grla (Ballard i Whitlock 2004; Beebee i Rowe 2008; Freeland i sur. 2011); d) haplotipska distribucija više pod utjecajem demografskih nego selekcijskih događaja; e) haplotipska učestalost se brzo mijenja u relativno kratkom vremenskom razdoblju te stvara genetičke razlike unutar populacije; f) nema rekombinacije i nasljeđe je po jednom pretku (Beebee i Rowe 2008). Upravo ovo zadnje svojstvo stvara i problem jer nam može dati krivu sliku. Naime, istraživanja pokazuju da u nekih vrsta miševa, ptica te kod neki ljudi imamo mtDNA nasljeđen od oca, a ne od majke. Isto tako, u porodicama školjkaša poput dagnji (*Mytilidae*), ladinki (*Veneridae*) i unionida (*Unionidae*) otkrilo se biparentalno nasljeđe i to na način da ženski mladunci nasljeđuju mtDNA po majci, a muški i po majci i po ocu. Međutim, ovaj problem je lako rješiv jer, iako rasprostranjeno, ovakvo nasljeđe je rijetko pa generalno možemo reći da je mtDNA majčinog podrijetla (Freeland i sur. 2011). Upravo to majčino podrijetlo stvara problem kad ženke često ostaju vezane za mjesto rođenja, a mužjaci se razilaze te se njih kvalitetnije može pratiti uz pomoć Y

kromosoma koji se nasljeđuje po ocu i također je većinski nerekombinantan kromosom (Beebee i Rowe 2008).

Najznačajniji nekodirajući dio mtDNA čini D-petlja (*D-loop*) odnosno mitohondrijska kontrolna regija koja ima ulogu u inicijaciji DNA replikacije i transkripciji. Uz nju, kao najkorisniji genetički marker mtDNA je i citokrom b kod kojeg se mogu primjenjivati univerzalne početnice za mnoge različite vrste (Freeland i sur. 2011).

1.2. DOBRI DUPIN

Dobri dupin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) morski je sisavac. Pripada redu kitova (Cetaceae), porodici šiljatozubih dupina (Delphinidae) (Notarbartolo di Sciara i Birkun, 2010). Kozmopoliti su te su prisutni u gotovo svim umjerenim i tropskim morima svijeta. Ne pronalazimo ih jedino u hladnim vodama polarnih područja (Sharir i sur. 2011; Turk 2011). Možemo ih pronaći u priobalnim vodama, zatvorenim morima i otvorenim pučinama oceana, oko otoka i arhipelaga, uz strme obale, u tjesnacima, zaljevima pa čak i u poluzatvorenim eutrofnim vodama, lagunama, estuarijima i rijekama gdje rijetko, ali ipak zalaze (Bearzi i sur. 2008). Oble su glave, zdepastog tijela, pepeljasto sive boje – od najtamnije boje na leđima do prljavo bijelog trbuha (Turk 2011). Ipak, njihova morfologija je raznolika, polimorfizam pronalazimo u veličini tijela, morfologiji lubanje, boji, a sve ovisno o njihovoj geografskoj rasprostranjenosti, dostupnosti nutrijenata, pa čak i o tome pripadaju li obalnoj ili pučinskoj populaciji (Sharir i sur. 2011). Istraživanja su pokazala da su pučinski dupini koji uglavnom žive u oceanima veći od onih priobalnih dobrih dupina (Antolović i sur. 2006). Isto tako za obalne dobre dupine vrijedi da formiraju manje skupine i da su rezidentni u mjestu rođenja te migriraju unutar manjih geografskih udaljenosti, ne daleko od smjesta rođenja. S druge strane, pučinske populacije dobrih dupina se grupiraju u nestalne veće skupine, a upravo zbog nestalnosti grupe i većeg raspršenja jedinki imamo postojaniji genetički tok između populacija na velikim udaljenostima (Quéroil i sur. 2010). Novorođenčad dobrog dupina je dugačka oko jedan metar te narastu do otprilike 3,5 metara ako su mužjaci, a nešto manje ako su ženke. U Jadranskome moru ženke dobrog dupina su prosječne dužine 278 cm dok su mužjaci dugi u prosjeku 297 cm (Đuras Gomerčić 2006). Mužjaci postaju spolno zreli između 10. i 12. godine, a ženke još ranije, između 5. i 10. godine. Graviditet traje 12 mjeseci, a ženke rađaju svaku drugu ili treću godinu. Glavninu hrane čine ribe i glavonošci, a love skupnom strategijom. Skupinu čini oko deset jedinki u srodstvu. Komuniciraju i orijentiraju se eholokacijom (Turk 2011). Visoko su mobilni i kreću se velikim udaljenostima (Notarbartolo di Sciara i Birkun 2010; Sharir i sur. 2011). Wells i sur. (1999) objavili su

istraživanje u kojem su mjerili kretanja jedne jedinke iz populacije istočne obale sjevernog Atlantika, a koja je u 47 dana prošla 4200 km. U radu Mirimin i sur. (2010) spominju se dupini koji obilaze zapadnu, južnu i istočnu obalu Irske te se kreću u pravcima dugačkim i do 650 km. Bez obzira na to, dupini ipak pokazuju određeni stupanj vezanosti za pojedino područje i to prvenstveno ako žive u obalnom području i u skupini. Na područjima Sredozemnog mora, Crnog mora i sjevernoistočnog Atlantika pokazalo se da nema značajnijeg odvajanja spolova, iako je za dobre dupine poznato da mušjaci i ženke tvore skupine koje su rezidentne u određenom području dijele istu, no mušjaci često odlaze od majke u nova područja, dok ženke ostaju u području rođenja (Mirimin i sur. 2010). Pa tako Connor i sur. (2000) primjećuju da na zapadnoj australskoj obali postoje skupine mušjaka i ženki koj zajedno čine skupine u području rođenja, dok mala populacija na jugoistočnoj obali pokazuje izrazu rezidentnost ženki u području rođenja dok mušjaci odlaze u nova područja.

Sredozemno more je poluzatvoreno more, gotovo potpuno izolirano od Atlantskog oceana. Po svojstvima možemo ga podijeliti na dva dijela – istočni i zapadni dio. Istočni dio karakterizira viša temperatura, veći salinitet te oligotrofija. Kroz sicilijanski tjesnac miješa se voda zapadnog i istočnog Sredozemlja, ali na taj način da površinska istrošena voda ide sa zapada na istok, a dublja „osvježena“ voda s istoka na zapad što nikako ne pogoduje već postojećoj oligotrofiji na istočnom dijelu Sredozemnog mora. Zanimljivo je kako je tzv. „hotspot“ primarne produkcije Gibraltarski tjesnac, Jadransko i Ezejsko more, te se primarna produkcija smanjuje što se od ovih točaka udaljujemo (Sharir i sur. 2011).

Unutar Sredozemnog mora utvrđenoj je 21 vrsta kitova i dupina, od kojih je dobrom dupinu najbliži srodnik obični dupin (*Delphinus delphis* Linnaeus 1758) i plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba* Meyen 1833) (Notarbartolo di Sciara i Birkun 2010; Turk 2011). Zamijećeni su gotovo u cijelom obalnom pojasu mora osim u području sjeverozapadnog Ligurskog mora i sjeverozapadnog dijela zaljeva Vera koji se nalazi na istočnoj, mediteranskoj obali Španjolske uz regiju Murcia (Bearzi i sur. 2008). Populacija dobrog dupina Sredozemnog mora je fragmentirana i raspršena u male jedinice prvenstveno radi degradacije staništa (Notarbartolo di Sciara i Birkun 2010). Iako se ne poznaje okviran broj jedinki u Sredozemnom moru, poznato je da se gustoća pojavnosti dobrog dupina unutar Sredozemnog mora mijenja od četiri do 20 jedinki na 100 km². Isto tako se zna da je u posljednjih 60 godina broj dobrih dupina u Sredozemnom moru smanjen za oko 30% i da ih je najvjerojatnije još uvijek manje od 10 000 (Bearzi i sur. 2008; Notarbartolo di Sciara i Birkun 2010).

Prva istraživanja dobrih dupina u Sredozemnom moru započela su kasnih 1980-ih godina na sjevernom dijelu Mediterana, potaknuta smanjivanjem populacije zbog izlova, fatalnih

nesreća, slabljenjem ribljeg fonda, kemijskog zagađenja mora i drugih rizičnih čimbenika za samu populaciju. Godine 2006. IUCN proglašava populaciju dobrog dupina Sredozemnog mora „ranjivom“ te su započete prve akcije zaštite koje su do sada bile usporene zbog neujednačene literature, mnogih neobavljenih ili neobjavljenih istraživanja, različite metodologije za utvrđivanje broja dupina koje su donosile i različite rezultate te drugih razloga koji su otežavali procese zaštite i konzervacije (Bearzi i sur. 2008).

Kada se uspoređuju genetičke osobitosti populacija dobrih dupina na području Mediterana i okolnih mora najčešće se govori o pet utvrđenih populacija: crnomorska koja je i najrazličitija od ostalih, populacija istočnog Mediterana, populacija zapadnog Mediterana, populacija sjeveroistočnog Atlantika i populacija škotskih voda (Bearzi i sur. 2008). Populacije istočnog i zapadnog Mediterana, iako s nejasnom granicom koja ih dijeli, međusobno se razlikuju genetički, što je utvrđeno i s jezgrenim i mitohondrijalnim DNA markerima (Bearzi i sur. 2008), ali i u veličini. Dobri dupini istočnog Mediterana manjih su tjelesnih dimenzija nego dupini iz zapadnog dijela. Tu posebno treba naglasiti fenomen levantinskog nanizma, pojave izrazito manjih vrsta beskralježnjaka i kralježnjaka (tako i dupina) krajnje istočne (izraelske) obale Mediterana u usporedbi sa zapadnim dijelom. Međutim, ako se slika proširi i izvrši se usporedba populacije Sredozemnog mora s dobrim dupinima sjeveroistočnog Atlantskog oceana i sjeverozapadnog Tihog oceana, dobri dupini Sredozemnog mora manji su nego oceanski (Sharir i sur. 2011).

Migracije dobrih dupina unutar Sredozemnog mora, odnosno istočnog i zapadnog dijela vrlo su rijetke. Ipak postoje genetički dokazi da postoji određena migracija dupina prvenstveno sa zapada na istok (Sharir i sur. 2011). Migracije i genetički tok između populacija dobrih dupina Sredozemnog mora i populacija uz obalu Pirinejskog poluotoka nisu zamjećena (Bearzi i sur. 2008)

Jadransko more se proteže 870 km u smjeru sjeverozapad-jugoistok, a u svom najširem dijelu široko je oko 200 km (Stražičić 1989). Dio je sjeveroistočnog Mediterana koje karakterizira raznolikost ekotipova morskih staništa, s izrazito visokim stupnjem degradacije istih od strane ljudskog djelovanja, posebno u svom sjeverozapadnom dijelu. Ono je, po svojim osobinama, podijeljeno u tri podregije – plitki sjeverni dio, srednji dio te duboki južni dio (Gaspari i sur. 2013). U Jadranskom moru prisutna je samo jedna vrsta dupina, dobri dupin (*Tursiops truncatus*), dok je povijesno ovdje rasprostranjeniji bio i obični dupin (*Delphinus delphinus*). Postoje naznake da u južnom dijelu Jadranskoga mora učestalo boravi i plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*). U Jadransko more zalaze i druge vrste kitova, a može se, iako vrlo rijetko, naći i sredozemna medvjedica (Antolović i sur. 2006). Dobri dupin

je globalno, pa tako i u Jadranskom moru ugrožena vrsta (EN), U „Crvenoj knjizi sisavaca RH“ objavljeno je da populacija na području Cresa i Lošinja broji oko 120 jedinki na 1000 km² (Antolović i sur. 2006). Populacija dupina na tom području smanjila se za 39% razdoblju od 1995. do 2003. , a 2016. izbrojano je 459 jedinki na tom području, u skupinama po prosječno 9 jedinki (https://www.plavi-svijet.org/bw/wp-content/uploads/2017/10/ADP_zavr%C5%A1no-izvje%C5%A1%C4%87e_2016.pdf).

