

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Galov

Genetička raznolikost populacije dobrog dupina *Tursiops truncatus*
s osvrtom na druge vrste kitova (Cetacea) Jadranskog mora

Doktorska disertacija
predložena Biološkom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
doktora prirodnih znanosti biologije

Zagreb, 2007

Ova je disertacija izrađena u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Ivana Bašića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Istraživanje je provedeno uz novčanu potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Zdravstvene i ostale biološke osobitosti morskih sisavaca Jadranskog mora“ (0053317) voditelja prof. dr. sc. Hrvoja Gomerčića i Društva za spas dupina (Gesellschaft zur Rettung der Delphine) iz Münchena.

Dio laboratorijskog rada proveden je kod prof. dr. sc. Gordana Lauca u DNA laboratoriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Najljepše zahvaljujem prof. dr. sc. Gordanu Laucu i prof. dr. sc. Zlatku Šatoviću, mom bratu mr. sc. Tomislavu Gomerčiću i ocu prof. dr. sc. Hrvoju Gomerčiću, te svim suradnicima znanstveno-istraživačkog projekta „Zdravstvene i ostale biološke osobitosti morskih sisavaca Jadranskog mora“. Također zahvaljujem dr. sc. Heleni Četković, mr. sc. Ivanu Birušu, Snježani Džijan, dipl. ing., mr. sc. Ivni Kocijan i Neli Nikolić, dipl. ing., te prof. dr. sc. Ivanu Bašiću i svim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Posebno zahvaljujem mojoj majci Veri Gomerčić.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorska disertacija

Genetička raznolikost populacije dobrog dupina *Tursiops truncatus* s osvrtom na druge vrste kitova (Cetacea) Jadranskog mora

Ana Galov

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

Sažetak

Dobri dupin (*Tursiops truncatus*) jedina je vrsta morskih sisavaca koja stalno nastanjuje hrvatski dio Jadranskog mora, a brojnost na tom području joj se procjenjuje na 220 do 250 jedinki. U Hrvatskoj je dobar dupin ugrožena i zakonom zaštićena vrsta. Premda je za zaštitu ugroženih vrsta od velikog značaja održanje genetičke varijacije unutar populacija, do sada nisu provedena istraživanja genetičke raznolikosti ni na jednoj vrsti kitova u Hrvatskoj. Ovo istraživanje je provedeno na 34 uzorka dobrog dupina iz Hrvatske, pet iz Izraela, 12 uzoraka plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*), pet glavatog dupina (*Grampus griseus*), jednom krupnozubbog dupina (*Ziphius cavirostris*) i dva uzorka velikog sjevernog kita (*Balaenoptera physalus*) korištenjem 12 mikrosatelitskih lokusa (EV1, EV14, EV37, EV94, TexVet3, TexVet5, TexVet7, D08, D14, D18, D22, D28) i dijela kontrolne regije mitohondrijske DNA dugačkog oko 470 pb. Genska raznolikost hrvatske populacije dobrog dupina relativno je visoka (0,669). Samo lokus D28 pokazuje značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, te se ta populacija može smatrati skupinom panmiktičkih jedinki. Nisu nađeni dokazi da je populacija nedavno prošla kroz „usko grlo“. Analiza molekularne varijance ukazuje da 11% varijacije otpada na varijaciju između hrvatske populacije i izraelskih uzoraka; dok samo 5,6% varijacije otpada na varijaciju između jedinki sjevernog i južnog Jadrana. Haplotipska raznolikost jadranske populacije dobrog dupina relativno je niska (0,557), ali je nukleotidna raznolikost relativno visoka (0,022); za razliku od tih vrijednosti u uzorcima plavobijelih dupina (0,667 i 0,007 redom). U obje vrste nađeno je po pet haplotipova. Nije nađena podudarnost između topologije genealoškog stabla i geografskog porijekla uzoraka dobrih dupina. U vrste plavobijeli dupin umnaža se svih 12 mikrosatelitskih lokusa, a u vrste glavati dupin umnažaju se svi lokusi osim TV5, te su svi lokusi polimorfni.

(105 stranica, 14 slika, 18 tablica, 146 literaturna navoda, jezik izvornika - hrvatski)

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, 10000 Zagreb, Hrvatska

Ključne riječi: dobar dupin / genetička raznolikost / Jadransko more / kontrolna regija mitohondrijske DNA / mikrosateliti / morski sisavci / populacijska genetika

Mentor: Prof. dr. sc. Ivan Bašić

Ocjenjivači: prof.dr.sc. Mirjana Kalafatić, prof.dr.sc. Ivan Bašić, prof.dr.sc. Gordan Lauc

Rad prihvaćen: 7. ožujka 2007.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral Thesis

Genetic diversity of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and notes on genetic diversity of other cetacean species in the Adriatic Sea

Ana Galov

Department of Animal Physiology
Faculty of Science
Rooseveltova trg 6, Zagreb

Abstract

The bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) is the only resident marine mammal species in Croatian part of the Adriatic Sea, with number estimated at 220 to 250 individuals. It is endangered and legally protected species in Croatia. Although a general concern for the conservation of endangered species is the maintenance of genetic variation within populations, no research has been done on genetic variation of any cetacean species in Croatia, up to now. In this thesis 34 bottlenose dolphin samples from Croatia, five from Israel, 12 striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*), five Risso's dolphin (*Grampus griseus*), a Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) and two fin whale (*Balaenoptera physalus*) samples were analysed by twelve microsatellite loci (EV1, EV14, EV37, EV94, TexVet3, TexVet5, TexVet7, D08, D14, D18, D22, D28) and 470bp fragment of the mitochondrial DNA control region. Gene diversity for Croatian population of bottlenose dolphin is relatively high (0.669). Deviation from HW equilibrium was detected only in locus D28. Other loci did not show deviation from HWE, suggesting panmixia in population. No evidence of bottleneck was found. Analysis of molecular variance indicated that 11% of the variance was among Croatian and Israeli populations and only 5.6% of the variance was among northern and southern regions of the Adriatic. Haplotype diversity of Croatian bottlenose dolphin population is relatively low (0.557), but the nucleotide diversity is relatively high (0.022), as opposed to haplotype diversity (0.667) and nucleotide diversity (0.007) of striped dolphin. In both species five unique haplotypes were found. No congruence between topology of bottlenose dolphin genealogy tree and geographic origin of the samples was found. All microsatellite loci and all but TV5 were successfully amplified in striped and Risso's dolphin, respectively and all loci were polymorphic.

(105 pages, 14 figures, 18 tables, 146 references, original in Croatian)

Thesis deposited in: National and University Library Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, 10000 Zagreb, Croatia

Keywords: Adriatic Sea / bottlenose dolphin / genetic diversity / marine mammals / microsatellite / mtDNA control region / population genetics

Supervisor: Ivan Bašić, D.V.M., PhD, Professor

Reviewers: Mirjana Kalafatić, PhD, Professor; Ivan Bašić, D.V.M., PhD, Professor; Gordan Lauc, PhD, Professor

Thesis accepted: March 7th 2007.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Kitovi (Cetacea).....	5
2.1.1. Dobri dupin.....	6
2.1.2. Ostale vrste kitova uključene u ovo istraživanje.....	8
2.2. Genetička raznolikost.....	11
2.3. Metode istraživanja genetičke raznolikosti.....	11
2.3.1. Mikrosatelitski lokusi.....	14
2.3.1.1. Određivanje veličina alela mikrosatelitskog lokusa (genotipizacija).....	16
2.3.2. Mitohondrijska DNA (mtDNA).....	19
2.3.2.1. Sekvenciranje mtDNA.....	20
2.3.2.2. Početnice za sekvenciranje kontrolne regije mtDNA.....	21
2.4. Literaturni pregled genetičke raznolikosti i molekularne ekologije istraživanih vrsta kitova.....	23
2.4.1. Istraživanja na vrsti dobri dupin.....	23
2.4.2. Istraživanja na ostalim vrstama kitova uključenim u ovo istraživanje.....	25
3. MATERIJALI I METODE	27
3.1. Sakupljanje uzoraka.....	28
3.1.1. Uzorci dobrog dupina.....	30
3.1.2. Uzorci ostalih vrsta kitova.....	30
3.2. Izolacija DNA.....	31
3.2.1. Izolacija DNA metodom isoljavanja.....	32
3.2.2. Izolacija DNA korištenjem komercijalno dostupnog kita.....	33
3.3. Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa.....	33
3.3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	33
3.3.2. Elektroforeza i analiza rezultata elektroforeze.....	36
3.3.2.1. Priprema uzoraka za elektroforezu.....	36
3.3.2.2. Elektroforeza.....	36
3.3.2.3. Analiza rezultata elektroforeze.....	36
3.3.3. Statistička analiza genotipova.....	37

3.3.3.1. Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže.....	37
3.3.3.2. Procjena neravnoteže vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium).....	37
3.3.3.3. Procjena „uskog grla“ (engl. bottleneck).....	37
3.3.3.4. Procjena udaljenosti među jedinkama.....	38
3.3.3.5. Analiza molekularne varijance (AMOVA).....	38
3.4. Sekvenciranje kontrolne regije mitohondrijske DNA.....	39
3.4.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	39
3.4.2. Provjera PCR proizvoda elektroforezom u agaroznom gelu.....	40
3.4.3. Pročišćavanje PCR proizvoda.....	41
3.4.4. Sekvenciranje.....	41
3.4.5. Analiza rezultata sekvenciranja.....	42
3.4.6. Intra-populacijske mjere genetičke raznolikosti.....	42
3.4.7. Usporedba sljedova korištenih u ovom istraživanju sa sljedovima preuzetih iz GenBank baze podataka.....	43
3.4.8. Prikaz odnosa između haplotipova.....	43
4. REZULTATI.....	44
4.1. Mikrosatelitski genotipovi.....	45
4.1.1. Dobri dupin.....	45
4.1.1.1. Mikrosatelitski genotipovi i uspješnost genotipizacije.....	45
4.1.1.2. Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže.....	46
4.1.1.3. Procjena neravnoteže vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium).....	46
4.1.1.4. Procjena „uskog grla“ (engl. bottleneck).....	51
4.1.1.5. Udaljenost između jedinki.....	51
4.1.1.6. Analiza molekularne varijance (AMOVA).....	51
4.1.2. Ostale vrste kitova uključene u istraživanje.....	55
4.1.2.1. Umnažanje mikrosatelitskih lokusa razvijanih za vrstu dobri dupin u drugim vrstama reda kitova (engl. cross-species amplification).....	55
4.2. Sljedovi kontrolne regije mitohondrijske DNA.....	60
4.2.1. Uspješnost sekvenciranja kontrolne regije mitohondrijske DNA.....	60
4.2.2. Raznolikost sljedova dobrih dupina.....	61
4.2.3. Usporedba dobivenih sljedova dobrih dupina sa sljedovima preuzetim iz GenBank baze podataka.....	64
4.2.4. Raznolikost sljedova plavobijelih dupina.....	66

4.2.5. Usporedba dobivenih sljedova plavobijelih dupina sa sljedovima preuzetim iz GenBank baze podataka.....	68
4.2.6. Dio kontrolne regije mtDNA velikog sjevernog kita.....	70
5. RASPRAVA.....	71
6. ZAKLJUČCI.....	78
7. CITIRANA LITERATURA.....	81
PRILOZI.....	98
Životopis.....	99
Popis radova.....	102

1. UVOD

Dobri dupin (*Tursiops truncatus*) vrsta je kita zubana rasprostranjena po cijelome svijetu, od umjereno hladnih do tropskih mora u obje hemisfere, uglavnom u obalnim područjima (Jefferson i sur. 1993, Rice 1998). Dobri dupin jedina je stalno nastanjena vrsta kita u hrvatskom dijelu Jadranskog mora, makar u njemu povremeno borave i neke druge vrste kitova koje redovito nastanjuju Sredozemno more. Brojnost populacije dobrog dupina u hrvatskom dijelu Jadranskog mora procijenjena je na oko 220 do 250 jedinki (Gomercic i sur. 2002, Gomerčić i sur. 2004). U Republici Hrvatskoj su zakonom strogo zaštićeni dobri dupin i sve ostale vrste kitova koje se zateknu u Jadranskom moru (Narodne novine 2005, Narodne novine 2006).

U posljednjih nekoliko godina intenzivno se proučava genetička raznolikost dobrog dupina u raznim dijelovima svijeta (Natoli i sur 2004, Viaud i sur 2004, Sellas i sur 2005, Parsons i sur 2006). Međutim, u Jadranskom moru do sada nisu provedena populacijsko-genetička istraživanja dobrih dupina, a niti ostalih vrsta kitova koji se tamo mogu zateći. Jedan od glavnih razloga tomu vjerojatno je teška dostupnost uzoraka i logistički problemi koji su prisutni kod sakupljanja uzoraka. Zahvaljujući projektu istraživanja morskih sisavaca na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, sustavno smo sakupljali i istraživali sve uginule jedinke dupina i ostalih kitova za koje se saznalo u zadnjih dvanaest godina. Ti uzorci predstavljaju vrijednu zbirku, te sam na njoj provela populacijsko-genetička istraživanja jadranske populacije dobrog dupina, a uz nju sam istražila i uzorke ostalih vrsta kitova koji su sakupljeni u sklopu gore navedenog projekta, a to su: plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*), glavati dupin (*Grampus griseus*), krupnozubi dupin (*Ziphius cavirostris*), te veliki sjeverni kit (*Balaenoptera physalus*).

Svrha istraživanja

Svrha istraživanja je dati znanstveni doprinos poznavanju biologije dobrog dupina, posebice populacije u Jadranskom moru i pridonijeti znanstvenim istraživanjima plavobijelog, glavatog i krupnozubog dupina, te velikog sjevernog kita.

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je procijeniti razinu genetičke raznolikosti i strukturu populacije dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskog mora, te utvrditi da li je i u kojem stupnju jadranska populacija dobrih dupina odvojena od ostatka populacije u Sredozemnom moru. Isto tako je cilj ovog istraživanja istražiti učinkovitost odabranih mikrosatelitskih biljega za

istraživanje strukture populacije svih vrsta kitova uključenih u ovo istraživanje, te istražiti raznolikost sljedova kontrolne regije mitohondrijske DNA.

Opseg rada

Istraživanje sam provela na 34 uzorka dobrog dupina, 12 uzoraka plavobijelog dupina, pet uzoraka glavatog dupina, jednom uzorku krupnozubog dupina i dva uzorka velikog sjevernog kita nađenih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Također sam istražila i pet uzoraka dobrog dupina iz Izraela. Za usporedbu sljedova kontrolne regije mitohondrijske DNA dodatno sam koristila sljedove pohranjene u računalnoj bazi podataka National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Metode

Koristila sam dvije metode koje se koriste u istraživanjima genetičke raznolikosti, molekularne ekologije, konzervacijske genetike i sličnim, a to su genotipizacija mikrosatelitskih lokusa i sekvenciranje kontrolne regije mitohondrijske DNA.

Mikrosateliti su vrlo popularni molekularni biljezi jer su polimorfni, pokazuju visoku razinu genetičke različitosti, kodominantni su i nasljeđuju se jednostavnim Mendelskim načinom nasljeđivanja (Page i Holmes 1998).

Mitohondrijska DNA zbog svog malog genoma jednostavne strukture i organizacije, haploidnosti, majčinskog nasljeđivanja, nedostatka rekombinacije i introna također predstavlja vrlo koristan molekularni biljeg. Uz to mtDNA posjeduje regije koje evoluiraju različitim brzinama, što omogućava rješavanje filogenetskih problema na različitim taksonomskim razinama (Zhang i Hewitt 1996). Za filogenetska istraživanja koja se protežu od razine vrste do razine roda koriste se varijabilniji dijelovi mtDNA, a to su dijelovi gena za citokrom b (Kocher i sur. 1989, Rosel i sur. 1994, Dalebout i sur. 2002) i kontrolna regija mtDNA (Pichler i sur. 2001, Natoli i sur. 2006).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kitovi (Cetacea)

Životinje iz reda kitova (Cetacea) su sisavci koji cijeli svoj život provode u vodi. Postoji 83 vrsta kitova, od kojih 80 vrsta nastanjuje mora, a tri vrste slatke vode. Dije se na dva podreda: kitove usane (Mysticeti) i kitove zubane (Odontoceti) (Rice 1998). Svi kitovi pokazuju velike prilagodbe za život u vodi. Glavne strukturalne modifikacije njihovih tijela uključuju gubitak stražnjih udova i izduženost tijela zbog hidrodinamične učinkovitosti (Jefferson i sur. 1993). Različite vrste kitova pokazuju različitu socijalnu organizaciju i ponašanje. Tako neke vrste žive samotno, neke žive u manjim skupinama, dok druge žive u velikim skupinama (Reeves i sur 2002).

Jedina vrsta koja stalno nastanjuje Jadransko more iz reda kitova je dobri dupin – *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). U njemu pak povremeno borave i neke druge vrste kitova koje redovito nastanjuju Sredozemno more, a to su najčešće plavobijeli dupin - *Stenella coeruleoalba* (Mayen, 1833) i glavati dupin - *Grampus griseus* (Cuvier, 1812), dok se obični dupin - *Delphinus delphis* Linnaeus, 1758 i krupnozubi dupin - *Ziphius cavirostris* Cuvier, 1823, te veliki sjeverni kit - *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758) ovdje pojavljuju znatno rjeđe (Gomerčić i sur. 2004). Uz navedene vrste, Sredozemno more stalno nastanjuju i bijelogrli dupin – *Globicephala melas* (Traill, 1809), te glavata ulješura – *Physeter catodon* Linnaeus, 1758 (Notarbartolo di Sciara i Demma 1994).

Veliki sjeverni kit pripada podredu kitova usana, porodici brazdastih kitova (Balaenopteridae). Ostale vrste koje povremeno borave u Jadranskom moru pripadaju podredu kitova zubana, i to porodici brazdastih dupina (Ziphiidae) pripada krupnozubi dupin, dok ostale tri vrste dupina – plavobijeli dupin, glavati dupin i obični dupin pripadaju porodici šiljatozubih dupina (Delphinidae). Sistematiku istraživanih vrsta prikazala sam u Tablici 1.

U Republici Hrvatskoj su zakonom strogo zaštićeni dobri dupin i sve ostale vrste kitova koje se zateknu u Jadranskom moru (Narodne novine 2005, Narodne novine 2006).

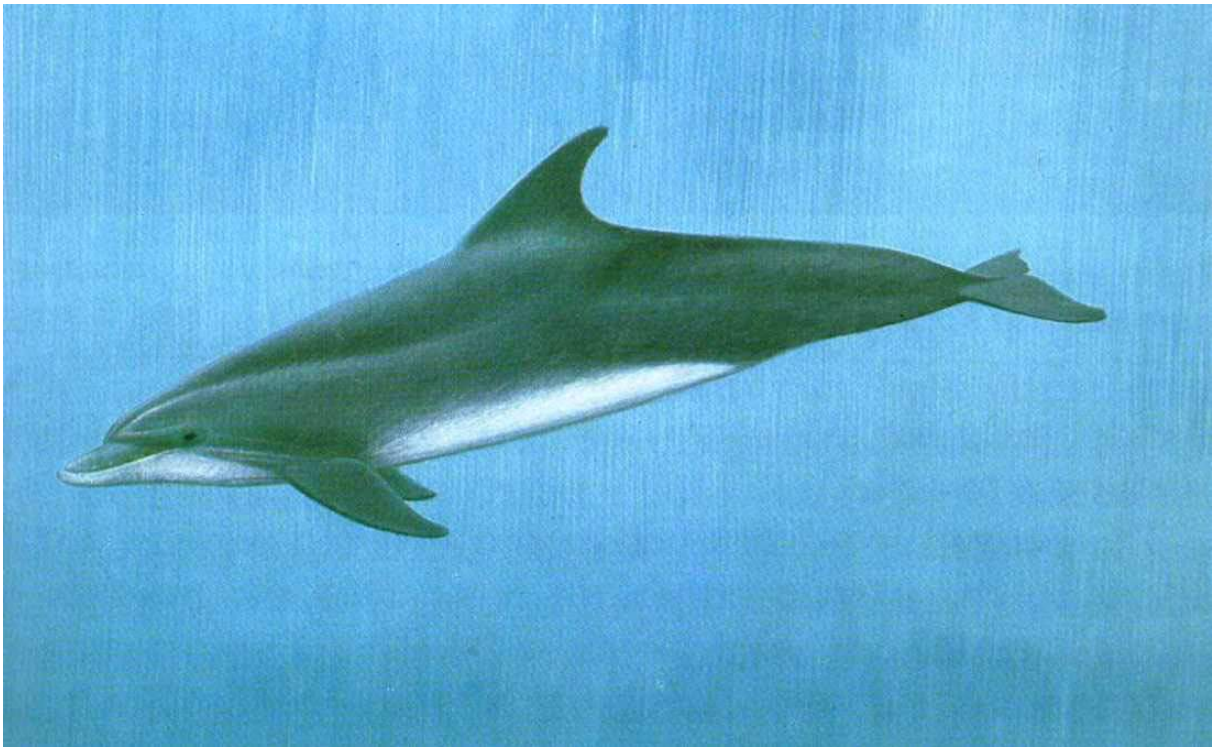
Tablica 1. Sistematika istraživanih vrsta kitova

Red	Cetacea kitovi		
Podred	Mysticeti kitovi usani	Odontoceti kitovi zubani	
Porodica	Balaenopteridae brazdasti kitovi	Ziphiidae brazdasti dupini	Delphinidae šiljatozubi dupini
Vrsta	<i>Balaenoptera physalus</i> veliki sjeverni kit	<i>Ziphius cavirostris</i> krupnozubi dupin	<i>Tursiops truncatus</i> dobri dupin <i>Stenella coeruleoalba</i> plavobijeli dupin <i>Grampus griseus</i> glavati dupin

2.1.1. Dobri dupin

Dobri dupin (engl. bottlenose dolphin) (Slika 1) vrsta je kita zubana (red: Cetacea – kitovi, podred: Odontoceti – kitovi zubani, porodica: Delphinidae – šiljatozubi dupini) (Tablica 1) rasprostranjena po cijelome svijetu, od umjereno hladnih do tropskih mora u obje hemisfere, uglavnom u obalnim područjima. Postoje i pelagičke populacije dobroga dupina, primjerice populacija nastanjena u istočnom tropskom Tihom oceanu. Dobri dupini uglavnom ne prelaze 45 paralelu prema polovima, osim oko Velike Britanije i sjeverne Europe (Jefferson i sur. 1993, Rice 1998). Biologija ove vrste vrlo je dobro istražena. Duljina odraslih jedinki u prosjeku iznosi od 2,5 do 3,5 m, a masa od 270 do 350 kg (Notarbartolo Di Sciara i Demma 1994). Dobri dupini najčešće žive u skupinama manjim od 20 jedinki, premda se velika jata od nekoliko stotina jedinki mogu susresti na otvorenom moru. U nekim područjima imaju ograničeno područje nastanjivanja (engl. home range), dok u drugim područjima mogu biti migratorni, te imati puno šire područje nastanjivanja. Veza između majke i mladunca

može biti vrlo jaka. S obzirom da je to vrsta koja je vrlo prilagodljiva i lako se dresira, to je najčešća vrsta kita koja se drži u zatočeništvu (Jefferson i sur 1993). Samo u europskim delfinarijama 1998. godine 181 jedinka držana je u zatočeništvu (Hartmann 2000). Glavni plijen dobrog dupina iz Jadranskog mora je riba, ali često konzumira i glavonošce poput lignje, lignjuna, muzgavca i sipe (Poldan 2004). Smatra se da u mnogim regijama postoje barem dva tipa dobrog dupina – obalni i pelagički, koji se razlikuju u morfologiji, načinu hranjenja, njegovim nametnicima i drugome (Baird i sur 1993). U hrvatskom dijelu Jadranskog mora, međutim, postoji samo jedan morfološki tip dobrog dupina (Đuras Gomerčić 2006).