Problemi ugroženosti populacije dobrog dupina u cijelom Jadranu su višestruki – more je zatvoreno, pod pritiskom turizma i sve onečišćenije. Zbog toga što su na kraju hranidbenog lanca i što relativno dugo žive, u tkivima dupina dolazi do akumulacije ksenobitoka. Isto tako, dupini 80 % svog vremena koriste za lov, a kako su česti gosti u područjima gdje se riba uzgaja ili lovi, na meti su ribara. Degradacija staništa, smanjenje ribljeg fonda koji im je osnovna hrana, upetljavanje ili gutanje smeća (najčešće plastike), buka od morskog prometa koja ih uznemiruje i onemogućuje kvalitetnu ehokolokaciju čini ovu populaciju ugroženom (Antolović i sur. 2006; Notarbartolo di Sciara i Birkun 2010).

Europska direktiva o staništima uvrstila je dobrog dupina u dvije ključne liste – Annex II koja zahtijeva od članica Europske Unije da odrede područja koja su ključna za život ugroženih vrsta te ista uvrste u program konzervacije i zaštite; te Annex IV koja zahtijeva od države da provode nadgledanja postojećih rizičnih populacija i utvrđuju učinak negativnog ljudskog djelovanja na njih. Isto tako, tu je još niz dokumenata, zakona i direktiva kojima se državama članicama nameće da brinu konkretno o morskim staništima, prate status, mjere genetičku raznolikost, utvrđuju migratorne puteve morskih sisavaca i drugih vrsta, a sve sa svrhom očuvanja dosadašnjih populacija, te njihovo povećanje u budućnosti (Gaspari i sur. 2013).

1.2.1. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA POPULACIJA DOBRIH DUPINA

Istraživanja na populacijama dobrih dupina provode se diljem svijeta, ali su za Sredozemno more rijetka. Tako Viaud-Martinez i sur. (2008) uspoređuju morfologiju i genetičku raznolikost populacija dobrog dupina Crnog mora s populacijom dobrog dupina Sredozemnog mora i Atlantika uz pomoć kontrolne regije mtDNA. U tom radu utvrđen je slab genetički tok između ove dvije populacije pa tako i značajnija divergencija između mtDNA tih dviju populacija, prvenstveno zbog zatvorenosti Crnog mora, njegove specifičnosti u ekološkim karakteristikama, oceanografiji pa kao rezultat toga i u bioraznolikosti. U cijeloj regiji, dakle od istočnog Atlantika preko Mediterana do Crnoga mora sveukupno je utvrđeno 26 haplotipova kontrolne regije mtDNA od kojih je 6 haplotipova pronađeno u cijelom tom području, a ostali su vezani za pojedine populacije. Također, rad govori da je haplotipska

raznolikost Atlantika, zapadnog i sjeveroistočnog Mediterana (gdje su pripala i 4 uzorka iz Jadranskog mora) veća nego ona istočnog Mediterana i Crnog mora (Viaud – Martinez i sur., 2008). U radu Caballero i sur. (2011) znanstvenici su postavili hipotezu o mogućoj povezanosti populacije Sredozemnog mora s onom uz portorikansku obalu. Naime, znanstvenici pretpostavljaju da, bez obzira na geografsku udaljenost ova dva staništa, postoji mogućnost genetičkog toka, te da su jedinke iz Sredozemnog mora kolonizirale karipsku obalu te tamo stvorile novu populaciju učinkom osnivača. U skladu s tim, pronađeno je da dva uzorka portorikanskih dupina dijele isti haplotip s dupinima iz Sredozemnog mora, ali i s uzorcima dupina uhvaćenih kod Azora. Sličan rad, koji se bavio usporedbom svjetskih haplotipova također je zaključio da postoji velika mogućnost ancestralne povezanosti dobrih dupina portorikanske obale s populacijom Sredozemnog mora (Tezanos – Pinto i sur. 2009).

U radu Galov i sur. (2010) razmatrala se mogućnost nedavnog prolaska populacije dobrih dupina hrvatskog dijela Jadranskog mora kroz usko grlo i to prvenstveno jer je poznato da je populacija izrazito smanjena sredinom 20. stoljeća zbog izlova. Također se utvrđivala genetička raznolikost i prisutnost strukture populacije. Istraživanje je rađeno na 30 uzoraka, korišteno je 12 dinukleotidnih mikrosatelitnih lokusa, a rezultati su pokazali visoku genetičku različitost (veliki broj alela i visoka heterozigotnost), nepostojanost strukturiranosti populacije, a testovi potvrde „učinka uskog grla“ dali su kontradiktorne rezultate. Zašto je tome tako može se samo nagađati – jesu li statistike iz prošlog stoljeća o ubijanju kitova pretjerane, jesu li uzorci na kojima su rađeni testovi odgovarajući, koliko je doista jadranska populacija izolirana i ima li genetičkog toka od strane imigrantskih jedinki koje maskiraju pojavu „uskog grla“ (Galov i sur. 2010). Gaspari i sur. (2013) u svom radu, koji se također fokusira na populaciju dobrih dupina Jadranskog mora, ali obuhvaća i talijanski dio Jadrana, dolazi do zaključka kako ipak postoje naznake strukturiranosti populacije. Naglasila bih kako u radu nije konkretizirano niti jasno zaključeno je li uočena niska genetička divergencija populacije sjevernog Jadrana kao zasebnog bazena i populacije srednjeg i južnog Jadrana jest nešto što se može uzeti kao potvrda strukturiranosti ili samo pojava koja strukturiranost najavljuje kao moguću hipotezu. U ovom je radu utvrđeno 12 različitih haplotipova kontrolne regije mtDNA na području sjevernog Jadrana te njih osam na području srednjeg i južnog Jadrana. Na području Jonskog, Egejskog i Tirenskog mora pokazan je izrazito mali broj haplotipova – po 5 u svakome pojedinome moru. Kao dokaz visokoj genetičkoj raznolikosti, Gaspari i sur. (2013) radili su i na 12 mikrosatelitnih lokusa. Alelno bogatstvo najveće je u središnjem i južnom Jadranu ($A_r = 4,4$) te u sjevernom Jadranu ($A_r = 4,3$), a najmanje u Tirenskom moru ($A_r = 4,1$). Usporedba očekivane heterozigotnosti između populacija dobrih dupina u pet mora vrlo je slična i pokazuje visoku genetičku raznolikost –

najveću u središnjem i južnom Jadranu ($H_e=7,8$) te najmanju u Tirenskom moru (7,5). U radu je utvrđeno je da je najveća genetička diferencijacija pokazana između populacije dobrog dupina Jadranskog mora i populacije Egejskog mora, a najmanja između jadranske populacije i populacije Tirenskog mora. U radu se, osim genetičke raznolikosti, potvrđuje i prisutnost genetičkog toka i to u smjeru od sjevernog Jadrana prema susjednim područjima, gdje su se ženke pokazale glavnim medijatorima. Migracije dupina značajnije su u smjeru zapadni Jadran→istočni Jadran, te u smjeru Jadransko more → Jonsko more.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi i analizirati haplotipove kontrolne regije mitohondrijske DNA populacije dobrog dupina Jadranskog mora te usporediti rezultate s dosadašnjim sličnim radovima, a sve sa svrhom dobivanja konkretnije slike o genetičkom statusu populacije kako bi se ona zatim mogla koristiti kao temelj za daljnje konzervacijske postupke i zaštitu vrste.

2. MATERIJALI I METODE

U svrhu izrade ovog diplomskog rada, koristila sam 73 uzorka mišića dobrog dupina (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) čuvanih u 96%-tnom alkoholu pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jedino uzorak 273 jest bio uzorak kože dupina, a ne mišića. Uzorci su prikupljeni od rujna 2011. do ožujka 2018. s lešina dobrih dupina pronađenih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora te su pohranjeni u Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu nakon postmortalnih pregleda koji se provode u okviru *Protokola za dojavu i djelovanje u slučaju pronalaska uginulih, bolesnih i ozlijeđenih strogo zaštićenih morskih životinja (morske kornjače, morski sisavci i hrskavične ribe)* Hrvatske agencije za okoliš i prirodu. Kontrolna regija mtDNA uspješno je izolirana i sekvencirana u 61 uzroku. Dobivenim nukleotidnim sljedovima pridodala sam do sada obrađenih 108 sljedova obrađenih u diplomskom radu Divac Brnić (2012) što čini ukupno 169 sljedova mtDNA dobrih dupina Jadranskog mora obrađenih i uspoređenih u ovom diplomskom radu.

2.1. IZOLACIJA DNA IZ TKIVA I MJERENJE KONCENTRACIJE DNA

Izolaciju sam provodila po prilagođenom protokolu za izolaciju DNA iz tkiva uz pomoć „WizardGenomic DNA Purification Kit“ (Promega). Ta oprema za izolaciju DNA omogućuje izolaciju u četiri koraka – razbijanja stanice i jezgre; djelovanje RNAaze; taloženje i uklanjanje proteina te na samom kraju taloženje DNA uz pomoć izopropanola. Izolacija DNA provodi se kroz dva dana. Prvi dan sam u tubice dodala 300 μl otopine za lizu „Nuclei Lysis

Solution“. Nakon toga sam skalpelom u Petrijevoj zdjelici usitnila komadić tkiva veličine zrna riže te umetnula u tubice. Zatim sam dodala 1,5 μ l proteinaze K i inkubirala tkivo na 55 °C preko noći uz neprestano miješanje jačine 350 rpm-a u termomikseru „Eppendorf Thermomixer Comfort“. Sljedeći dan uzorke sam ohladila na sobnu temperaturu i centrifugirala zbog mogućeg kondenzata na čepu tubice. Nakon toga, dodala sam 100 μ l otopine za taloženje proteina „Protein Precipitation Solution“, snažno vorteksirala 20 sekundi i pet minuta hladila na ledu. Dok su se uzorci hladili, u nove sam tubice odpipetirala 300 μ l 100%-tnog etanola. Hladne uzorke sam centrifugirala tri minute na 13000 rpm-a i dobila talog u kojem su proteini, te supernatant u kojem je DNA. Taj supernatant sam dodala u etanol, pažljivo promiješala tubice, a zatim centrifugirala minutu na 13000 rpm-a. Nakon ovog centrifugiranja, DNA je u talogu, tako da sam supernatant samo dekantirala. Zatim sam dodala 300 μ l 70%-tnog etanola, pažljivo promiješala tubice, nanovo ih centrifugirala minutu na 13000 rpm-a te ovaj put supernatant pažljivo uklonila pipetom (DNA je ostala u talogu). Talog u tubicama sam zatim 30 minuta ostavila da se osuši na sobnoj temperaturi. U zadnjem koraku sam dodala 50 μ l otopine za rehidraciju „DNA Rehydration Solution“ i stavila DNA izolate u frižider na 4 °C.