Slika 1. Crtež dobrog dupina. Naslikao Larry Foster, preuzeto iz Leatherwood i Reeves (1983).

Postoje mnoge procjene veličine populacije dobrog dupina pojedinih regija, no ne postoji procjena veličine svjetske populacije (Baird i sur 1993). Premda je to brojna i široko rasprostranjena vrsta, a opći izgledi preživljenja su joj dosta dobri, za neke lokalne populacije zasigurno postoji opasnost od izumiranja zbog uništenja staništa, sukoba s ribarima, zagađenja, ili neposrednog ubijanja. Nagada se da visoka koncentracija onečišćivača u tkivima dupina oslabljuje njihov imunološki sustav. U Sredozemnom moru se zagađenje

okoliša, smanjenje ribljeg fonda i zaplitanje u ribarske mreže smatra ozbiljnom prijetnjom lokalnim populacijama dobrih dupina (Reeves i sur 2002).

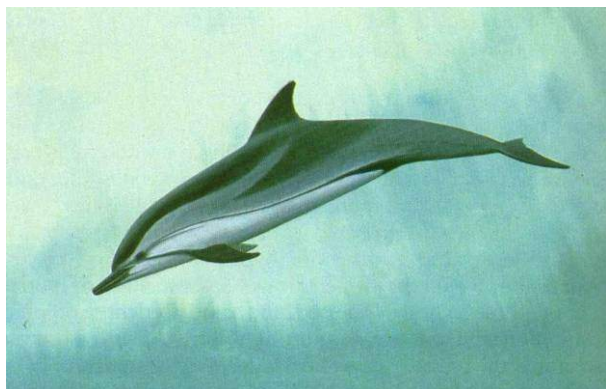
Dobri dupin jedina je stalno nastanjena vrsta kita u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Brojnost populacije dobrog dupina u hrvatskom dijelu Jadranskog mora procijenjena je na oko 220 do 250 jedinki (Gomercic i sur. 2002a, Gomerčić i sur. 2004). U Republici Hrvatskoj dobri dupin se smatra ugroženom vrstom (Holcer 2006), te je zakonom strogo zaštićen (Narodne novine 2006).

2.1.2. Ostale vrste kitova uključene u ovo istraživanje

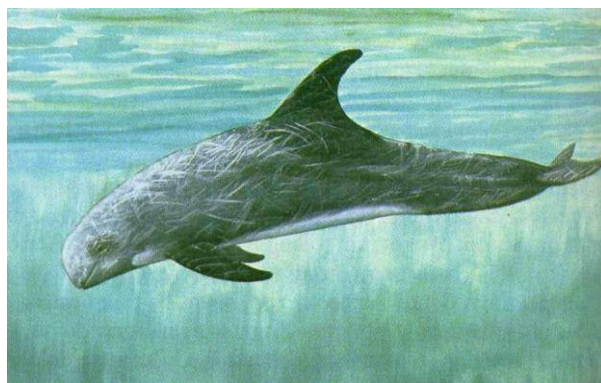
U ovo istraživanje su osim dobrog dupina uključene i četiri ostale vrste iz reda kitova, a to su plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*), glavati dupin (*Grampus griseus*), krupnozubi dupin (*Ziphius cavirostris*), te veliki sjeverni kit (*Balaenoptera physalus*) (Tablica 1, Slika 2).

Plavobijeli dupin (engl. striped dolphin) je mali pelagički dupin, dužine oko 2 m i mase oko 100 kg. Pripada porodici šiljatozubih dupina (Delphinidae). Plavobijeli dupini su brzi plivači, rado izvode akrobacije u zraku i vrlo su socijalni. Veličina jata varira među regijama, a raspona je od 10-30, a kadikada i nekoliko stotina jedinki. Plavobijeli dupin kozmopolitska je vrsta, nastanjuje tropska i umjerena mora cijelog svijeta, a najčešća je vrsta dupina u Sredozemnom moru (Jefferson i sur 1993, Archer i Perrin 1999, Archer 2002). Procjenjuje se da u zapadnom dijelu Sredozemnog mora živi više od 100.000 jedinki, čak i nakon masovnog uginuća, uzrokovanog morbilivirusnom infekcijom, koje se dogodilo između 1990. i 1992. godine. Unatoč tako velikom broju, postoji razlog za zabrinutost oko položaja plavobijelih dupina u Sredozemlju, jer ih veliki broj stradava slučajno u pelagičkim kočarskim mrežama, a pretjerani izlov ribe i uništavanje staništa uzrokuju smanjenje broja ribe i glavonožaca. Stres zbog nedostatka hrane i visoka koncentracija onečišćivača u tkivima ovih dupina čine ih posebno podložnim bolestima (Reeves i sur 2002). Premda je najčešća vrsta dupina u Sredozemlju, ova vrsta nije stalni stanovnik u Jadranskom moru, ali u njega zalazi češće od ostalih vrsta kitova (Gomerčić i sur 2004). U talijanskom dijelu Jadranskog mora zabilježeno je 148 nalaza mrtvih ili nasukanih plavobijelih dupina u južnom dijelu Jadrana, 21 u srednjem, te sedam u sjevernom dijelu Jadrana u razdoblju od 1986 do 1996 godine (Podestà i Bortolotto 2001, citirano u Bearzi i sur 2004). U hrvatskom dijelu Jadranskog mora

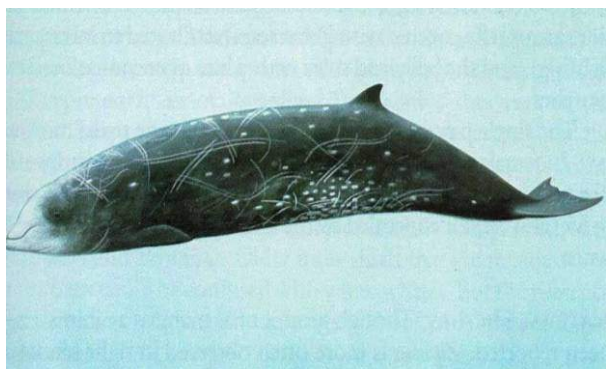
po prvi puta je nađen plavobijeli dupin tek 1991. godine, na Korčuli (Gomerčić i sur 1994), a do 2002. godine nađena su četiri primjerka (Gomerčić i sur 2002b).



Plavobijeli dupin



Glavati dupin



Krupnozubi dupin



Veliki sjeverni kit

Slika 2. Crtež ostalih vrsta kitova uključenih u ovo istraživanje. Veličina kitova na crtežima nije međusobno proporcionalna. Naslikao Larry Foster, preuzeto iz Leatherwood i Reeves (1983).

Glavati dupin (engl. Risso's dolphin) je široko rasprostranjena vrsta porodice šiljatozubih dupina (Delphinidae), naseljava područja od tropskih do umjerenih regija oceana obje hemisfere. To su prilično veliki dupini, odrasli mogu biti duljine do 3,8 m i mase do skoro 500 kg. Žive u malim do srednje velikim skupinama, no zabilježene su i skupine od 4000 jedinki. Često se može vidjeti zajedno s drugim vrstama kitova, a zabilježeno je i postojanje hibrida između glavatih i dobrih dupina u zatočeništvu, ali i u divljini. Hrane se rakovima i glavonošcima (Jefferson i sur 1993). Brojnost sredozemne populacije nije poznata,

no rasprostranjena je po cijelom Sredozemnom moru, a brojnija je u njegovom zapadnom dijelu (Notarbartolo di Sciara i Demma 1994). U Jadranskom moru su zabilježena povremena viđenja glavatih dupina (Gomercic i sur 1998), a šest primjeraka je nađeno mrtvo do 2002. godine (Gomercic i sur 2002b).

Krupnozubi dupin (engl. Cuvier's beaked whale) pripada porodici brazdastih dupina (Ziphiidae), što je najslabije istražena porodica kitova (Rice 1998). Pripadnici ove vrste se najčešće nalaze u malim skupinama, koje se sastoje od dvije do sedam jedinki, ali nije rijetkost vidjeti ih pojedinačno. Rasprostranjeni su po morima svih oceana, od tropskih do polarnih regija. Samozatajnog su ponašanja, a zabilježeni su im uroni i do 40 minuta dugi. Više vole duboka mora (Jefferson i sur 1993). Povremeno pojedine jedinke zalutaju u Jadransko more, tako je po jedna jedinka nađena 1986. i 1992. godine blizu Barija (Centro Studi Cetacei 1987, Centro Studi Cetacei 1995), a u hrvatskom dijelu Jadranskog mora su po prvi puta nađene jedna jedinka pokraj Dubrovnika 2001., a druga na Korčuli 2002. godine (Gomerčić i sur 2006).

Veliki sjeverni kit (engl. fin whale) jedini je pripadnik podreda kitova usana (Mysticeti) kojeg smo uključili u ovo istraživanje. Odrasle jedinke mogu doseći duljinu do 27 m i masu do 75 t. Naseljuju tropska, umjerena i polarna područja svih oceana. Najčešće se mogu vidjeti u predjelima gdje se duboko more približava obali. Hrane se malim beskralježnjacima, ribom u jatima i lignjama. Mogu doseći brzinu i do 37 km/h, što ih čini jednim od najbržih velikih kitova. Mladi se rađaju zimi u tropskim i suptropskim područjima hranjenja. Nakon smanjenja broja plavetnih kitova (*Balaenoptera musculus*), kitolovci su se okrenuli izlovu velikih sjevernih kitova, čime se njihova svjetska populacija značajno smanjila (Jefferson i sur 1993). Populacija sjeverozapadnog Sredozemlja tamo obitava tijekom cijele godine (Rice 1998). Na osnovi genetičkih istraživanja smatra se da bi to mogla biti stalno nastanjena populacija, različita od sjevernoatlantskih populacija velikog sjevernog kita (Bérubé i sur 1998). Veličina sredozemne populacije nije poznata, ali se procijenjuje da u zapadnom dijelu Sredozemnog mora, u kojem većina kitova živi, obitava oko 3500 jedinki (Notarbartolo Di Sciara i sur 2003). U sjevernom dijelu Jadranskog mora od 1728. do 2003. godine viđeno je 26 jedinki velikog sjevernog kita, s time da se u zadnjem desetljeću broj viđenja povećao (Lipej i sur 2004).

2.2. Genetička raznolikost

Genetička raznolikost je pojam koji opisuje varijaciju na razini pojedinih gena unutar neke populacije. Obično se opisuje korištenjem polimorfizma, prosječne heterozigotnosti i alelske raznolikosti. U populaciji je određen lokus polimorfan ako ima više od jednog alela, s time da najučestaliji alel za taj lokus ima učestalost manju od 0,99 ili 0,95. Prosječna heterozigotnost pokazuje prosječni udio heterozigota u populaciji, dok alelska raznolikost predstavlja prosječni broj alela po lokusu u populaciji.

Genetička raznolikost je potrebna da bi moglo doći do evolucijske promjene određene vrste ili populacije. Sve vrste su izložene okolišu koji se kontinuirano mijenja. Promjena okoliša uključuje primjerice klimatske promjene zbog globalnog zatopljenja i onečišćenja, uvođenje novih vrsta koji će predstavljati kompetitore već postojećim vrstama ili promjene u postojanju nametničkih i ostalih zaraznih bolesti. Vrste se moraju nositi s tim promjenama tako da evoluiraju i prilagode se promjenama ili pak dolazi do njihovog izumiranja. Da bi populacije mogle evoluirati potrebna je genetička raznolikost, koja stoga odražava evolucijski potencijal dotične populacije. Populacije koje posjeduju genetičku raznolikost mogu odgovoriti na promjene u okolišu. Isto tako, niska genetička raznolikost često je povezana sa smanjenom sposobnošću reprodukcije i preživljenja (engl. reproductive fitness). To je i očekivano, obzirom da je gubitak genetičke raznolikosti izravno povezan s razmnožavanjem u bliskom srodstvu (engl. inbreeding), a ono vodi do smanjenja reproduktivne sposobnosti (Frankham i sur. 2002).

Istraživanjem i očuvanjem genetičke raznolikosti se primarno bavi konzervacijska genetika. Kratkoročno očuvanje genetičke raznolikosti osigurava održanje reproduktivne sposobnosti, dok dugoročno očuvanje genetičke raznolikosti osigurava održanje adaptivnog evolucijskog potencijala (Frankham i sur. 2002).

2.3. Metode istraživanja genetičke raznolikosti

Genetička raznolikost se odražava u razlikama u mnogim osobinama među jedinkama, a na razini gena predstavlja promijenjen slijed baza u DNA. Genetička raznolikost se mjeri za mnoge različite osobine, što uključuje kvantitativne osobine (raznolikost kvantitativnih osobina nastaje kao posljedica genetičkih i okolišnih čimbenika, te je njena genetička komponenta teško mjerljiva), štetne alele, proteine, lokuse nuklearne DNA, mitohondrijsku DNA, kloroplastnu DNA i kromosome. Prve mjere genetičke raznolikosti procijenjene na

osnovu molekularnih metoda dobivene su 1966 godine za proteine, korištenjem alozimske elektroforeze (Frankham i sur. 2002).

Alozimska elektroforeza je tehnika kojom se otkrivaju različite varijante istog enzima, koje su kodirane različitim alelima istog lokusa; s obzirom da različite amino kiseline posjeduju različite električne naboje, pa se tako alozimi mogu razlikovati na osnovi različite brzine migracije za vrijeme elektroforeze u gelu. Tehnika se sastoji u tome da se uzorak tkiva homogenizira čime se oslobađaju enzimi iz stanica. Homogenati se nanose u jažice na gelu, provodi se elektroforeza u gelu od škroba, celuloznog acetata ili akrilamida, čime se razdvajaju molekule prema naboju, veličini i konformaciji. Nakon elektroforeze, na gelu se histokemijskim metodama željeni proteini učine vidljivima (Bader 1998, May 1998). Nedostatak ove tehnike je taj da organizmi koji se istražuju moraju biti živi ili njihova tkiva svježe smrznuta, stoga se uglavnom koriste u istraživanjima onih vrsta za koje je to lako postići, a to su vrste koje je relativno lako uzorkovati, kao primjerice razne vrste beskralježnjaka (Díaz-Jaimes i sur. 2006, Schmitt i sur. 2006, González-Wangüemert i sur. 2006) ili žaba (Zangari i sur. 2006).

Također, alozimi pokazuju nisku razinu polimorfizma, što ima za posljedicu nisku rezoluciju genetičkih razlika. S obzirom da je većina lokusa monomorfna (ne pokazuju nikakvu raznolikost unutar ili između populacija), u preliminarnom istraživanju je potrebno odabrati polimorfne lokuse, te istraživanje provesti na većem broju jedinki (čak na 100 jedinki po populaciji) da bi se dobilo dovoljno podataka za izražavanje genetičke raznolikosti i genetičke udaljenosti među istraživanim populacijama (Bader 1998).

Za mjerenje genetičke raznolikosti na DNA razini postoji nekoliko tehnika:

Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata – RFLP (engl. restriction fragment length polymorphism) je tehnika kojom se izolirana DNA cijepa restrikcijskim enzimom, a fragmenti različitih veličina se odijele elektroforezom na gelu. DNA fragmenti se denaturiraju i prenose na membranu koja se uroni u otopinu radioaktivno obilježenih jednolančanih segmenata DNA lokusa koji istražujemo („DNA sonda“). Autoradiografijom se otkriva da li postoji varijacija u DNA sekvenci na mjestu cijepanja restrikcijskim enzimom (Hoelzel i Dover 1991). Nedostaci ove metode jesu potreba za velikom količinom DNA i posjedovanjem sonde za određeni lokus, te u maloj varijabilnosti RFLP-a (manja od varijabilnosti mikrosatelita) (Frankham i sur. 2002). Premda je bila česta metoda za istraživanje genetičke

raznolikosti (primjerice Randi i sur. 1995), sve više se zamjenjuje metodama koje koriste lančanu reakciju polimerazom (PCR).

Nasumično umnožena polimorfna DNA - RAPD (engl. random amplified polymorphic DNA) sastoji se od relativno kratkih DNA fragmenata (duljine oko 200-2000 pb) umnoženih pomoću PCR reakcije korištenjem kratkih i nasumično odabranih početnica. Tipično se početnice koriste pojedinačno, što znači da se moraju vezati za DNA kalup u obrnutoj orijentaciji da bi došlo do umnažanja DNA. Po konvenciji se par obrnuto postavljenih mjesta za vezanje početnica sa sljedom koji se između njih nalazi naziva RAPD lokus, a proizvod umnožen s određenog lokusa naziva RAPD biljeg. RAPD tehnika je široko korištena u istraživanjima na biljkama (Kadri i sur. 2006, Li i Ge 2006), a dosta manje u istraživanjima na životinjama (Li i sur. 2006). Nedostatak im je dominantno nasljeđivanje i dobivanje nedosljednih rezultata kod ponavljanja (Grosberg i sur. 1996, Frankham i sur. 2002).

Polimorfizam duljine umnoženih fragmenata – AFLP (engl. amplified fragment length polymorphism) je tehnika koja udružuje RFLP i PCR tehnologiju. Genomska DNA se pocijepa s dva restrikcijska enzima uz dodatak DNA fragmenata poznate sekvence („adaptera“) koji se spajaju na pocijepane krajeve uz pomoć DNA ligaze. Nakon toga se provodi lančana reakcija polimerazom u kojoj se koristi početnica koja je dijelom komplementarna poznatoj sekvenci „adaptera“, a uz to ima dodatne selektivne nukleotide čime se osigurava selektivno umnožavanje samo jednog dijela fragmenata (Mueller i Wolfenbarger 1999). Prednost ove metode u odnosu na RAPD je u tome da se dobivaju pouzdaniji rezultati, ali je nedostatak taj da se i ovdje dobivaju dominantni biljezi. Smatra se da je ova metoda potcijenjena te preporučuje upotreba AFLP biljega u procijenama genetičke raznolikosti, istraživanjima populacijske strukture i dr., jer daju molekularne podatke visoke kvalitete i kvantitete za razumnu cijenu (Bensch i Akesson 2005).

Polimorfizam pojedinačnih nukleotida – SNP (engl. single nucleotide polymorphism) predstavlja specifično mjesto na DNA na kojima se pojavljuje dvije ili više različitih nukleotida. Da bi se varijacija u DNA smatrala SNP-om, mora se u populaciji pojavljivati s učestalošću od barem 1%. SNP nalazi primjenu u farmakogenomici, dijagnostici i biomedicinskim istraživanjima. Metoda za sada ne nalazi primjenu u konzervacijskog genetikici (Frankham i sur. 2002).

Polimorfizam jedno-lančane konformacije – SSCP (engl. single strand conformational polymorphisms) temelji se na elektroforetskom razdvajanju jednolančanih nukleinskih kiselina koje se zasniva na malim razlikama u sljedu (razlika može biti u samo jednoj bazi), a rezultira različitom sekundarnom strukturom koja pak pokazuje različitu mobilnost u gelu. Na taj način se može otkriti genetička raznolikost različitih populacija, a bez korištenja reakcije sekvenciranja (primjerice Van Houdt i sur. 2005).

Metoda minisatelita ili varijabilni broj uzdužno opetovanih sljedova – VNTR (engl. variable number tandem repeats) također se naziva i „otisak prsta DNA“ (engl. DNA fingerprint). Opetovani specifični sljedovi nukleotida u minisatelita dugački su i do 200 parova baza, što čini i njihove alele vrlo dugačkima (do 50 kb). Njihova uporaba korištenjem lančane reakcije polimerazom zbog toga je ograničena, jer standardne PCR reakcije ne mogu umnožiti tako velike sljedove (Bruford i Wayne 1993). Da bi se identificirala minisatelitna DNA, izolirana DNA se pocijepa restriksijskim enzimom koji prepoznaje i cijepa regije uz minisatelitski biljeg, a DNA fragmenti se po veličini elektroforetski odijele na gelu. Dvolančani fragmenti se denaturiraju i prenesu na membranu koja se uroni u otopinu radioaktivno obilježenih jednolančanih segmenata DNA koji sadrže određeni uzdužno opetovani slijed („DNA sonda“). Autoradiografijom se otkriva uzorak fragmenata koji slični linijskom kodu (engl. bar-code). Obzirom da je broj ponavljanja vrlo varijabilan, svaka jedinka unutar populacije u kojoj nema razmnožavanja u bliskom srodstvu normalno ima jedinstveni „otisak prsta DNA“, isključujući jednojajčane blizance. Jedan od nedostataka VNTR metode je nemogućnost identifikacije pojedinih lokusa, jer dobiveni fragmenti proizlaze s raznih regija genoma. Najveći nedostatak ove metode je taj što za njeno provođenje mora postojati značajna količina DNA (Frankham i sur. 2002). Premda se koristi i u istraživanjima divljih životinja (Mattiangeli i sur. 2002, Xu i Fang 2006) u te svrhe ju sve više zamjenjuju metode koje koriste PCR reakciju, te dozvoljavaju neinvazivno uzorkovanje.

Metode korištene u ovom istraživanju (mikrosatelitski lokusi i sekvenciranje kontrolne regije mtDNA) detaljnije su opisane u sljedećim poglavljima.

2.3.1. Mikrosatelitski lokusi

Mikrosatelitski lokusi otkriveni su u eukariotskim genomima prije više od 25 godina, ali njihovo postojanje nije pobuđivalo veći znanstveni interes. Početkom upotrebe lančane

reakcije polimerazom, shvatilo se krajem osamdesetih godina prošlog stoljeća da bi mikrosateliti mogli biti najbolji genetički biljezi do tada otkriveni (Jarne i Lagoda 1996).

Sastoje se od jednostavnih opetovanih specifičnih slijedova nukleotida, veličine od dva do šest parova baza, primjerice (TG) n ili (AAT) n . Brojni su u eukariotskim genomima i često su vrlo polimorfni zbog različitog broja jednostavnih opetovanih slijedova. Pojavljuju se i u prokariota, ali s manjom učestalošću. Rijetko sadrže više od 70 ponavljajućih jedinica, a nalaze se po cijelom genomu. Utvrđeno je da su među kralježnjacima jedino u genomima ptica mikrosatelitski lokusi relativno rijetki (Neff i Gross 2001). Procijenjeno je da se u sisavaca najčešći slijed nukleotida GT/CA pojavljuje u prosjeku svakih 30 kb (kilobaza) (Bruford i Wayne 1993, Schlötterer 1998). U ljudskom genomu vjerojatno postoji oko 35.000 mikrosatelitskih lokusa; pojavljuju se u prosjeku svakih 100 000 parova baza (pb), a aleli im imaju obično između 2 i 50 ponavljanja po lokusu (Page i Holmes 1998).

Zbog opetovanih slijedova nukleotida koje sadrže, mikrosateliti su izuzetno podložni pogreškama replikacije DNA, procesom koji se naziva pogrešno sparivanje skliznutog lanca (engl. slipped-strand mispairing), a koji dovodi do produljenja ili skraćanja DNA tijekom replikacija (Moxon i Wills 1999). Taj mutacijski mehanizam, također nazvan klizanje DNA (engl. DNA slippage), uzrokuje promjene u broju opetovanih slijedova nukleotida, a najčešće su promjene od jedne ponavljajuće jedinice (Schlötterer 1998). Brzina mutacije mikrosatelita je izrazito velika; otprilike 10^4 puta je vjerojatnije da će neki mikrosatelitski lokus dobiti ili izgubiti opetovanu jedinicu od jedne do druge generacije od vjerojatnosti događanja točkaste mutacije. To znači da brzina mutacije mikrosatelita iznosi od 10^{-3} do 10^{-5} mutacijskih događaja po mikrosatelitskom lokusu, po generaciji (Bruford i Wayne 1993, Moxon i Wills 1999, Hancock 1999). Zbog velike brzine mutacije postoji i velika različitost u duljini mikrosatelita, tj. u broju opetovanih slijedova nukleotida unutar mikrosatelitskog lokusa između različitih jedinki. Tako visoka razina genetičke različitosti, zajedno s neutralnom evolucijom, kodominantnošću (heterozigoti se mogu razlikovati od homozigota) i jednostavnim Mendelskim načinom nasljeđivanja čini mikrosatelite vrlo popularnim molekularnim biljezima (Page i Holmes 1998).