U prostoru Botaničkog zavoda u Botaničkom vrtu grada Zagreba mjerila sam koncentraciju DNA izolata na spektrofotometru „NanoDrop 2000“ (ThermoScientific). Uzorke koji su pokazali koncentraciju nižu od 20 ng/ μ l te oni koji su bili koncentracije više od 150 ng/ μ l mjerila sam u više navrata kako bi dobila što točniju koncentraciju. Svrha je bila utvrditi uspješnost izolacije obzirom na razlike u kakvoći uzoraka te okvirnu koncentraciju DNA koja je kasnije pomogla pri boljoj optimizaciji PCR-a (polymerase chain reaction, tj. lančana reakcija polimerazom) i reakciji sekvenciranja.

2.2. PCR I ELEKTROFOREZA

PCR metoda, odnosno lančana reakcija polimerazom jest metoda koju koristimo za umnažanje željenog odsječka DNA. Patentirana je od strane Kary B. Mullisa osamdesetih godina prošlog stoljeća, a za metodu je dobio i Nobelovu nagradu za kemiju 1993 godine. Ta metoda se temelji na tri osnovna ciklusa: razdvajanju lanaca DNA, vezanju uzvodne i nizvodne početnice te elongacije uz pomoć termostabilne polimeraze (Pećina - Šlaus i sur. 2009). Za potrebe ovog diplomskog rada umnažala sam odsječak kontrolne regije mitohondrijske DNA uz pomoć uzvodne i nizvodne početnice. Uzvodna početnica je MTCRf (Hoelzel i Green 1998), a nizvodna početnica DUPr (Pauk 2007). Uz pomoć ovih početnica umnažala sam odsječak dugačak oko 900 parova baza (pb). Nakon nekoliko PCR postupaka

radi što bolje optimizacije odredila sam sljedeće – svi DNA izolati koji su imali manje od 20 ng/μl bili su svršteni u grupu za koju sam radila glavnu otopinu bez vode. Za ukupni volumen od 40 μl koristila sam 20 μl glavne otopine, 4 μl otopine početnice (dva μm) i 16 μl uzorka. S druge strane, DNA izolate koji su pokazivali koncentraciju višu od 100 ng/μl razrijedila sam, pojedinačno svaki uzorak, do optimalne koncentracije koja je mogla varirati između 20 i 100 ng/μl. Za razrijeđene uzorke zajedno s optimalnim, načinila sam glavnu otopinu s vodom: za ukupni volumen od 40 μl koristila sam 20 μl glavne otopine, 4 μl otopine početnice, 12 μl vode bez nukleaza te 4 μl uzorka. PCR je urađen na uređaju „2720 Thermal Cycler“ (Applied Biosystem) pri sljedećem programu: 35 °C – tri minute, 94 °C – 30 sekundi (denaturacija - razdvajanje DNA lanaca), 61 °C – 1:30 minuta (prijanjanje početnica), 72 °C – 1:30 minuta (elongacija – produljenje početnica). Ovaj ciklus ponovila sam 36 puta, a nakon zadnjeg ciklusa uzorci su bili izloženi 72 °C 20 minuta te ohlađeni na 4 °C do onog trenutka kada PCR produkte nisam izvadila iz uređaja.

Nakon PCR reakcije uradila sam elektroforezu kojom sam potvrdila umnažanje željenog PCR produkta te si pripomogla pri optimizaciji PCR reakcije za svoje uzorke. Elektroforeza je metoda koja uz pomoć električnog polja razdvaja molekule ovisno o njihovom naboju i veličini. Jači naboj i jače električno polje znače brže, a veća čestica sporije putovanje kroz gel (Ambriović Ristov i sur. 2007). Elektroforezu sam provela na 1%- tnom agaroznom gelu kojeg sam izradila na sljedeći način: u volumen od 100 mL 0,5 TBE pufera (Tris /Borate/EDTA pufer) dodala sam jedan gram agaroze koju sam u tom puferu i otopila na plameniku. Nakon laganog hlađenja, u otopinu sam dodala 10 μl boje „Syber Safe“, izlila gel u kadicu, stavila češljic i pustila gel da se u mraku, kroz pola sata, ohladi. U jažice sam stavljala po 3 μl uzorka pomiješanog s 3 μl „Loading Buffer“ puferom koji uzorku daje boju i gustoću kako bi pao na dno jažice. Uzorke sam razdvajala na 100 volti, 30 minuta. Elektroforezu sam pripremala u nekoliko navrata zbog što uspješnije optimizacije PCR-a, a nakon toga provjerila sve PCR produkte i potvrdila uspješno umnažanje 72 od 73 uzorka (uzorak D266 nije uspio biti umnožen).

2.3. PURIFIKACIJA I SEKVENCIRANJE

Proces purifikacije, kao i sekveničnu reakciju te daljnje genetičke analize vršila sam na Odsjeku za bioraznolikost pri Fakultetu za matematiko, naravoslovje in informacijske znanosti, Univerze na Primorskem u Sloveniji u sklopu Erasmus+ prakse. Purifikaciju sam obavljala uz pomoć opreme „ExoSAP-IT Product Cleanup Reagent“ (Applied Biosystems). Ta oprema sadrži enzime koji hidroliziraju jednolančane nukleinske kiseline, neugrađene

nukleotide te početnice. Mana ovog procesa jest što hidrolizira i dio naših uzoraka stoga uzorci koji su slabije umnoženi i u elektroforezi prikazuju vrpcu slabijeg intenziteta često bivaju neuspješno sekvencionirani (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78201.1.ML>). Za reakciju su mi bili potrebni: PCR produkt u volumenu 10 μl , Exo I volumena 0,2 μl , alkalna fosfataza 9 μl te voda bez nukleaza 2,8 μl . Reagense, osim vode, neprestano sam držala u ledu. Nakon što sam smiješala otopine i uzorke, centrifugirala sam ih i stavila uzorke u PCR uređaj „2720 ThermalCycler“ (Applied Biosystem). Program sam namjestila na 37 °C 45 minuta kako bi se potrebni enzimi aktivirali i djelovali, a zatim na 80 °C 15 minuta za njihovu deaktivaciju.

Nakon purifikacije slijede procesi pripreme uzoraka za reakciju sekvenciranja. Prvi korak se sastoji u provođenju reakcije slične PCR reakciji koja pri umnažanju u odsječke dodaje dideoksinukleotide označene fluorescentnim bojama, koje su specifične za pojedine baze, što nadalje iščitava genski analizator (sekvenator) (Freeland i sur. 2011). Reakciju sam radila u nekoliko navrata zbog što bolje optimizacije. Prvo sam pripremila dvije glavne otopine. Svaka od njih sadržavala je vodu bez nukleaza u volumenu 2,7 μl , Big Dye pufer 5x koncentriran u volumenu 2 μl i boju Big Dye u volumenu od 0,5 μl (osjetljiva na svijetlo). Ono po čemu se te dvije glavne otopine razlikuju su početnice (u koncentraciji 10 μM). U jednu glavnu otopinu ide 0,8 μl DUPr početnice, a u drugu otopinu 0,8 μl MTCRf početnice. Nakon toga sam od svake glavne otopine uzela 6 μl i miješala s 4 μl uzorka. Kada sam utvrdila da željenu dužinu nukleotidnog slijeda od 739 pb mogu umnožiti samo DUPr početnicom, ostale sam uzorke radila samo s glavnom otopinom koja je u sebi zadržavala tu početnicu. Nakon toga sam uzorke stavila u PCR uređaj „Pepstar, Thermal Cycler, 96 Universal“ (Pepqab Biotech) na program: 50 ciklusa koji su obuhvaćali 96 °C tri minute (1x), 96 °C deset sekundi, 50 °C deset sekundi i 60 °C četiri minute te na samom kraju jedan ciklus od sedam minuta na temperaturi od 72 °C.

Nakon provedene reakcije sekvenciranja u PCR uređaju s dodanim označenim dideoksinukleotidima pripremila sam pločicu i u nju stavila svoje uzorke, svaki po 10 μl . U svaki uzorak tada sam stavila 3,5 μl EDTA, te uzorke kratko centrifugirala. Nakon toga sam u svaki uzorak dodala 30 μl apsolutnog etanola, pločicu zatvorila gumenim poklopcem i ručno pomiješala okrećući pločicu deset puta. Zatim sam pločicu pokrila i držala je u mraku 15 minuta. Nakon toga pločicu sam centrifugirala. Centrifugu sam namjestila na 55 minuta, 4 °C na 4680 rpm-a. Radila sam na uređaju „Eppendorf centrifuge 5430 R“. Nakon centrifuge ispraznila sam pločicu te centrifugirala ponovno, 2 minute, na 4 °C pri 190 rpm-a. Poslije svršetka centrifugiranja pokrila sam uzorke i ostavila ih na zraku 5 minuta. Zadnji korak prije stavljanja u sekvenator bio je dodavanje formamida u volumenu 12 μl te kratko

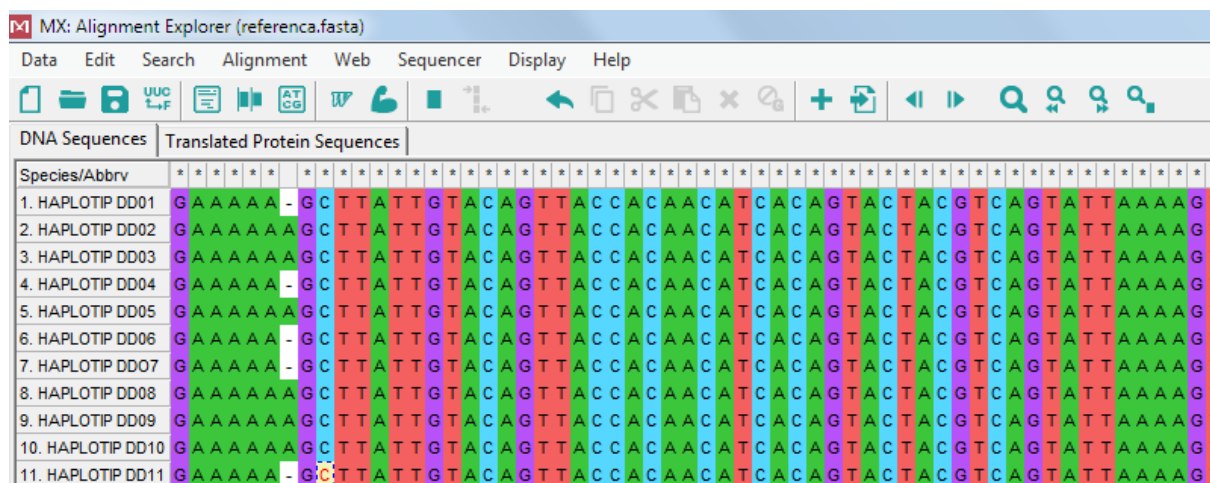
centrifugiranje. Pločicu s uzorcima stavila sam u genski analizator (sekvenator) „SeqStudio Genetic Analyzer“ (Thermo Fisher) (<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/digital-science.html>). Sekvenator se pokreće preko aplikacije „Thermo Fisher Cloud“ gdje se unose imena uzoraka i njihov smještaj na pločici, smjer iz kojeg se sekvencira te trajanje sekvenciranja ovisna o duljini odsječka (trajanje može biti kratko, srednje i dugo; moji su uzorci sekvencirani na „dugom sekvenciranju“).

2.4. ANALIZA PODATAKA

Prilikom analize dobivenih nukleotidnih sljedova radila sam na nekoliko programa sa svrhom uređivanja i poravnavanja nukleotidnih sljedova; usporedbe s referentnim sljedovima; utvrđivanjem broja dobivenih haplotipova i kojim uzorcima pripadaju te na samom kraju izrade mreža.