Mikrosatelitski lokusi i minisatelitski lokusi koriste se kao genetički biljezi za istraživanja u populacijskoj genetici, evoluciji, mapiranju gena, te za identifikaciju jedinki (Jeffreys 1985, Nakamura 1987, Weissenbach 1992, Ashworth i sur. 1998, Signer i sur. 1998, Kashi i Soller 1999). Za razliku od minisatelita, veličina mikrosatelitskih lokusa manja je od 500 pb, promjenjiva je u uskom rasponu veličina, te se može određivati korištenjem PCR-a i elektroforeze u gelu. Aleli mikrosatelitskih lokusa mogu se odrediti iz vrlo malih količina

biološkog materijala koji može sadržavati gotovo razgrađenu DNA, primjerice kriminalistički ili arheološki materijal (Hagelberg i sur. 1991, Bruford i Wayne 1993, Fleisher 1996, Bruford i sur. 1998) ili pak izmet, dlaku, perje ili oljuštenu kožu teško dostupnih divljih životinja (Constable i sur. 1995, Kohn i Wayne 1997, Wasser i sur. 1997, Valsecchi i sur. 1998, Kohn i sur. 1999, Triant i sur. 2004, Rudnick i sur. 2005).

Znanstvenici istražuju mikrosatelite u svrhu objašnjenja i dijagnosticiranja nekih neuroloških i imunoloških poremećaja (Bailey 1997, Moxon i Wills 1999). Otkriveno je da jedan od ranih pokazatelja oboljenja od nekih karcinoma može biti promjena u duljini mikrosatelita, što mikrosatelite čini korisnim biljezima za rano otkrivanje raka (Shibata 1999). Mikrosateliti se koriste i u svrhu mapiranja genoma (Weissenbach i sur. 1992, Wu i sur. 2004, Weissenbach 1998).

Usporedbom mikrosatelita u kralježnjaka utvrđeno je da vrste s duljim genomima nemaju više mikrosatelitskih lokusa u svom genomu, čime je odbačena hipoteza da je primarna funkcija mikrosatelita kondenzacija i pakiranje DNA u kromosome. Isto tako je utvrđeno da postoji direkcijska mutacija koja teži povećanju duljine mikrosatelitskih lokusa, te da na razini vrste, mikrosatelitska i alozimska heterozigotnost kovariraju, što znači da bi zaključci o raznolikosti doneseni na osnovi istraživanja na velikom broju alozima mogli odražavati i mikrosatelitsku raznolikost (Neff i Gross 2001).

U genetičkim istraživanjima domaćih životinja također se koriste mikrosatelitski lokusi s ciljem procjene genetičke raznolikosti (Martín-Burriel i sur. 1999, Ivanković i sur. 2005), kao i praktičnom primjenom u određivanju roditeljstva (Marklund i sur. 1994, Koskinen i Bredbacka 1999, Jemeršić i sur. 2003, Galov i sur. 2005), te mogućem određivanju pasminske pripadnosti (MacHugh i sur. 1998, Blott i sur. 1999).

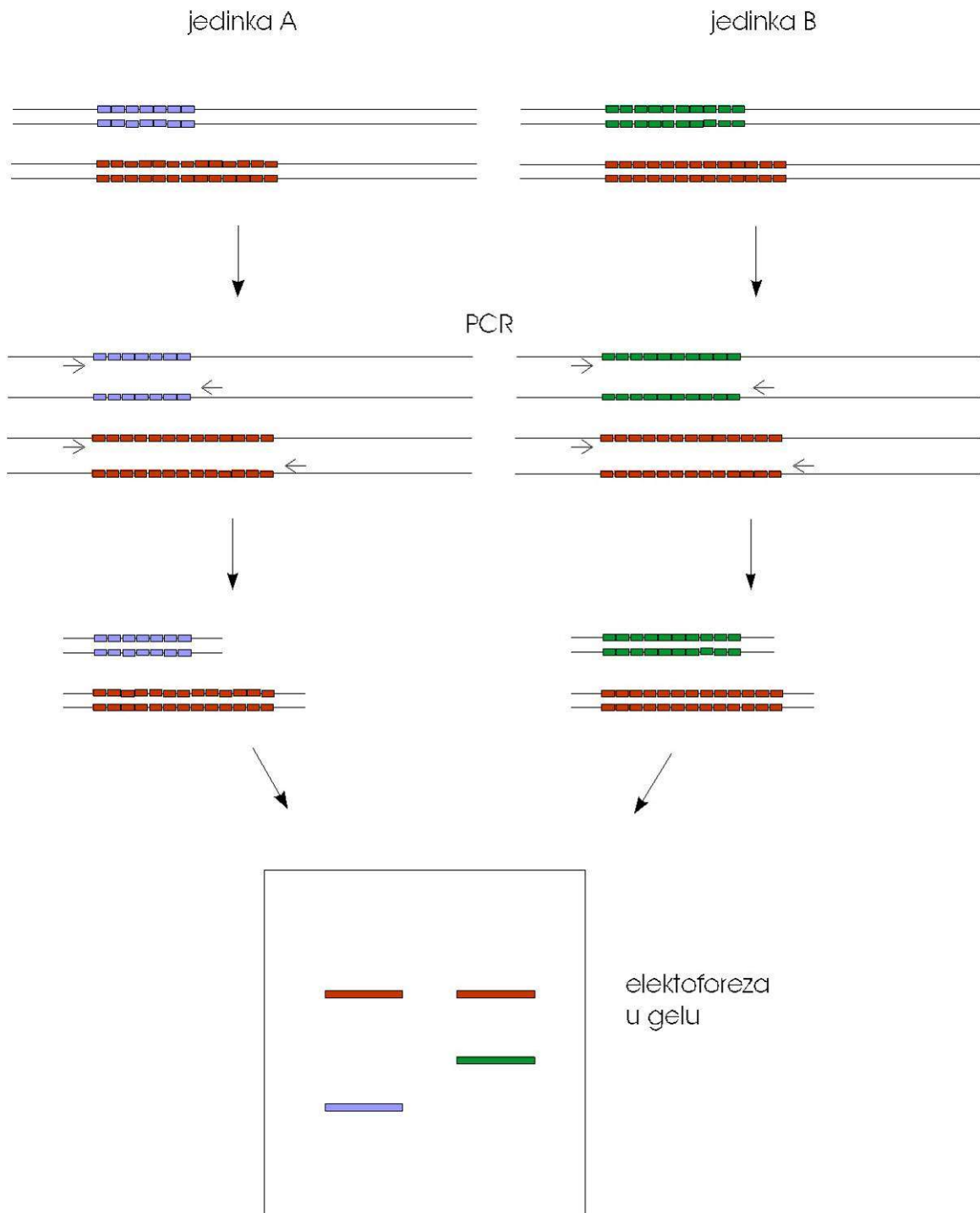
2.3.1.1. Određivanje veličina alela mikrosatelitskog lokusa (genotipizacija)

Duljina alela mikrosatelitskog lokusa određuje se umnažanjem određenog mikrosatelitskog lokusa pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR). Prije nego što se mikrosatelitski lokus umnoži, potrebno je poznavati sljedove DNA koji se nalaze neposredno uz istraživani lokus, da bi se mogle dizajnirati specifične početnice. Za neke vrste životinja postoji sve veći broj mikrosatelita i njihovih bočnih sljedova, a ti podaci mogu se naći u literaturi ili računalnim bazama podataka (primjerice EMBL ili GenBank). *Molecular Ecology Notes* je časopis koji je među ostalim posvećen razvoju molekularnih biljega, te se otkrića

novih mikrosatelitski lokusa najčešće tamo objavljuju (Coughlan i sur. 2006, Ngamsiri i sur. 2006). U slučaju da za vrstu koju želimo istraživati ne postoje već otkriveni mikrosateliti, tada je prvi korak u analizi mikrosatelita izolacija mikrosatelitskih lokusa i njihovih postranih sljedova (Schlötterer 1998). Premda je izolacija mikrosatelitskih sljedova zahtjevna i dugotrajna, metode su pouzdane, a one uključuju stvaranje djelomičkih genomskih DNA knjižnica (engl. DNA library), određivanje i sekvenciranje klonova koji sadrže mikrosatelite, stvaranje specifičnih početnica za PCR koje se nalaze neposredno pokraj opetovanih nizova koji čine mikrosatelitski lokus, umnožavanje mikrosatelita u uzorku jedinki određene populacije, te daljnjem korištenju onih mikrosatelitskih lokusa koji su polimorfni (Strassmann i sur. 1996, Hammond i sur. 1998).

Nakon što se naprave specifične početnice i pomoću PCR reakcije umnoži određeni mikrosatelitski lokus, PCR proizvodi razdvajaju se elektroforezom na gelovima ili u kapilarama s polimerima s visokim razlučivanjem, gdje se mogu razdvojiti fragmenti koji se razlikuju u samo jednoj bazi, te se određuje duljina svakom pojedinom alelu, odnosno broj opetovanih specifičnih sljedova u svakom alelu (Slika 3).

Rezultati elektroforeze mogu se očitavati na nekoliko načina: autoradiografijom (koriste se radioaktivno označene početnice za PCR), bojanjem PCR proizvoda etidij-bromidom ili srebrom, te korištenjem početnica označenih fluorescentnim bojama i genskih analizatora, poput ABI Prism 377 DNA Sequencer ili ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer (Fleisher 1996, Christensen i sur. 1999). Jedan od problema koji se javlja kod interpretacije rezultata elektroforeze najčešće je pojava niza fragmenata, a ne samo jednog ili dva (ovisno o tome da li se radi o homozigotu ili heterozigotu za određeni lokus). Taj problem je posebice izražen u mikrosatelitskih lokusa koji se sastoje od dinukleotidnih opetovanih sljedova nukleotida. Obično je fragment najvećeg intenziteta onaj očekivani, no razlike u intenzitetu fragmenata nisu dovoljne da bi se sa sigurnošću moglo pravilno zaključiti koji fragment je ishodišni alel. Ti dodatni fragmenti (engl. stutter bands) obično su po veličini manji od ishodišnog alela, a od njega se razlikuju za jednu do pet opetovanih jedinica (primjerice za alel veličine 200 pb, koji se sastoji od dinukleotidnih ponavljanja mogu postojati dodatni fragmenti veličine 198, 196, 194, 192 i 190 pb). Dodatni fragmenti najvjerojatnije nastaju kao rezultat klizanja DNA za vrijeme PCR umnažanja in vitro. Dodatni fragment je to manjeg intenziteta što je kraći. Razlog tome je raspodjela događaja DNA klizanja: klizanje DNA za jednu ponavljajuću jedinicu vjerojatnije je od klizanja DNA za dvije jedinice, itd. (Ciofi i sur. 1998, Schlötterer 1998). Taj i slični problemi se djelomično rješavaju uporabom automatskih



Slika 3. Shematski prikaz genotipizacije mikrosatelitskog lokusa. Mikrosatelitski lokus se umnoži PCR reakcijom korištenjem početnica koje su dizajnirane tako da su komplementarne bočnim dijelovima mikrosatelitskog lokusa. PCR proizvodi se nadalje razdvajaju pomoću elektroforeze na gelu. Jedinke A i B imaju jedan zajednički alel (alel označen crvenom bojom), dok im je drugi alel različit: jedinka A ima drugi alel označen plavom bojom, dok jedinka B ima drugi alel označen zelenom bojom (izrađeno prema Schlötterer-u 1998).

uređaja - genskih analizatora, koji s visokom točnošću određuju intenzitete pojedinih odjeljaka, ali nedostatak im je njihova visoka cijena. Njima se PCR proizvodi označeni fluoroforom automatski odrede za vrijeme elektroforeze – laserska zraka aktivira fluorofor koji tada odašilje znak koji uređaj otkriva. Točno određivanje veličine odjeljka PCR proizvoda automatski uređaji provode usporedbom kretanja PCR proizvoda i biljega standardne veličine.

2.3.2. Mitohondrijska DNA (mtDNA)

U gotovo svih mnogostaničnih životinja mitohondrijski genom predstavlja kružna dvolančana DNA molekula veličine od 15,7 do 19,5 kb (kilobaza). Iznimka tome su neke vrste žarnjaka kod kojih su nađene linearne mtDNA molekule (Boore 1999). Za razliku od replikacije nuklearne DNA koja je simetrična, dvosmjerna i diskontinuirana, replikacija mitohondrijskog genoma je asimetrična, jednosmjerna i kontinuirana, te zahtijeva mnogo manje enzima za replikaciju. Mitohondrijski genomi svih životinja, uz par iznimaka, sadrže istih 37 gena: dva za ribosomalnu RNA (rRNA), 13 za proteine i 22 za transfer RNA (tRNA). Proizvodi tih gena, zajedno s RNA molekulama i proteinima koji dolaze iz citoplazme, omogućuju mitohondrijima da posjeduju vlastite sustave za provođenje replikacije DNA i transkripcije, te procesiranje mRNA i translacije (Boore 1999). Replikacija i transkripcija započinju u kontrolnoj regiji, gdje su koncentrirane i varijabilne netranskribirajuće regije. Majčinsko nasljeđivanje mtDNA koje ima za posljedicu haploidno nasljeđivanje čini mtDNA izvrsnim genetičkim biljegom za populacijska istraživanja. Za to je potrebna potpuna homoplazija, odn. nepostojanje varijacije u mtDNA unutar pojedine jedinice. Heteroplazija teoretski može nastati ili zbog mutacije ili zbog očinskog upliva, do čega ponekad može doći u nekih kralježnjaka. Promjene u sljedu animalnog mitohondrijskog genoma mogu biti rearanžmani sljedova, te insercije, delecije i supstitucije nukleotida. Od supstitucija su u kralježnjaka tranzicije (A-G, C-T) mnogo češće od transverzija (A-C, A-T, G-C, G-T). Prevladavanje tranzicija je najizraženije kada se uspoređuju bliske sekvence, a smanjuje se što su sekvence udaljenije (Moritz i sur.1987). Ukupna brzina supstitucija u mitohondrijskom genomu se procjenjuje da je 5-10 puta veća od supstitucija u nuklearnoj DNA, premda se brzine promjena sljedova razlikuju u različitim dijelovima mitohondrijskog genoma (Hoelzel i sur. 1991). Najmanju brzinu supstitucije u mitohondrijskom genomu imaju geni za tRNA i rRNA. Geni koji kodiraju za proteine evoluiraju otprilike dvostruko brže od

njih (što je do dva reda veličine brže od brzine evolucije odgovarajućih nuklearnih gena). Brzine evolucije značajno variraju između gena različitih proteina, a i između različitih vrsta ako se proučava određeni protein. I u mitohondrijskom genomu postoje nekodirajući sljedovi, ali proporcionalno ih je mnogo manje nego u nuklearnom genomu (Hoelzel i Dover 1991). Dio mitohondrijskog genoma koji najbrže evoluira je nekodirajuća kontrolna regija koja sadrži D-petlju (engl. D-loop). Procjenjuje se da je brzina supstitucije u D-petlji čovjeka od 2,8 do pet puta veća od brzine supstitucije u ostatku mitohondrijskog genoma. Duljina kontrolne regije se razlikuje među vrstama, a iznosi od oko 200 do 4100 pb (Hoelzel i sur. 1991). U kitova je ona dugačka oko 1000 pb (Hoelzel i sur. 1991, Árnason i sur. 1993).

Mitohondrijska DNA zbog svog malog genoma jednostavne strukture i organizacije, haploidnosti, majčinskog nasljeđivanja (uz neke iznimke), nedostatka rekombinacije i introna predstavlja vrlo koristan molekularni biljeg. Uz to mtDNA posjeduje regije koje evoluiraju različitim brzinama, što omogućava dizajniranje konzerviranih početnica i rješavanje filogenijskih problema na različitim taksonomskim razinama (Zhang i Hewitt 1996).

Za filogenijska istraživanja koja se protežu od razine vrste do razine roda koriste se varijabilniji dijelovi mtDNA, a to su dijelovi gena za citokrom b (Kocher i sur. 1989, Rosel i sur. 1994, Dalebout i sur. 2002) i kontrolna regija mtDNA (Pichler i sur. 2001, Natoli i sur. 2006).

2.3.2.1. Sekvenciranje mtDNA

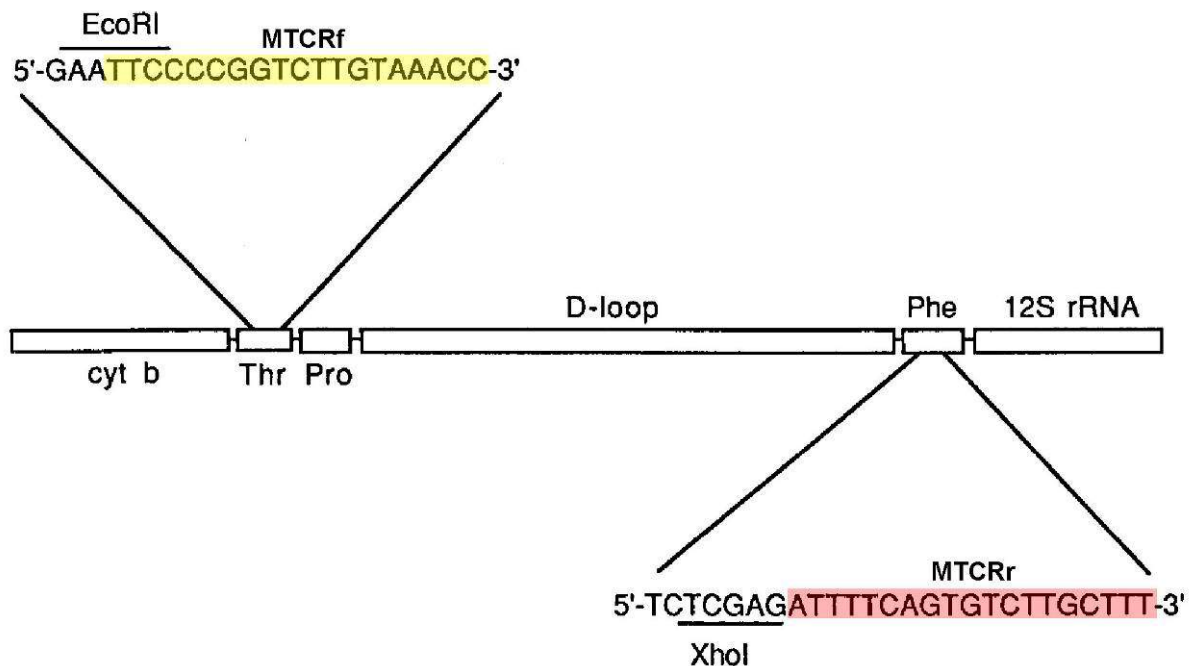
Upotreba mitohondrijske DNA u istraživanjima iz molekularne evolucije i populacijske biologije započela je 80-tih godina prošlog stoljeća i izazvala pravu revoluciju.

Istraživanja koja se zasnivaju na neizravnim ili izravnim procjenama raznolikosti sljedova mtDNA vrlo su se brzo uklopila u razna područja istraživanjima, od rješavanja problema u sistematici, identifikacije i prepoznavanja vrsta do pronalaženja genetičkih promjena u populacijama koje su se dogodile u kratkom vremenskom roku (White i sur. 1998). Neizravna procjena raznolikosti sljedova mtDNA može se izraditi pomoću RFLP tehnike (Tiedemann i sur. 1998), a može joj prethoditi i lančana reakcija polimerazom (Hansen i sur. 1997). Najizravniji način mjerenja genetičke raznolikosti je određivanje slijeda baza u DNA – sekvenciranje DNA. Sekvenciranje DNA daje najveću moguću rezoluciju genetičke raznolikosti, a zbog tehničkog napretka u provođenju sekvenciranja ono je postalo brza i pristupačna metoda analize (Hoelzel i Green 1998).

Za sekvenciranje se koriste uređaji automatski sekvenatori, poput ABI Prism 377 DNA Sequencer, ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer, 3100-Avant Genetic Analyzer, ABI3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems i drugih. Takvi uređaji se još nazivaju i genskim analizatorima, jer se koriste i za neke druge metode analize gena (primjerice AFLP, genotipizaciju mikrosatelita, SSCP). Sekvenciranje u automatskim sekvenatorima zasniva se na Sangerovoj metodi otkrivenoj 1977. godine, a koja se još naziva i dideoksi metodom ili metodom zaustavljanja lanca. DNA koju se želi sekvencirati se denaturira, te služi kao kalup na koji se veže početnica da bi započelo produljenje početnice pomoću DNA polimeraze i umnažanje specifičnog dijela DNA. Novosintetizirani fragmenti su komplementarni DNA kalupu. Taj proces denaturacije DNA kalupa, vezanja i produljenja početnica se ciklički ponavlja, slično reakciji lančane reakcije polimerazom, da bi se fragmenti umnožili i fluorescencijski obilježili za daljnju detekciju. Reakcijska smjesa sadrži deoksinukleotide (dNTP) i dideoksinukleotide (ddNTP), koji se ugrađuju nasumično. Kao rezultat nastaju skraćeni DNA lanci različitih duljina, jer ddNTP-ima nedostaje 3'-OH skupina, čime se zaustavlja daljnje produljenje lanca. Nastali fragmenti različitih duljina se razdvajaju elektroforezom, svaki se u duljini razlikuje od ostalih za po jedan nukleotid. Postoje četiri različita ddNTP-a (koji odgovaraju svakom od četiri DNA nukleotida), te je svaki od njih označen različitim fluorescencijskim biljegom. Za vrijeme elektroforeze u automatskom sekvenatoru obilježeni DNA fragmenti putuju kroz poliakrilamidni gel ili kroz tekući polimer u kapilari, gdje se razdvajaju po veličini. Pri kraju gela ili kapilare prolaze ispod lasera koji pobuđuje fluorescencijski biljeg kojim je obilježen pojedini DNA fragment. Svaki od četiri fluorescencijska biljega emitira svjetlost specifične valne duljine, a detektor automatskog sekvenatora otkriva emitiranu fluorescenciju. Računalno dalje uz pomoć programa prikazuje detektirane signale u obliku kromatograma, u kojem je svaka baza označena različitom bojom, a koji se konačno prevodi u slijed DNA.

2.3.2.2. Početnice za sekvenciranje kontrolne regije mtDNA

Oligonukleotidne početnice se izabiru tako da prepoznaju poznato mjesto u DNA slijedu, a duljina umnoženog PCR proizvoda se može predvidjeti. Najčešće se početnice odabiru pregledom literature ili računalnih baza podataka u kojima su pohranjeni sljedovi raznih dijelova genoma širokog spektra vrsta. Neki dijelovi genoma su dovoljno konzervirani da im je slijed gotovo jednak u cijelom nizu vrsta. Kada se između tih konzerviranih dijelova nalazi varijabilna regija koja nije predugačka, tada su ti konzervirani dijelovi pogodni za



Slika 4. Dio mitohondrijskog genoma sisavaca. Prikazano je mjesto prepoznavanja univerzalnih oligonukleotidnih početnica koje se koriste za umnožavanje D-petlje lančanom reakcijom polimeraze. Mjesta prepoznavanja početnica nalaze se u visoko konzerviranim antikodonskim regijama Thr i Phe tRNA molekula koje su smještene na stranama regije D-petlje (Hoelzel i sur 1991). Uzvodna početnica MTCRf označena je žutom pozadinom, a nizvodna početnica MTCRr crvenom pozadinom.

dizajniranje „univerzalnih početnica“ (Hoelzel i Green 1998). Tako su Hoelzel i sur. (1991) dizajnirali oligonukleotidne početnice za istraživanje regije D-petlje u kitova, čija se mjesta prepoznavanja nalaze unutar visoko konzerviranih antikodonskih regija Thr i Phe tRNA molekula, a umnažanjem lančanom reakcijom polimerazom nastaje proizvod dugačak oko 1000 pb (Slika 4).