Računalni program Codon Code Aligner 9.0.1 koristila sam za unos sljedova, njihov pregled, usporedbu s elektroferogramom i potrebno nadopunjavanje te ispravak baza u slučajevima kada se nukleotidni slijed nije uspješno očitao. Isto tako program mi je omogućio rezanje sljedova na željenu duljinu i dobivanje konsenzus nukleotidnog sljeda (konsenzus nukleotidni slijed jest konačni slijed dobiven nakon što program analizira i poveže dva sljeda istog uzorka gdje je jedna dobivena uzvodnom, a druga nizvodnom početnicom) (<https://www.codoncode.com/aligner/AlignerHelp.pdf>).

„MEGA X“ noviji je program izveden od „MEGE“ koja se razvila u ranim 1990-im godinama. Zbog sve većeg interesa za porijeklo i evoluciju živih bića te genetičku raznolikost ovaj program je razvio niz mogućnosti poput poravnavanja i usporedbi nukleotidnih sljedova, utvrđivanje genetičke udaljenost, stvaranja genetičkih stabala itd. (Kumar i sur. 2018). U „MEGI X“ sam osim svojih dobivenih sljedova uvrstila i 108 nukleotidnih sljedova iz diplomskog rada Pauk (2007) i Divac Brnić (2012) te 6 obrađenih, ali neobjavljenih sljedova mtDNA dobrih dupina koji nisu iz Jadranskog mora (četiri iz Italije, dva iz Izraela) koji su služili za kasniju usporedbu haplotipova. Uz njih sam uvrstila i referentne sljedove dobivene iz navedenih radova Pauk (2007) i Divac Brnić (2012) koje su bile prikaz do tada poznatih 11 haplotipova. Nakon što sam sve sljedove poravnala izvela sam ih za daljnju obradu. Primjer poravnatih nukleotidnih sljedova kontrolne regije mtDNA dobrog dupina prikazan je na slici 2.



Slika 2. Program „MEGA X“ – primjer poravnatih sljedova i pregled nukletidnih razlike među njima

U programu FaBox – DNA collapser (1.5). koji je besplatan program za brzu i jednostavnu obradu te dobivanje informacija vezanih za nukleotidne sljedove (Villesen 2007) utvrdila sam broj haplotipova i njima pripadajuće uzorke, koje sam u programu DNAsp 5.10 (Librado and Rozas 2009) i potvrdila.

BioEdit, objavljen i pokrenut 1999. godine, jedan je od najkorištenijih bioinformatičkih alata za molekularne analize na svijetu. Taj je status prvenstveno zaslužio time što je besplatan program kojeg se može koristiti pri raznim operativnim sustavima. Svoj je razvoj započeo kao program namijenjen poravnanju nukleotidnih sljedova, ali je do 2007. godine, kada je zadnji put nadograđen, omogućio niz drugih mogućnosti poput označavanja raznih napomena, crtanja plazmida ili mapiranja restrikcijskih mjesta unutar nukleotidnog niza (Hall 2011). U njemu sam uređivala svoje dobivene haplotipove, haplotipove preuzete s GenBanka, poravnavala ih, skraćivala i mijenjala nazive po potrebi.

Mrežu haplotipova, koristeći metodu „Median-Joining Network“, izradila sam u programu PopART (Leigh i Bryant 2015). Radila sam dvije mreže – jednu samo s dobivenim haplotipovima dupina Jadranskog mora, a drugu kao usporedbu haplotipova naše jadranske populacije s haplotipovima dobrih dupina iz Izraela (2 uzorka) i zapadne talijanske obale (4 uzorka) (neobjavljeni rezultati) i onih objavljenih u genetičkoj bazi podataka GenBank (Benson i sur. 2012; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Iz GenBank-a sam preuzela 94 objavljenih haplotipova kontrolne regije mitohondrijske DNA iz područja istočnog i zapadnog Sredozemnog mora, Crnog mora te sjeveroistočnog Atlantika: no. KF650783-837 (Louis i sur. 2014); no. AY963588-626 (Natoli i sur. 2005). Sve preuzete haplotipove sam poravnala

sa svojim dobivenim haplotipovima te ih skratila na duljinu od 578 pb pri kojoj sam vršila daljnje usporedbe i analize. Preuzete haplotipove sam grupirala u šest geografskih područja – Jadransko more (CRO), Mediteran (MED), zapadni Mediteran (W_MED), istočni Mediteran (E_MED), sjeveroistočni Atlantik (NEA) i Crno More (BLACK_SEA) (slika 5.).

3. REZULTATI

3.1. USPJEŠNOST IZOLACIJE DNA

Uzorci mišića dobrih dupina porijeklom su od lešina koje su pronađene u različitim stupnjevima raspadanja. Najveći broj lešina pronađen je u uznapređovalom stupnju raspadanja tako da je bilo potrebno potvrditi uspješnost izolacije DNA. Isto tako, utvrđivanjem koncentracije lakše sam mogla optimizirati PCR koji je slijedio. DNA svih 73 uzorka uspješno je izolirana, ali je bila u različitim koncentracijama. Koncentracije su bile od onih minimalnih (oko 1 ng/μl) do visokih (npr. 1000 ng/μl). U tablici 1. sam prikazala koncentracije izolirane DNA svakog uzorka te sve koncentracije više od 100 ng/μl kategorizirala kao „visoka koncentracija DNA“, sve koncentracije između 20 – 100 ng/μl kao „optimalna koncentracija DNA“, a sve koncentracije niže od 20 ng/μl kategorizirala kao „niska koncentracija DNA“. Svaku koncentraciju koja je s prvim mjerenjem pokazala da je izvan „optimalne“ kategorije, mjerila sam u nekoliko navrata, ovisno o tome koliko je mjerenje variralo, a sve sa svrhom da potvrdim njihovu minimalnu ili maksimalnu vrijednost i dobijem koncentraciju što bližu onoj točnoj.

Tablica 1. Koncentracije izolirane DNA iz uzoraka mišića dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) mjereno spektrofotometrom „NanoDrop 2000“ (ThermoScientific), te one izmjerene u negativnim kontrolama izolacije

	UZORAK	KONCENTRACIJA DNA			
		1. mjerenje (ng/μl)	2. mjerenje (ng/μl)	3. mjerenje (ng/μl)	4. mjerenje (ng/μl)
VISOKA KONCENTRACIJA DNA	D256	114,8			
	D270	146,5			
	D279	132,8			
	D280	1020	1014,4		
	D288	681,2	89,2	95,1	
	D292	839,7	230,5	193,5	
	D297	593,5	181,6	136,1	
	D303	206,9	219,1		
	D305	443,3	990,2	176,4	187,6
	D311	643,2	1010,2	666,3	
	D316	1047,6	706,9	409,4	
	D317	393,7	120,9	57,6	60
	D321	319,7	798,5	384,6	
	D325	1880,8	1662,8		
	D332	528,2	455,8		
	D333	130	132,9		
	D337	639,4	419,1	258,4	41,4
	D338	1621,1	1366,7		
	D382	1375,5	1159,3		
	D385	212	45,9	39,3	
D388	859,4	233,2	187,4		
D399	769,2	487,4	142,4		
D417	142,5				
D425	315,5	341,9			
NISKA KONCENTRACIJA DNA	D255	18,4			
	D266	3,3	2,7		
	D273	0,2	0,6		
	D275	4,1			
	D278	7			
	D282	5,7			
	D301	5,2	4,9		
	D314	8,3	8,6		
	D339	13,2	12		
	D343	7	5,4		

Nastavak tablice 1.

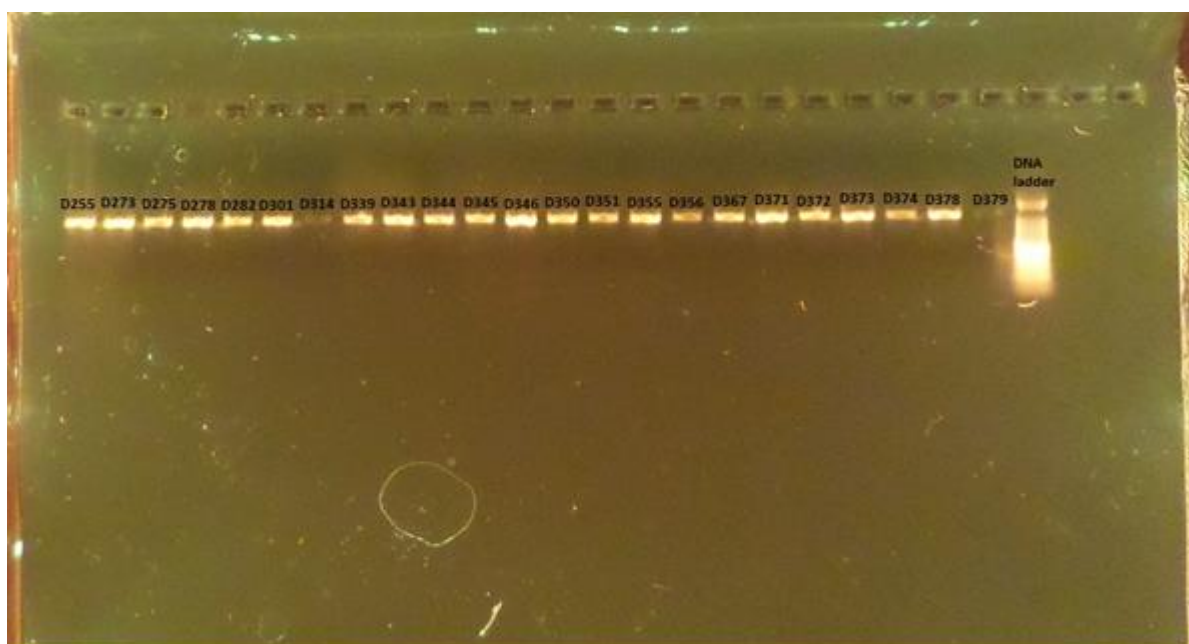
	UZORAK	KONCENTRACIJA DNA			
		1. mjerenje (ng/μl)	2. mjerenje (ng/μl)	3. mjerenje (ng/μl)	4. mjerenje (ng/μl)
	D344	2,8	1,5		
	D345	15	15,8		
	D346	9,3	10,5		
	D350	7,6	9,1		
	D351	7,5	7,4		
	D355	17,8	14,3		
	D356	1,9	0,2		
	D367	1,5	1		
	D371	6,8	7,2		
	D372	5,1	3,8		
	D373	5	5,1		
	D374	4,8	4,2		
	D378	5,1	5		
	D379	0,5	0,4		
	D386	3,7	2,7		
	D387	3	3,2		
	D390	2,1	1,7		
	D391	1,2	0,6		
	D402	-0,3	-0,4		
	D406	6,4	3,2		
	D407	1,6			
	D418	5,3	4,9		
	D432	15,7	54,3	16,2	
OPTIMALNA KONCENTRACIJA DNA	D262	27,5			
	D274	36,4			
	D276	47,6			
	D283	26,7			
	D284	22,1			
	D285	80,3			
	D286	25,3			
	D289	71,1			
	D290	61,7			
	D299	75,4			
	D312	32,8			
	D348	21,9			
	D354	21,1			

Nastavak tablice 1.