Kasnije su te originalne početnice malo skraćene čime su se izgubila mjesta prepoznavanja restriksijskih enzima EcoRI i XhoI, te se navode kao univerzalne početnice za umnažanje kontrolne regije mtDNA u sisavaca i ptica (Hoelzel i Green 1998). U istraživanjima strukture populacija i specijacije roda Tursiops koristili su ih Natoli i sur. (2004), te u istraživanjima filogeografije i taksonomije roda Delphinus koristili su ih Natoli i

sur. (2006). Univerzalne početnice MTCRf i MTCRr (Hoelzel i Green 1998, Natoli i sur. 2004, Natoli i sur. 2006) korištene su i u ovom istraživanju (Slika 4).

2.4. Literaturni pregled genetičke raznolikosti i molekularne ekologije istraživanih vrsta kitova

2.4.1. Istraživanja na vrsti dobri dupin

Hoelzel i sur. (1998) su usporedili obalnu i pučinsku populaciju dobrog dupina istočne obale Sjeverne Amerike, koje se razlikuju u morfometriji, njihovim nametnicima, vrsti plijena kojom se hrane i dr. Istraživanje su proveli na 29 jedinki klasificiranih kao obalni tip, te 19 jedinki klasificiranih kao pučinski tip dupina, a koristili su 5 mikrosatelitskih lokusa i dio kontrolne regije mtDNA dug 300 pb. Rezultati analize oba tipa biljega su pokazali da postoji značajna diferencijacija između istraživanih tipova dupina, te da je razina genetičke raznolikosti manja u obalne populacije u usporedbi s pučinskom populacijom. Obzirom da analizirani fragment kontrolne regije mtDNA pokazuje točno određene razlike u sljedu između dva ekotipa, Torres i sur. (2003) su u svom istraživanju prostorne distribucije obalnog i pučinskog ekotipa dobrog dupina u sjeverozapadnom dijelu Atlantskog oceana koristili usporedbu sljedova mtDNA za identifikaciju ekotipova biopsata. Wang i sur. (1999) su usporedili dva simpatrijska morfotipa dupina roda *Tursiops* (*T. truncatus* i *T. aduncus*) u morima oko Kine s ciljem da utvrde postojanost genetičke podijeljenosti. Analizirali su fragment kontrolne regije mtDNA dug 386 pb u 47 jedinki i zaključili da molekularni podaci u potpunosti podupiru morfološku klasifikaciju uzoraka, što je snažan dokaz da su simpatrijski morfotipovi u morima oko Kine reprodukcijски izolirani i tvore dvije različite vrste. To su potvrdili i Guo-Qing i sur. (2002) i Yang i sur. (2005) u svojim istraživanjima u kojima su uspoređivali dio kontrolne regije mtDNA dug 424 pb na 30 jedinki sakupljenih sa šireg geografskog područja oko Kine. Ti nalazi su od velikog značaja za zaštitu dobrih dupina u toj regiji, jer pokazuju da se pri planiranju zaštite te dvije vrste moraju razmatrati kao dvije neovisne jedinice za zaštitu i upravljanje (engl. conservation management units). Parsons i sur. (1999) su pokazali da se kontrolna regija mitohondrijske DNA dobrih dupina s Bahama može umnožiti lančanom reakcijom polimerazom i sekvencirati iz uzoraka izmeta, a 2001. godine je Parsons pokazala (Parsons 2001) da se iz uzoraka izmeta dupina može pouzdano genotipizirati i mikrosatelitske lokuse. Parson i sur. (2002) su analizirali dio kontrolne regije mtDNA dugačak 549 pb da bi pridonijeli određivanju statusa dobrih dupina u sjevero-istočnoj

Škotskoj, čija se brojnost smanjuje, te je taj predio predložen za posebnu zaštitu pod European Union Habitats Directive. Autori su istražili spomenutu regiju u 29 jedinki, od čega je 15 jedinki pripadalo populaciji na SI Škotske, a ostale su bile iz pet drugih zemljopisnih predjela oko Britanskih otoka. Utvrdili su da populacija sa SI Škotske ima znatno manju genetičku raznolikost od ostalih istraženih populacija, te da je srodnija velškoj populaciji nego populaciji na zapadu Škotske, koja joj je geografski bliža. Natoli i sur. (2004) su istražili populacijsku strukturu i specijaciju roda *Tursiops* korištenjem devet mikrosatelitskih lokusa i slijeda kontrolne regije mtDNA dugog 297 pb. Istraživanje su proveli na 297 uzoraka *Tursiops* sp. iz sedam geografskih područja cijeloga svijeta, od čega je jedno područje bilo Sredozemno more. I podaci dobiveni usporedbom sljedova mtDNA i mikrosatelitni podaci su pokazali da postoji diferencijacija između svih regionalnih populacija, što ukazuje da postoji samo ograničeni protok gena u ženki i u mužjaka između tih populacija. U svom izvješću znanstvenom odboru ACCOBAMS-a (Agreement on the Conservation of Cetaceans of the Black Sea, Mediterranean Sea and contiguous Atlantic area), Viaud i sur. (2004) izvješćuju o istraživanju u kojem su utvrdili da su dobri dupini iz Crnog mora genetički i morfološki različiti od populacija iz Sredozemnog mora. U istraživanju su koristili 99 uzoraka iz istočnog Atlantika, Egejskog mora, Ligurskog mora, obale Izraela i Crnog mora, a uspoređivali su fragment kontrolne regije mtDNA dug 442 pb. Autori zaključuju da su pribavili dovoljno dokaza da se dobre dupine Crnog mora može smatrati evolucijski jedinstvenima, te ih je potrebno zaštititi. Uz to smatraju da im se treba priznati status podvrste – *Tursiops truncatus ponticus* Barabash-Nikiforov, 1940. Populacijsku strukturu obalnih dobrih dupina roda *Tursiops* u Shark Bay-u na zapadnoj obali Australije istražili su Krützen i sur. (2004). Istraživanje su provodili na velikom uzorku – sakupili su 362 biopsata u periodu od pet godina. Genotipizirali su 10 mikrosatelitskih lokusa 302 jedinke, a sekvencirali su kontrolnu regiju mtDNA i koristili fragment dug 351 pb 220 jedinki. Analiza genetičke diferencijacije je pokazala uzorak „izolacije s udaljenošću“ (engl. isolation-by-distance). Rezultati su također upućivali na to da je disperzija ženki dupina u tom području više ograničena od disperzije mužjaka. Natoli i sur. (2005) su analizirali 145 uzoraka dobrih dupina u rasponu od Crnog mora do istoka sjevernog dijela Atlantskog oceana, među kojima je bilo i 11 uzoraka iz istočnog sjevernog Jadrana. Koristili su devet mikrosatelitskih lokusa i dio kontrolne regije mtDNA dug 630 pb. Među ostalim, pronašli su da se granice pojedinih populacija poklapaju s prelazima između različitih staništa. Strukturu populacija dobrog dupina u Meksičkom zaljevu istražili su Sellas i sur. (2005) usporedbom dijela kontrolne regije mtDNA dugog 450 pb i devet mikrosatelitskih lokusa na uzorcima kože od 223 jedinke sakupljene od 1996. do 2002.

godine s pet različitih lokacija Meksičkog zaljeva. Rezultati su pokazali da postoji genetička podjela između lokalnih populacija, što je bilo dosta iznenađujuće s obzirom da te populacije obitavaju vrlo blizu jedna drugoj i da ne postoje očite prepreke koje bi sprečavale protok gena. Parsons i sur. (2006) su istražili genetičku strukturu, odnosno stupanj podjele populacije dobrog dupina obalnog ekotipa između tri regije koje se nalaze na udaljenosti manjoj od 250 km u sjevernom dijelu Bahama. Analizirali su fragment kontrolne regije mtDNA dug 483 pb, te 17 mikrosatelitskih lokusa. Koristili su uzorke kože, krvi i izmeta 56 jedinki. Premda je stupanj genetičke različitosti ukazao na to da postoji protok gena između tri istraživane regije, i nuklearni i mitohondrijski podaci su upućivali na značajan stupanj podjele između istraživanih populacija, a analiza spolova je ukazivala da disperzija nije vezana isključivo za mužjake. Ti podaci su poduprli rezultate dugotrajnih foto-identifikacijskih istraživanja koji su pokazali da postoji vjernost mjestu boravka (engl. site fidelity) u sjevernim Bahamima, te su istaknuli potrebu da se neovisne subpopulacije uzmu u obzir kada se raspravlja o zaštiti i upravljanju obalnim dobrim dupinima na Bahamima.

2.4.2. Istraživanja na ostalim vrstama kitova uključenim u ovo istraživanje

Plavobijeli dupin

García-Martínez i sur. (1999) istražili su genetičku diferencijaciju 98 plavobijelih dupina nađenih na obalama različitih europskih zemalja, a koristili su metodu polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata mitohondrijske DNA. Našli su 27 različitih haplotipova, a između sredozemnih i atlantskih uzoraka nije bilo zajedničkih haplotipova, što upućuje na postojanje dvije različite populacije i vrlo ograničen protok gena među njima. Valsecchi i sur. (2004) su pak istraživali strukturu populacije plavobijelih dupina u Sredozemlju i genetičke posljedice morbilivirusne epizootije, korištenjem deset mikrosatelitnih biljega. I ovi autori su potvrdili odvojenost između sredozemne i atlantske populacije plavobijelih dupina, te su utvrdili da atlantska populacija ima veću genetičku raznolikost. Uz to su korištenjem genetičke mjere za razmnožavanje u visokom srodstvu (engl. inbreeding) pronašli da su jedinke koje su ugibale rano za vrijeme epizootije bile značajno više visokosrodne od jedinki koje su ugibale kasnije. Ti rezultati upućuju na važnost razine razmnožavanja u visokom srodstvu na dinamiku širenja zaraznih bolesti.

Glavati dupin

Pregledom literature nisam pronašla niti jedan rad koji bi se bavio genetičkom raznolikošću glavatog dupina.

Krupnozubi dupin

Dalebout i sur. (2005) su istražili filogeografsku strukturu krupnozubih dupina na 87 uzoraka iz cijeloga svijeta usporedbom sljedova kontrolne regije mtDNA dugih 290 pb. U to istraživanje bila su uključena i dva naša uzorka iz Hrvatske. Rezultati su pokazali visoki stupanj izolacije i nizak majčinski protok gena između oceanskih populacija krupnozubih dupina. Gomerčić i sur. (2006) su koristili sekvenciranje kontrolne regije mtDNA i usporedbu dobivenih sljedova s referentnom bazom podataka porodice brazdastih dupina (Ziphiidae), čime su potvrdili da istraživane jedinke pripadaju vrsti krupnozubi dupin.

Ne postoje objavljeni radovi na krupnozubim dupinima u kojima bi bili korišteni mikrosatelitski lokusi.