	UZORAK	KONCENTRACIJA DNA			
		1. mjerenje (ng/μl)	2. mjerenje (ng/μl)	3. mjerenje (ng/μl)	4. mjerenje (ng/μl)
	D358	29			
	D400	29,5			
	D403	81			
NEGATIVNA KONTROLA	K22.2.19	0,5			
	K28.2.19	2,1	0		
	K29.1.	-0,4			
	K8.2.	2,9	0,7		

3.2. USPJEŠNOST UMNAŽANJA ODSJEČKA KONTROLNE REGIJE MITOHONDRIJSKE DNA POMOĆU LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM

Nakon što sam provela PCR metodu na svim uzorcima dobila sam iznimno dobre rezultate. Samo je uzorak D266 izbačen iz daljnjeg istraživanja jer, unatoč trima pokušajima umnožavanja, nije umnožen niti jedanput. Sva ostala 72 uzroka pokazala su uspješno umnažanje. Rezultati elektroforeze za dio uzoraka prikazani su na slici 3.



Slika 3. Rezultati elektroforeze pokazuju uspješno umnožene PCR produkte. Oznake iznad vrpce su imena uzoraka. Uzorak D314 i D379 pokazuju nešto slabiju vrpce. DNA ladder (DNA ljestve) su marker veličine DNA fragmenata koji se nije uspješno razvukao.

3.3. REZULTATI SEKVENCIRANJA I DOBIVENI HAPLOTIPOVI

Nukleotidne sljedove duljine 739 pb dobila sam od 61 uzorka od ukupno 72 sekvencirana uzorka (84,7% uzoraka je uspješno analizirano). Uzorci D256, D270, D286, D297, D343, D374, D379, D403, D418, D425, D432 nisu uspješno sekvencirani. Nakon što sam svojim sljedovima dodala one ranije analizirane (Pauk 2007; Divac Brnić 2012), ukupni broj nukleotidnih sljedova kontrolne regije mtDNA iznosio je 169. Dakle, ukupno 169 uzoraka dupina pokazalo je postojanje 13 haplotipova, pri kojima su njih 11 (DD01 – DD11) već utvrđeni u radu Pauk (2007) i Divac Brnić (2012), a haplotipovi DD12 i DD13 su novoutvrđeni u ovom diplomskom radu. U tablici 2. prikazan je 61 uzorak dobrog dupina obrađen u ovom diplomskom radu s podacima o datumu i mjestu pronalaska, spolu i pripadajućem haplotipu.

Tablica 2. Oznaka uzorka s podacima o datumu i mjestu nalaza te spolu dobrog dupina i pripadajućem haplotipu

UZORAK	DATUM NALAZA	SPOL	MJESTO NALAZA	HAPLOTIP
262	15.02.2012.	ženka	Jelsa, Hvar, srednja Dalmacija	DD01
274	15.08.2012.	ženka	Starigrad, sjeverna Dalmacija	DD01
276	12.09.2012.	mužjak	Poreč, zapadna obala, Istra	DD01
283	29.10.2012.	ženka	Korčula, srednja Dalmacija	DD01
284	29.11.2012.	mužjak	Šibenik, sjeverna Dalmacija	DD01
288	12.02.2013.	ženka	Vanga, Brijuni, zapadna obala, Istra	DD01
289	24.03.2013.	mužjak	Šibenik, sjeverna Dalmacija	DD01
301	14.09.2013.	mužjak	Rovinj, zapadna obala, Istra	DD01
303	25.09.2013.	ženka	Lošinj, Primorje i Kvarner	DD01
311	22.11.2013.	ženka	Brač, srednja Dalmacija	DD01
316	18.03.2014.	mužjak	Krk, Primorje i Kvarner	DD01
321	07.06.2014.	mužjak	Ližnjan, istočna obala, Istra	DD01
332	27.08.2014.	mužjak	Rovinj, zapadna obala, Istra	DD01
333	27.08.2014.	ženka	Zambratija, Umag, zapadna obala, Istra	DD01
337	10.10.2014.	ženka	Novigrad, zapadna obala, Istra	DD01
339	18.10.2014.	mužjak	Poreč, zapadna obala, Istra	DD01
345	29.12.2014.	ženka	Červar, zapadna obala, Istra	DD01
348	13.06.2015.	mužjak	Valaliso, Rovinj, zapadna obala, Istra	DD01
350	27.06.2015.	mužjak	Poreč, zapadna obala, Istra	DD01
351	29.06.2015.	ženka	otvoreno more, Zadar, sjeverna Dalmacija	DD01
354	09.07.2015.	nepoznat	Crveni Vrh, zapadna obala, Istra	DD01
356	01.08.2015.	ženka	Molat, sjeverna Dalmacija	DD01

Nastavak tablice 2.

UZORAK	DATUM NALAZA	SPOL	MJESTO NALAZA	HAPLOTIP
373	05.02.2016.	ženka	Rijeka, Primorje i Kvarner	DD01
374	12.02.2016.	ženka	Pula, zapadna obala, Istra	DD01
386	24.07.2016.	ženka	Rogoznica, sjeverna Dalmacija	DD01
390	17.10.2016.	mužjak	Vir, sjeverna Dalmacija	DD01
399	20.02.2017.	mužjak	Seline, sjeverna Dalmacija	DD01
400	28.03.2017.	ženka	Mali Lošinj, Primorje i Kvarner	DD01
402	02.05.2017.	mužjak	Gajac, Pag, sjeverna Dalmacija	DD01
406	23.06.2017.	mužjak	Silba, sjeverna Dalmacija	DD01
417	28.08.2017.	ženka	Levan, istočna obala, Istra	DD01
367	09.10.2015.	mužjak	Vir, sjeverna Dalmacija	DD01
285	07.12.2012.	mužjak	Novigrad, zapadna obala, Istra	DD02
292	02.06.2013.	ženka	Rabac, istočna obala, Istra	DD02
305	01.10.2013.	mužjak	Rovinj, zapadna obala, Istra	DD02
382	13.07.2016.	mužjak	Limski kanal, zapadna obala, Istra	DD02
388	03.09.2016.	nepoznat	Vis, srednja Dalmacija	DD02
279	04.10.2012.	mužjak	Bale, zapadna obala, Istra	DD03
280	14.10.2012.	ženka	Ist, sjeverna Dalmacija	DD03
312	14.03.2014.	mužjak	Nerezine, Lošinj, Primorje i Kvarner	DD03
317	01.05.2014.	mužjak	Vrsar, zapadna obala, Istra	DD03
325	06.07.2014.	ženka	Hvar, srednja Dalmacija	DD03
358	05.08.2015.	ženka	Trasorka, Primorje i Kvarner	DD03
275	29.08.2012.	mužjak	Pelješac, južna Dalmacija	DD04
344	22.12.2014.	mužjak	Trogir, srednja Dalmacija	DD04
290	24.04.2013.	ženka	Poreč, zapadna obala, Istra	DD05
338	16.10.2014.	ženka	Rovinj, zapadna obala, Istra	DD05
385	23.07.2016.	nepoznat	Poreč, zapadna obala, Istra	DD05
255	15.09.2011.	mužjak	Rabac, istočna obala, Istra	DD11
273	09.08.2012.	nepoznat	Rovinj, zapadna obala, Istra	DD11
299	10.09.2013.	mužjak	Vrsar, zapadna obala, Istra	DD11
355	18.07.2015.	ženka	Ošljak, sjeverna Dalmacija	DD11
371	02.12.2015.	mužjak	Lošinj, Primorje i Kvarner	DD11
372	11.01.2016.	mužjak	Kaštel Stafilići, srednja Dalmacija	DD11
407	24.06.2017.	mužjak	između otoka Trstenika i Cresa, Primorje i Kvarner	DD11
314	16.03.2014.	mužjak	Split, srednja Dalmacija	DD12
387	25.07.2016.	nepoznat	Novigrad, zapadna obala, Istra	DD12
391	31.10.2016.	nepoznat	nema podataka	DD12
278	03.10.2012.	mužjak	Poreč, zapadna obala, Istra	DD13
282	27.10.2012.	ženka	Bale, zapadna obala, Istra	DD13
346	21.01.2015.	mužjak	Vanga, Brijuni, zapadna obala, Istra	DD13

Tablica 3. pokazuje kojim uzorcima pripada koji haplotip te haplotipsku učestalost. Najveću učestalost prikazuje haplotip DD01 s 54,40% (97 uzoraka), zatim haplotip DD02 s 10,65% (18 uzoraka) i haplotip DD03 s 10,06 % (17 uzoraka). Najmanju učestalost imaju haplotipovi DD06, DD07, DD08, DD09 i DD10 s 0,59%, svaki zastupljen jednom jedinkom. Novootkriveni haplotipovi DD12 i DD13 imaju jednaku učestalost 1,77%, jer je svaki zastupljen s tri jedinke. U tablici su prikazana i dva uzorka iz talijanskog dijela Jadranskog mora – T101 koji pripada haplotipu DD01 i T95 koji pripada haplotipu DD11.

Tablica 3. Prikaz haplotipova kontrolne regije mtDNA dobrog dupina Jadranskog mora s pripadajućim brojem uzoraka i učestalosti (crveno - uzorci analizirani u ovom diplomskom radu, crno - uzorci analizirani u Pauk (2007) i Divac Brnić (2012))

HAPLOTIP	UZORCI	BROJ UZORAKA	UČESTALOST(%)
DD01	D274, D276, D283, D289, D316, D321, D333, D337, D350, D351, D356, D373, D374, D400, D402, D406, D417, D367, D386, D399, D390, D311, D288, D262, D284, D354, D348, D345, D332, D303, D339, D301, 101, 102, 108, 113, 118, 120, 124, 126,127, 129, 134, 136, 138, 139, 142,161, 162, 167, 168, 169, 170, 172, 173, 195, 196, 197, 200, 202, 204, 206, 207, 209, 211, 22, 32, 38, 41, 46, 51, 55, 57, 80, 87, 91, 93, T101, 175, 215, 232, 212, 228, 171, 95, 231, 245, 186, 222,216, 227, B1, 221, 219, 234, 225, 235	97	57,40%
DD02	D285, D305, D388, D382, D292, 104, 117, 141, 143, 151, 152, 183, 184, 193, 28, 177, 214, 241	18	10,65%
DD03	D279, D280, D317, D325, D358, D312, 114, 131, 149, 159, 160, 205, 111, 248, 247, 145, 255	17	10,06%
DD04	D344, D275, 112, 174, 203, 181, 198, 190, 233	9	5,32%
DD05	D338, D290, D385, 128, 192, 64, 20, 217, 237	9	5,32%
DD06	133	1	0,59%
DD07	150	1	0,59%
DD08	194	1	0,59%
DD09	210	1	0,59%
DD10	223	1	0,59%
DD11	D355, D371, D372, D407, D299, D273, D255, T95	8	4,73%
DD12	D387, D391, D314	3	1,77%
DD13	D346, D282, D278	3	1,77%

Usporedbom 13 dobivenih haplotipa kontrolne regije mtDNA pronašla sam ukupno 26 polimorfni (varijabilnih) pozicija (3,52%). Omjer tranzicije i transverzije iznosi $R=7,2$. Haplotipska raznolikost (H_d) iznosi 0,6831 a nukleotidna (π) 0,01085. Srednji broj razlika između pojedinih parova haplotipova iznosi 8,006. Od 13 haplotipova najbliži haplotipu DD01 su haplotipovi DD06 i DD07 koji pokazuju po samo jednu nukleotidnu promjenu (tranzicija) pri usporedbi s haplotipom DD01. Haplotip DD06 se od haplotipa DD01 razlikuje

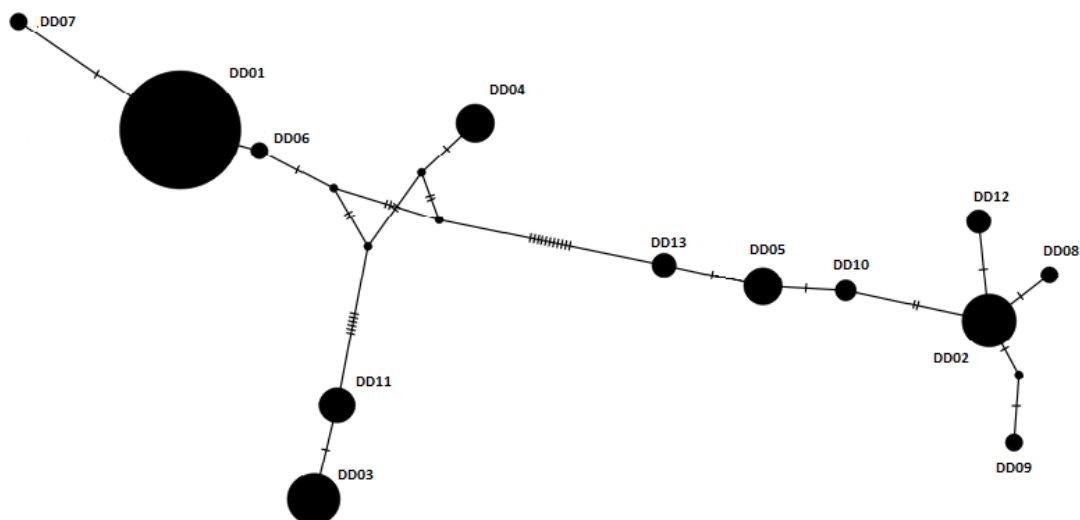
na 293. poziciji gdje se nalazi citozin umjesto timina, dok haplotip DD07 na poziciji 268. ima timin umjesto citozina. Haplotip DD01, zajedno s haplotipovima DD04, DD06, DD07, DD11, DD12 i DD13, pokazuje prisutnost još jedne mutacije - delecije. Ostali haplotipovi na tom mjestu imaju adenin (tablica 4).

Tablica 4. Prikaz varijabilnih nukleotidnih pozicija unutar 13 dobivenih haplotipova kontrolne regije mtDNA dobrih dupina Jadranskog mora.

Haplotip	VARIJABILNE NUKLEOTIDNE POZICIJE																									
	7	97	148	204	244	263	264	268	272	277	278	281	293	302	356	369	390	391	462	500	501	504	540	555	603	712
DD01	-	T	C	C	T	T	A	C	T	C	T	C	T	G	T	T	C	C	T	G	T	A	T	T	G	C
DD02	A	.	T	T	.	C	C	A	.	T	C	.	C	A	C	.	.	T	C	A	.	.	.	C	A	T
DD03	A	C	.	T	C	T	C	.	C	.	.	C	T	A	C
DD04	C	.	.	.	C	.	C	.	C	A	C	.	T
DD05	A	.	T	T	.	C	C	A	.	T	C	.	C	A	C	.	.	T	C	A	.	.	C	.	.	T
DD06	C
DD07	T
DD08	A	.	T	T	.	C	C	A	.	T	C	.	C	A	C	.	.	T	C	A	C	.	.	C	A	T
DD09	A	.	T	T	.	C	C	A	.	T	C	T	C	A	C	.	.	T	C	A	.	G	.	C	A	T
DD10	A	.	T	T	.	C	C	A	.	T	C	.	C	A	C	.	.	T	C	A	.	.	C	.	A	T
DD11	.	C	.	T	C	T	C	.	C	.	.	C	T	A	C
DD12	.	.	T	T	.	C	C	A	.	T	C	.	C	A	C	.	.	T	C	A	.	.	.	C	A	T
DD13	.	.	T	T	.	C	C	A	.	T	C	.	C	A	C	.	.	T	C	A	.	.	C	.	.	T

Usporedba dva izraelska uzorka (neobjavljeni rezultati) pokazala je novi haplotip nazvan DD14 koji je dvjema mutacijskim razlikama odvojen od haplotipa DD02, dok su od četiri analizirana uzorka sa zapadne talijanske obale (Ligursko i Tirensko more) pokazala da dva od njih pripadaju haplotipu DD01, jedan uzorak haplotipu DD02 te jedan haplotipu DD10.

Na slici 4. je prikazana mreža 13 dobivenih haplotipova. Haplotip DD02 pokazuje centralnu ancestralnu ulogu (nalazi se u sredini zvjezdolikog dijela mreže) jer se od njega jednom mutacijskom stopom odvajaju haplotipovi DD08 i DD12, a dvjema mutacijskim stopama haplotipovi DD09 i DD10. Haplotipovi DD06 i DD07 udaljeni su jednu mutacijsku stopu od DD01, deset mutacijskih stopa od DD11 i jedanaest mutacijskih stopa od DD03. Haplotip DD09 najudaljeniji je od haplotipa DD01 s 21 mutacijskom stopom. Najudaljeniji haplotipovi su haplotip DD07 koji se s 22 mutacijske stope odvađa od haplotipa DD09.



Slika 4. Mreža 13 haplotipova utvrđenih u dobrim dupina Jadranskog mora. Veličina kruga predstavlja učestalost pojedinog haplotipa u istraženom uzorku (169 uzoraka dobrih dupina).

Na slici 5. prikazana je mreža jadranskih haplotipova u usporedbi s haplotipovima kontrolne regije mitohondrijske DNA dobrih dupina iz Izraela i zapadne talijanske obale dobivenih u ranijem istraživanju (neobjavljeno), te s 94 haplotipova pronađenim u bazi GenBank (Natoli i sur. 2005; Louis i sur. 2014). Sve haplotipove je bilo potrebno skratiti na 578 pb pri čemu su se izgubila određena polimorfna mjesta – kod jadranskih haplotipova izgubljena su dva polimorfna mjesta. Upravo iz razloga skraćivanja određeni su se haplotipovi spojili u jedan. Zbog skraćivanja su se spojili (odn. postali su identični) sljedeći haplotipovi pronađeni u ovom istraživanju:

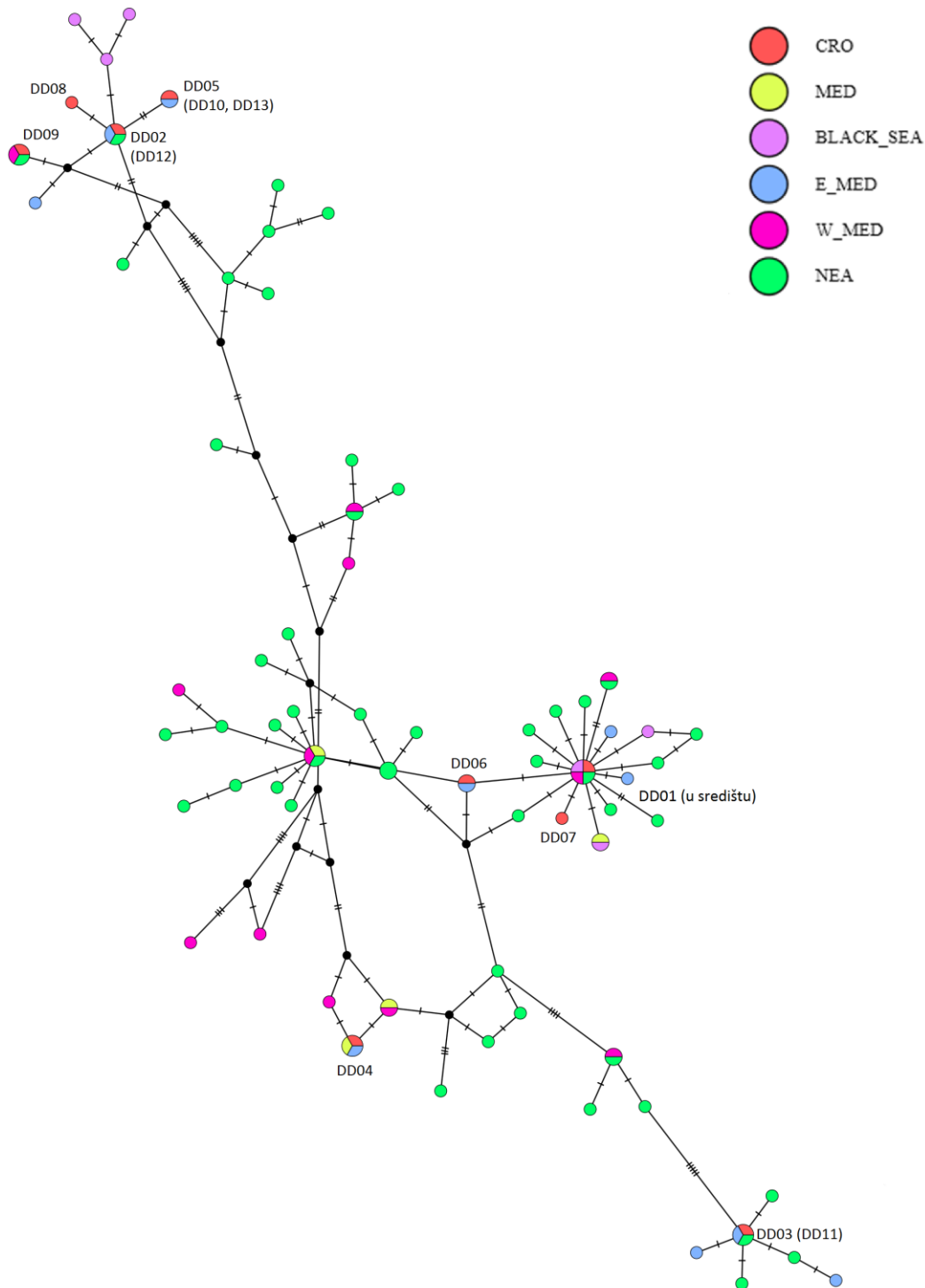
-DD02 i DD12

-DD03 i DD11

-DD05, DD10 i DD13.

Konačno sam za mrežu koristila 71 haplotip koji sam grupirala u šest geografskih područja – Jadransko more (CRO), Mediteran (MED), zapadni Mediteran (W_MED), istočni Mediteran (E_MED), sjeveroistočni Atlantik (NEA) i Crno More (BLACK_SEA) (slika 5). Iako smo skraćivanjem izgubili razlučivost, iz mreže ipak možemo očitati određene podatke. Haplotip DD01 pronađen je i u jedinki na području sjeveroistočnog Atlantika, zapadnog Sredozemnog mora te Crnoga mora, a nalazi se u sredini zvjezdolikog dijela mreže iz kojeg se, između jedne do tri mutacijske razlike, odvaja najveći broj haplotipova pronađenih u sjeveroistočnom Atlantiku. Zvjezdolik oblik prikazuju i haplotipovi DD03 i DD11 koji u ovom slučaju čine

jedan haplotip, a od kojih se odvajaju tri haplotipa iz sjeveroistočnog Atlantika s po jednom mutacijskom razlikom te jedan haplotip pronađen u istočnom Sredozemnom moru također s jednom mutacijskom razlikom. Za haplotipove DD01, DD03 i DD11 koji bivaju u središtu zvjezdolikog oblika mreža možemo pretpostaviti moguću ancestralnu ulogu. Haplotip DD09 pronađen je i u jedinkama zapadnog Sredozemnog mora i sjeveroistočnog Atlantika, a haplotipovi DD02 i DD12 koji su se spojili pronađeni su i u jedinki istočnog Sredozemnog mora i sjeveroistočnog Atlantika. Haplotip DD04 pronađen je samo u Sredozemnom moru, a DD07 i DD08 samo u Jadranskom moru. Iako se nazire grupacija haplotipova iz područja sjeveroistočnog Atlantika, jasna struktura između i unutar ovih geografskih područja na mreži se ne može očitati.



Slika 5. Prikaz odnosa haplotipova prisutnih u Jadranskom moru s ostalim neobjavljenim haplotipovima te onima preuzetim iz GenBank baze. Haplotipovi Jadranskog mora i Izraela su posebno označeni, dok su ostali grupirani u geografska područja u kojima su nađeni. Veličina kruga nije proporcionalna učestalosti haplotipova već pokazuje u koliko geografskih regijama su pojedini haplotipovi nađeni. Skraćenice označavaju: CRO (hrvatski dio Jadranskog Mora); MED (Sredozemno more); BLACK_SEA (Crno more); E_MED (istočni dio Sredozemnog mora); W_MED (zapadni dio Sredozemnog mora); NEA (sjeveroistočni Atlantski ocean).

4. RASPRAVA

Dobri dupin jedan je od najistraživanijih vrsta dupina, prvenstveno zbog svoje kozmopolitske rasprostranjenosti, ali i jedna od najčešćih vrsta morskih sisavaca u zatočeništvu i zoološkim vrtovima. Bez obzira na to, „Crvena knjiga“ Međunarodnog saveza za očuvanje prirode (*International Union for Conservation of Nature Red Data Book*) dobrog dupina karakterizira kao „nedovoljno poznatom“ vrstom (Caballero i sur. 2011). Kao vrsta koja živi u moru, smatra se rizičnom skupinom jer znanstvenici drže da su vode izrazito ranjiva staništa pod direktnim antropogenim utjecajem (Mirimin i sur. 2010). Iako globalno gledajući jesu istraživani, genetičkih analiza, temeljenih na molekularnim markerima, nedostaje na prostorima ne samo Sredozemnog mora nego i drugih mora Europe. Problematika nedostatka istraživanja na području Sredozemnog mora, ali i okolnih mora još je veća jer otežava konzervaciju i uspješniju zaštitu dobrih dupina što je neophodno.

Uzorci mišićnog tkiva (i jedan uzorak kože dobrog dupina), iz kojeg je bilo potrebno izolirati mtDNA, bili su u raspadajućem i lošem stanju s obzirom da su uzorci uzimani s pronađenih lešina. Stoga je bio očekivan niski postotak uspješno izoliranih i sekvenciranih mtDNA za koje sam vjerovala da su kod većine uzoraka degradirane. Međutim, od 72 uzorka rezultati su dobiveni za njih 61 što čini 84% uspješno obrađenih uzoraka. To je postignuto time što sam nakon izolacije DNA mjerila njezinu koncentraciju, ovisno o njoj prilagođavala postavke PCR-a i po potrebi nekoliko puta ponavljala postupak.

Vrijednost haplotipske raznolikosti (H_d) od 0,6831 ukazuje na relativno visoku genetičku raznolikost jadranske populacije. U radu Gaspari i sur. (2013) rađene su usporedbe genetičke raznolikosti između Jadranskog mora koje je u radu podijeljeno na sjeverni bazen te srednji i južni bazen koji su zajedno obuhvaćeni, s okolnim morima (Jonsko, Egejsko i Tirensko more). U tom radu dobivena haplotipska raznolikost dobrog dupina iz Jadrana još je i veća. Među 29 uzoraka iz sjevernog Jadrana pronađeno je 12 haplotipova s haplotipskom raznolikošću od $H_d = 0,82$; među 16 uzoraka iz središnjeg i južnog Jadrana pronađeno je osam haplotipova, a haplotipska raznolikost iznosila je $H_d = 0,87$. Relativno velik broj haplotipova na manjem broju uzoraka te veća haplotipska raznolikost u njihovom radu najvjerojatnije je posljedica obrađene cjelokupne kontrolne regije mtDNA u duljini od 920 pb, ali i to što su imali uzorke i s talijanskog dijela Jadrana, dok su u ovom radu obrađeni samo uzorci s hrvatskog dijela. U radu nije napisano koliki je broj uzoraka s hrvatske, a koliki s talijanske obale. Ipak, slična je nukleotidna raznolikost dobivena u ovom radu i u radu Gaspari i sur. (2013): $\pi = 0,01085$ utvrđena je u ovom radu, a u Gaspari i sur. (2013) za sjeverni Jadranu $\pi = 0,0107$; za središnji i južni Jadran $\pi = 0,009$. S obzirom da haplotipovi

dobiveni u Gaspari i sur. (2013) nisu uvedeni u GenBank bazu, nisam ih mogla usporediti s haplotipovima dobivenim u ovom radu, niti sam ih mogla uvrstiti u izradu mreže. Usporedbom jadranske populacije i populacije na prostoru irskih voda (zapadna obala Irske) možemo primjetiti kako je naša populacija do sada pokazala 13 haplotipova (utvrđeno na 169 uzoraka), a populacija irskih voda 14 (utvrđeno na 107 uzoraka). Vrlo su slične i haplotipska te nukleotidna raznolikost između ovih dviju populacija – naša iznosi $H_d = 0,683$, a $\pi = 0,01085$, dok irski iznosi $H_d = 0,643$ i $\pi = 0,011$. Ipak naših 13 haplotipova sadrže 25 polimorfnih mjesta na duljini od 739 pb (3,383%), a 14 irskih haplotipova sadrži 36 polimorfnih mjesta na duljini od 544 pb (6,618%) (Mirimini i sur. 2010). Iz svega toga je vidljivo da populacija dobrog dupina iz Jadranskog mora pokazuje na podjednaku ili malo nižu raznolikost od populacije irskih voda. Haplotipovi nađeni u populaciji dobrog dupina irskih voda nisu analizirani prilikom izrade mreže zbog kratkog preklapanja s našim jadranskim haplotipovima (494 pb).

Talijanski uzorci sa zapadne obale Jadranskog mora dijele haplotipove s onima na istočnoj obali Jadrana (haplotipovima DD01, DD02 i DD10). Međutim, tek s većim brojem uzoraka sa zapadne, talijanske obale i usporedbom s našima, dobili bi bolji uvid u moguću strukturiranost populacije dobrih dupina u Jadranskom moru, te postoji li ona u smjeru sjever – jug ili u smjeru zapad – istok.

Mreža unutar koje je rađena usporedba jadranskih haplotipova s haplotipovima susjednih geografskih područja nije pokazala jasnu strukturu. Razlog tome može biti kratak nukleotidni slijed kojim se gube polimorfna mjesta, a time i razlučivost. To se primjerice vidi kroz stapanje haplotipova poput jadranskih DD05, DD10 i DD12 što je čak tri haplotipa Jadranskoga mora koji su zbog skraćivanja postali jedan. Također teško je govoriti i o evoluciji ili migraciji dobrih dupina na temelju ovih haplotipova. Mreža usporedbe haplotipova prikazuje tek nekakvu grupaciju haplotipova s područja Sjeveroistočnog Atlantika i iz nje ne možemo iščitati strukturu. Ipak to ne znači da ona ne postoji. Naime, segregacija populacija potvrđena je u radu Mirimini i sur. (2010) i to u smjeru zasebnih populacija istočnog sjevernog Atlantika, zapadnog sjevernog Atlantika i Mediterana (Mirimini i sur. 2010). U radu Fernández i sur. (2011) pronalazimo istraživanje o genetičkom diskontinuitetu između populacija dobrih dupina škotskih voda i Sredozemnog mora, ali i obalnog područja Pirinejskog poluotoka čije su vode dio sjeveroistočnog Atlantika. Nadalje, zbog izrazito slabog istraživanja u Sredozemnom moru, nedovoljno velik uzorak analiziranih haplotipova Sredozemnog mora nam onemogućuje bolje sagledavanje strukturiranosti populacije, ali vjerujem da će se pri daljnim istraživanjima jasnije vidjeti i dvije osnovne subpopulacije Sredozemnog mora, one istočne i one zapadne. Ono što se može pretpostaviti iz

mreže je da su haplotipovi u središtu zvjezdolikog oblika mreža, poput haplotipa DD01, ancestralni haplotipovi.

Istraživanja oceanskih populacija dobrih dupina i onih zatvorenih mora pokušavaju dobiti sliku što morfoloških, što genetičkih, što razlika u ponašanju između njih. Za oceanske populacije specifično je da postoje dva osnovna ekotipa – obalni i pučinski. Obalni ekotipovi genetički su izoliranije i diferenciranije populacije od ostalih, ali unutar sebe dijele manju genetičku raznolikost, ali često pokazuju „autohtone“ haplotipove, dok pučinski ekotip dijeli haplotipove koji su prisutniji na puno većem geografskom području zbog jakog genetičkog toka pa tako pučinske populacije karakterizira veća genetička raznolikost. Zatvorena mora poput Sredozemnog često nemaju zaseban pučinski tip. Ti ekotipovi osobito su istraženi u Meksičkom zaljevu i istočnom dijelu sjevernog Atlantskog oceana i to na temelju morfologije, opterećenja parazitima, hematologiji, prehrani, raspršenosti i naravno genetici (Caballero i sur. 2011)..

U radu Gaspari i sur. (2013) raspravlja se o populacijskoj strukturi unutar Jadranskog mora, međutim rezultati su ostali nejasni i kontradiktorni. S jedne strane govori se kako je Jadransko more gledajući ga bilo u pravcu sjever – jug, bilo u pravcu zapad – istok, izrazito različito u dubinama, cirkulacijama vodenih masa, svojstvima obale i dna te kao takvo podloga za genetički diferencijaciju i strukturiranost populacije koja je i dokazana mjerenjima vršenim s lokusom iz jezgrene DNA. S druge strane, u istom se radu govori kako mjerenja pokazuju jasan genetički tok, kako genetička usporedba koja je koristila mtDNA kao molekularni marker, između populacije dobrih dupina istočne i zapadne obale Jadrana pokazala beznačajnu, nepostojeću divergenciju i kako su mjerenja koja su trebala pokazati korelaciju između genetičke raznolikosti i geografskih osobina mora pokazala nepostojanje iste, rad je dao posredan zaključak da jasne strukture nema (Gaspari i sur. 2013).

Populacijska struktura morskih sisavaca ovisi o više faktora: rezidentnost u određenom staništu, resursima za život, demografskim promjenama, ekološkim i okolišnim promjenama te o samom ponašanju životinja (Caballero i sur. 2011, Fernández i sur. 2011). Kada se spoje biološke osobitosti dupina poput izrazite mobilnosti, sklonosti ka razdvajanju i nepostojanje fizičkih geografskih barijera u njihovom staništu koje bi ih spriječile u širenju, vrlo često istraživanja dokazuju izraziti genetički tok među populacijama i nepostojanje konkretne strukturiranosti čak i unutar većih oceanskih područja (Fernández i sur. 2011). S druge strane, postoje populacije dupina koje pokazuju strukturiranost na manjim geografskim područjima, poput populacije u Crnom moru, uz obalu Škotske ili zapadne obale Floride (Wells 1986; Parsons i sur. 2002; Viaud –Martinez i sur. 2008; Caballero i sur. 2011). Populacija dobrih

dupina Jadranskog mora, iako pripada manjem geografskom području, ne pokazuje strukturiranost populacije i to najvjerojatnije zbog mogućeg dotoka gena od strane populacije dobrih dupina istočnog Mediterana (Galov i sur. 2010). Međutim, konačan zaključak u vezi strukturiranosti populacije još se ne može donijeti, a odgovor se može dobiti samo kroz niz znanstvenih istraživanja uz različite pristupe, radom na različitim markerima, s različitim analizama i usporedbama. Sve to onda donosi pravu sliku na čijem se temelju dalje grade odluke o konzervacijskim postupcima i postupcima zaštite populacije.

4. ZAKLJUČAK

1. U ovom radu uspješno je sekvencioniran 61 uzorak dobrog dupina iz Jadranskog mora, a za daljnju obradu preuzeto je još 108 uzoraka iz diplomskih radova Pauk (2007) i Divac Brnić (2012). U ukupno 169 uzoraka, na kontrolnoj regiji mtDNA duljine 739 pb dobrog dupina, utvrđeno je 13 haplotipova (DD01 – DD13).
2. Najveću učestalost pokazao je haplotip DD01 s 57,40% (97 uzoraka), a najmanju haplotipovi DDO6, DDO7, DD08, DD09 i DD10 s učestalošću od 0,59%, odnosno zastupljenošću samo s jednom jedinkom.
3. Analiza 13 dobivenih haplotipa kontrolne regije mtDNA pokazala je 25 polimorfnih (varijabilnih) pozicija. Haplotipska raznolikost (H_d) iznosi 0,6831 a nukleotidna (π) 0,01085. Srednji broj razlike između pojedinih parova haplotipova iznosi 8,006. Te vrijednosti ukazuju na relativno visoku genetičku raznolikost jadranske populacije.
4. Mreža haplotipova dobrih dupina Jadranskog mora pokazuje da haplotip DD02 ima centralnu ancestralnu ulogu.
5. Mreža od ukupno 71 haplotipa duljine 578 pb, dobivenih u ovom radu i preuzetih s GenBanka, ne pokazuje jasnu filogeografsku strukturiranost populacija. Neki haplotipovi pronađeni su na više geografskih područja.
6. Populacija Jadranskih dupina nije pokazala strukturiranost u ovom istraživanju, iako je ovo pitanje nejasno i zahtjeva daljnja istraživanja korištenjem nuklearnih lokusa.

5. LITERATURA

Ambriović Ristov, A. (gl.ur) (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković. Zagreb

Antolović, J., Frković, A., Grubešić, M., Holcer, D., Vuković, M., Flajšman, E., Grgurev, M., Hamidović, D., Pavlinić, I. i Tvrtković, N. (2006): Uvod; Ugrožene vrste. Crvena knjiga sisavaca Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, str .14, 52-53

Ballard, J.W.O. i Whitlock, M. C. (2004): The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744

Bearzi, G., Fortuna, C. M. i Reeves, R. R. (2008): Ecology and conservation of common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the Mediterranean Sea. *Mammal Review* 39: 92-123

Beebee, T. i Rowe, G. (2008): An introduction to molecular ecology. Second edition. Oxford University Press, Oxford

Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I. i Lipman, D. J. (2002): Genbank. *Nucleic Acids Research* 30: 17-20

Caballero, S., Islas – Villanueva, V., Tezanos – Pinto, G., Duchene, S., Delgado-Estrella, A., Sanchez-Okrucky, R. i Mignucci-Giannoni, A.A. (2011): Phylogeography, genetic diversity and population structure of common bottlenose dolphins in the Wider Caribbean inferred from analyses of mitochondrial DNA control region sequences and microsatellite loci: conservation and management implications. *Animal Conservation* 15: 95-112

Connor, R.C., Wells, R.S., Mann, J. i Read, A.J. (2000): The bottlenose dolphin. Social Relationships in a Fission – Fusion Society. U: Mann, J., Connor, R. C., Tyack, P.L. i Whitehead, H. (ur). *Cetacean Societies*. University of Chicago Press, Chicago: 91-126

Divac Brnić, D. (2012): Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA i kranimetrijske osobitosti dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskog mora. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet

Đuras Gomerčić, M. (2006): Rast, spolni dimorfizam i morfometrijske osobitosti dobrog dupina (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) iz Jadranskog mora. Doktorski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Fernández, R., Begoña Santos, M., Pierce, G. J., Llavona, Á., López, A., Silva, M. A., Ferreira, M., Carrillo, M., Cermeño, P., Lens, S. i Piertney, S. B. (2011): Fine – scale genetic structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Atlantic coastal waters of the Iberian Peninsula. *Hydrobiologia* 670: 111-125

Freeland, J. R., Kirk, H. i Petersen, S. D. (2011): *Molecular Ecology*. Second edition. West Sussex: Wiley – Blackwell

Galov, A., Kocijan, I., Lauc, G., Đuras Gomerčić, M., Gomerčić, T., Arbanasić, H., Šatović, Z., Šeol, B., Vuković, S. i Gomerčić, H. (2011): High genetic diversity and possible evidence of a recent bottleneck in Adriatic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mammalian Biology* 76: 339-344

Gaspari, S., Holcer, D., Mackelworth, P., Fortuna, C., Frantzis, A., Genov, T., Vighi, M., Natali, C., Rako, N., Banchi, E., Chelazzi, G. i Ciofi, C. (2013): Population genetic structure of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Adriatic Sea and contiguous regions: implications for international conservation. Published online in Wiley Online Library, (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/aqc.2415.

Hall, T. (2011): BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences* 2: 60-61

Hoelzel A. R. i Green A. (1998): PCR protocols and population analysis by direct DNA sequencing and PCR-based DNA fingerprinting. U: Hoelzel A.R. (ur). *Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach*. Second edition. Oxford University Press, Oxford

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. i Tamura, K. (2018): MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549

Leigh, J. W. i Bryant, D. (2015): PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1110-1116

Librado, P. i Rozas, J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452

Louis, M., Viricel, A., Lucas, T., Peltier, H., Alfonsi, E., Berrow, S., Brownlow, A., Covelo, P., Dabin, W., Deaville, R., de Stephanis, R., Gally, F., Gauffier, P., Penrose, R., Silva, M. A., Guinet, C. i Simon-Bouhet, B. (2014): Habitat-driven population structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the North-East Atlantic. *Molecular Ecology* 23: 857-874

Mirimin, L., Miller, R., Dillane, E., Berrow, S.D., Ingram, S., Cross, T.F. i Rogan, E. (2010): Fine-scale population genetic structuring of bottlenose dolphins in Irish coastal waters. *Animal Conservation* 14: 342-353

Natoli, A., Birkun, A., Aguilar, A., Lopez, A. i Hoelzel, A.R. (2005): Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the Royal Society* 272: 1217-1226

Notarbartolo di Sciara, G. i Birkun, Jr., A. (2010): Conserving whales, dolphins and Black Seas. An ACCOMBAS status report,4

Park, C. B. i Larsson, N. G. (2011): Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Journal of Cell Biology* 193: 809-818

Parsons, K.M., Noble, L.R., Reid, R.J. i Thompson, P.M. (2002): Mitochondrial genetic diversity and population structuring of UK bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): is the NE Scotland population demographically and geographically isolated? *Biological Conservation* 108: 175-182

Pauk, M. (2007): Određivanje slijeda kontrolne regije mitohondrijske DNA dobrog dupina *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet.

Pećina –Šlaus, N., Nikuševa Martić, T., Perić, J. i Raič, A. (ur). (2009): Odabrane metode molekularne biologije. Medicinska naklada. Zagreb.

Quérrouil, S., Freitas, L., Cascão, I., Alves, F., Dinis, A., Almeida, J.R., Prieto, R., Borràs, S., Matos, J.A., Mendonça, D. i Santos, R.C. (2010): Molecular insight into the population structure of common and spotted dolphins inhabiting the pelagic waters of the Northeast Atlantic. *Marine Biology* 157: 2567-2580

Sharir, Y., Kerem, D., Gol'din, P. i Spanier, E. (2011): Small size in the common bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* in the eastern Mediterranean: a possible case of Levantine nanism. *Marine Ecology Progress Series* 438: 241-251

Stražičić, N. (1989): Pomorska geografija Jugoslavije. Školska knjiga, Zagreb.

Tezanos-Pinto, G., Baker, C.S., Russell, K., Martien, K.K., Baird, R.W., Hutt, A., Stone, G., Mignucci-Giannoni, A.A., Caballero, S., Endo, T., Lavery, S., Oremus, M., Olavarria, C. i Garrigue, C. (2009): A worldwide perspective on the population structure and genetic diversity of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in New Zealand. *Journal of Heredity* 100: 11-24

Turk, T. (2011): Pod površinom Mediterana. Školska knjiga, Zagreb.

Viaud-Martinez, K. A., Brownell, R. L., Komnenou, A. i Bohonak, A.J (2008): Genetic isolation and morphological divergence of Black Sea bottlenose dolphins. *Biological Conservation* 141: 1600-1611

Villesen, P. (2007): FaBox: an online toolbox for FASTA sequences. *Molecular Ecology Notes* 7: 965-968

Wells, R.S. (1986): Population structure of bottlenose dolphins: behavioral studies along the central west coast of Florida. Contract Report (45-WCNF-5-00366) to the National Marine Fisheries Service. Southeast Fishiers Center.

Wells, R. S., Rhinehart, H.L., Cunningham, P., Whaley, J., Baran, M., Koberna, C. i Costa, D.P. (1999): Long distance offshore movements of bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science* 15: 1098-1114

5.1. WEB IZVORI (po redoslijedu pojavljivanja u tekstu)

Plavi svijet, Institut za istraživanje i zaštitu mora. Dostupno na: https://www.plavi-svijet.org/bw/wp-content/uploads/2017/10/ADP_zavr%C5%A1no-izvje%C5%A1%C4%87e_2016.pdf [29.11.2019.]

Thermo Fisher Scientific. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78201.1.ML> [1.10.2019.]

ThermoFisher Scientific. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/digital-science.html> [3.10.2019.]

CodonCode Aligner User Manual. Dostupno na: <https://www.codoncode.com/aligner/AlignerHelp.pdf> [8. 10. 2019.]

GenBank Overview. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [18.7.2019.]

ŽIVOTOPIS

Moje ime je Magdalena Medved. Rođena sam 25.11.1994. godine u Virovitici. Nakon završetka osnovne škole, u školskoj godini 2009./2010 upisujem Katoličku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Virovitici koju završavam s odličnim uspjehom. Akademske godine 2013./2014. upisujem Odjel za biologiju na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera kojeg završavam završnim radom na temu Slavonsko-srijemski podolac – autohtona hrvatska pasmina. 2017./2018. akademske godine upisujem PMF Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek, smjer eksperimentalna biologija, modul: fiziologija i imunobiologija.

Uporna sam, marljiva i strpljiva osoba s otvorenim pogledima prema mnogim aspektima života. Vjeran sam prijatelj, komunikativan i dobar kolega koji će se uvijek truditi biti od pomoći. Veliki sam lokalpatriot, pomalo introvertirana i ćudljiva te ponekad nespretna.

Dugi niz godina bavila sam se suvremenim plesom, a bila sam i polaznica dramskog studija. Na fakultetu sam zavoljela folklor i volontiranje. U slobodno vrijeme pišem kratke priče, čitam različitu literaturu, bavim se tjelovježbom, boravkom u prirodi i druženju s prijateljima. Nakon završetka diplomskog studija, želja mi je nastavak školovanja i dobivanja titule doktora znanosti, ali i osnivanje obitelji te ostvarivanju i u književnim krugovima.