Veliki sjeverni kit

Bérubé i sur. (1998) su proveli istraživanje na 407 jedinki velikog sjevernog kita korištenjem 288 pb dugog slijeda kontrolne regije mtDNA i genotipiziranjem šest mikrosatelitskih lokusa. Rezultati upućuju na postojanje nekoliko populacija u sjevernom dijelu Atlantika i Sredozemlja koje su se nedavno odvojile, te vjerojatno postojanje samo ograničenog protoka gena između susjednih populacija. Isto tako su Bérubé i sur. (2002) korištenjem istog lokusa mtDNA i genotipiziranjem 16 mikrosatelitskih lokusa pokazali da kitovi u Kalifornijskom zaljevu predstavljaju vrlo izoliranu a time i evolucijski jedinstvenu populaciju koja zahtijeva posebne mjere zaštite, pogotovo zato što joj se brojnost procjenjuje na samo oko 400 jedinki.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Sakupljanje uzoraka

Uginule jedinke morskih sisavaca iz reda kitova sakupljamo od 1994. godine u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu vrši se razudba lešina i uzimanje uzoraka tkiva za daljnja istraživanja (Slika 5). Ponekad je razudba učinjena na mjestu nalaza lešine. Od svake nađene jedinke uzorak mišićnog tkiva smo pohranjivali u epruvete s 70%-tnim etilnim alkoholom, te čuvali na -20°C . U ovoj disertaciji koristila sam uzorke skupljene od 1994. godine do 2004. godine, a većina uzoraka sakupljena je u razdoblju od 1999 do 2003. godine. Podaci o korištenim uzorcima nalaze se u Tablici 2.



Slika 5. Razudba i uzimanje uzoraka tkiva mladunčeta dobrog dupina na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Vrste kitova koje su sakupljene i korištene za istraživanje u ovoj disertaciji bile su slijedeće:

dobri dupin - *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) - 34 uzoraka iz Hrvatske i 5 iz Izraela

plavobijeli dupin - *Stenella coeruleoalba* (Mayen, 1833) – 12 uzoraka

glavati dupin - *Grampus griseus* (Cuvier, 1812) – 5 uzoraka

krupnozubi dupin - *Ziphius cavirostris* Cuvier, 1823 – 1 uzorak

veliki sjeverni kit - *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758) – 2 uzorka.

Tablica 2. Podaci o uzorcima korištenim u istraživanju. Oznake M i S pod stupcem „rezultat“ označavaju da li je uspješno provedena genotipizacija mikrosatelitskih lokusa (M) i da li je dobiven slijed kontrolne regije mtDNA (S) za pojedini uzorak

vrsta/jedinka	spol	masa (kg)	starost (god.)	datum nalaza	mjesto nalaza	rezultat
dobri dupin						
10	m	75	1	01. 09. 1994.	Skrivena luka, Lastovo	M
20	ž	214	21	08. 10. 1997.	Pirovac	M S
22	m		3	17. 03. 1998.	Kanica pokraj Rogoznice	M S
23	m		11	12. 01. 1999.	Dubrovnik	M S
25	ž	228	12	27. 02. 1999.	Vrsi, pokraj Nina	M
28	m	249	16	09. 07. 1999.	Split	M S
32	m	128	3	01. 11. 1999.	Rovinj	M S
38	ž	261	21	12. 01. 2000.	rijeka Zrmanja	M S
39	ž	192	17	02. 03. 2000.	Duboka, južno od ušća Neretve	M S
40	m	288	13	17. 03. 2000.	u moru Kornatskog otočja	M
41	ž	224	12	27. 04. 2000.	Milna, Hvaru	M S
46	ž	24	1	03. 07. 2000.	južno od uvale Miholjašćice, Cres	M S
51	ž		21	15. 02. 2001.	mjesto Ugljan	M S
54	ž	236	17	18. 03. 2001.	kanal Plavnik, Cres	M
55	ž	62	2	23. 03. 2001.	grad Hvar	M S
56	m			08. 04. 2001.	grad Krk	M
57	ž		7	11. 04. 2001.	Novigrad	M S
62	m	155	14	19. 07. 2001.	Vrboska, Hvar	M
64	m	305	17	09. 10. 2001.	Novigrad, Istra	M S
76	m	178	12	20. 02. 2002.	Pridraga, Novigradsko more	M
80	m	324	17	01. 03. 2002.	Kukljica, Ugljan	M S
87	ž	79	5	16. 04. 2002.	Žrnovska Banja, Korčula	M S
91	ž	246	13	11. 07. 2002.	uvala Dalje, kod Novigrada, Istra	M S
92	ž	32	1	02. 08. 2002.	Jezera, Murter	M S
93	ž	65	mladunče	05. 08. 2002.	Luka, Dugi otok	M S
95	ž	40	mladunče	13. 08. 2002.	Zaglav, Dugi otok	M S
99	m	249	12	08. 10. 2002.	otoka Škarda, kod Paga	M
101	m	98	5	31. 10. 2002.	Split	M S
102	ž	216	20	24. 12. 2002.	ušće Mirne, Istra	M S
103	m	101	2	14. 03. 2003.	zapadna obala otoka Vira	M
104	m	210	20	17. 07. 2003.	između Cresa i Rapca	S
108	ž	209	17	06. 10. 2003.	Pirovac	S
111	ž	130	10	30. 11. 2003.	Preko, Ugljan	S
B1	ž			26. 06. 2003.	između Iža i Sestrinja	S
A502					Izrael	M
DO98					Izrael	M S
Mio1a					Izrael	M
Mi01b					Izrael	M
PA98					Izrael	M S
plavobijeli dupin						
27	m		11	23. 06. 1999.	pokraj Skradina, rijeka Krka	M S
34	m	40		14. 09. 1999.	Trogir	M S
53	m	72		15. 03. 2001.	uvala Ripna, Korčula	M S
71	m	99	13	19. 01. 2002.	Meraga, Cres	M S
73	ž	90	17	05. 02. 2002.	između Sušca i Korčule	M S
74	ž	100	15	08. 02. 2002.	između Supetra i Splitske, Brač	M S
78	ž	86	15	21. 02. 2002.	Orebić	M
79	ž	91	22	25. 02. 2002.	Poreč	M S
81	m	67	12	30. 03. 2002.	uvala Ruda, Vis	M
89	m	98	23	21. 06. 2002.	rijeka Jadro, Solin	M S

115	ž	96	22	16. 04. 2004.	ušće Neretve	S
121	ž	82	12	04. 07. 2004.	otok Supetar, Cavtat	S
glavati dupin						
67	ž	248		21. 11. 2001.	Rijeka	M
68	m	305	spolno zreli	31.12. 2001.	otočić Karantunić, uz Ugljan	M
69	m	268		10. 01. 2002.	uvala Saplnara, Mljet	M
70	m	288		18. 01. 2002.	Viška luka, Vis	M
84	m	185	mlada životinja	30. 04. 2002.	Prižba, Korčula	M
krupnozubi dupin						
58	ž	610	mlada životinja	12. 04. 2001.	Srebreno, Dubrovnik	M
veliki sjeverni kit						
50	m		mladunče	11. 11. 2000.	Karinsko more	M
98	ž		mladunče	27. 09. 2002.	otok Prvić, pokraj Baške, Krk	M S

3.1.1. Uzorci dobrog dupina

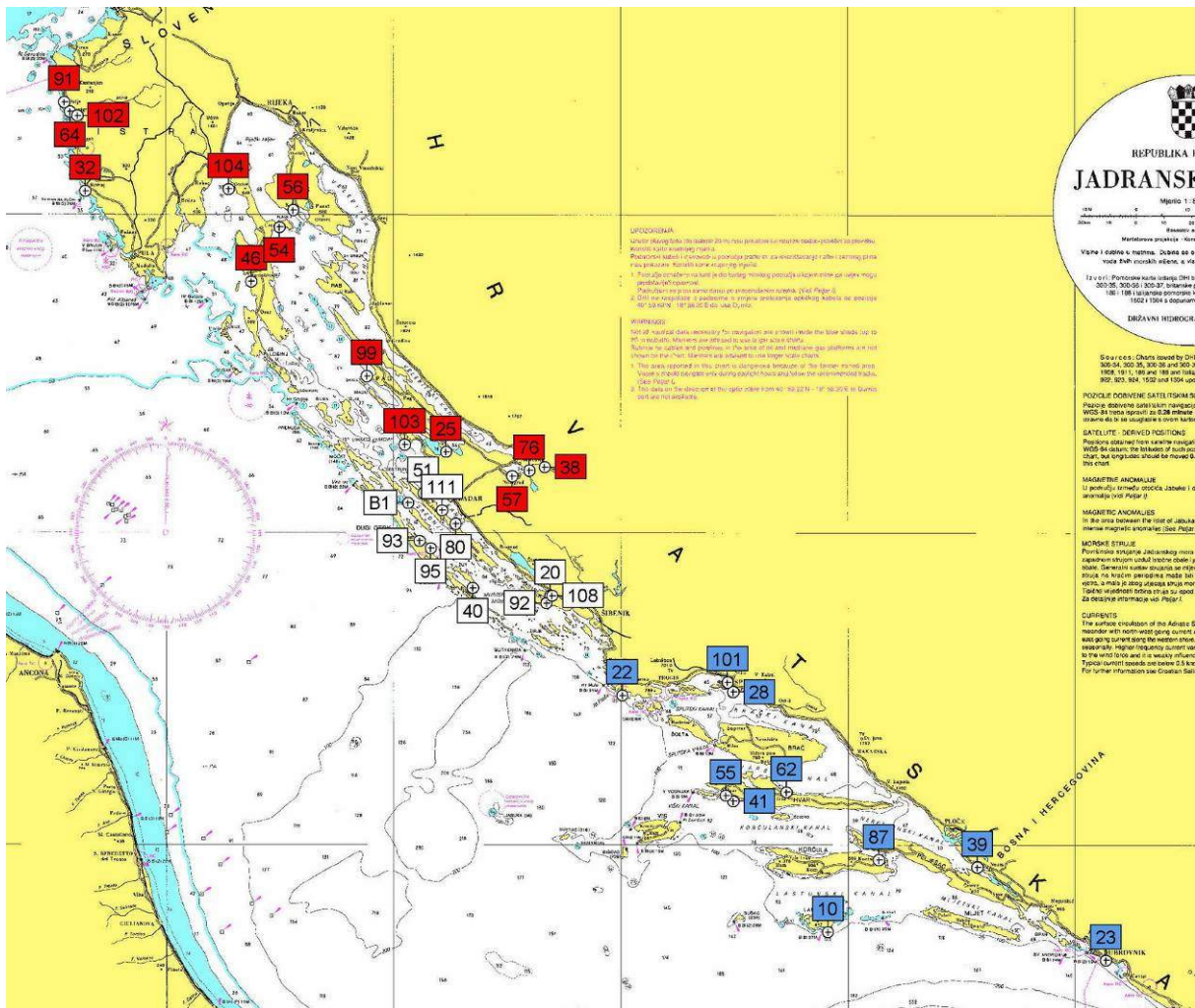
Do proljeća 2003. godine sakupljeno je 44 uzoraka tkiva s lešina dobrih dupina nađenih duž cijele hrvatske obale Jadranskog mora. Međutim, za neke od uzoraka se pokazalo da imaju degradiranu DNA, te su bili isključeni iz daljeg istraživanja. Kriterij za uključivanje uzoraka u istraživanje bio je najmanje sedam uspješno izgenotipiziranih mikrosatelitskih lokusa od ukupno 12. Konačni broj uzoraka dobrih dupina uključenih u istraživanje korištenjem mikrosatelitskih lokusa iznosio je 30. Dodatno sam za sekvenciranje koristila jedan uzorak biopsije kože, koji je uzet strelicom sa žive jedinke (uzorak označen B1) i tri uzorka tkiva (uzorci 104, 108, i 111), sakupljena kasnije. Uz uzorke jadranske populacije dobrog dupina koristila sam i pet uzoraka dobrih dupina dobivenih iz Izraela, ljubaznošću Aviad Scheinina, iz The Israel Marine Mammal Research and Assistance Center, Haifa, Izrael.

Lokacije na kojima su nađeni uzorci dobrih dupina prikazala sam na karti na Slici 6.

3.1.2. Uzorci ostalih vrsta kitova

Koristila sam 12 uzoraka plavobijelog dupina, pet uzoraka glavatog dupina, jedan uzorak krupnozubog dupina, te dva uzorka velikog sjevernog kita.

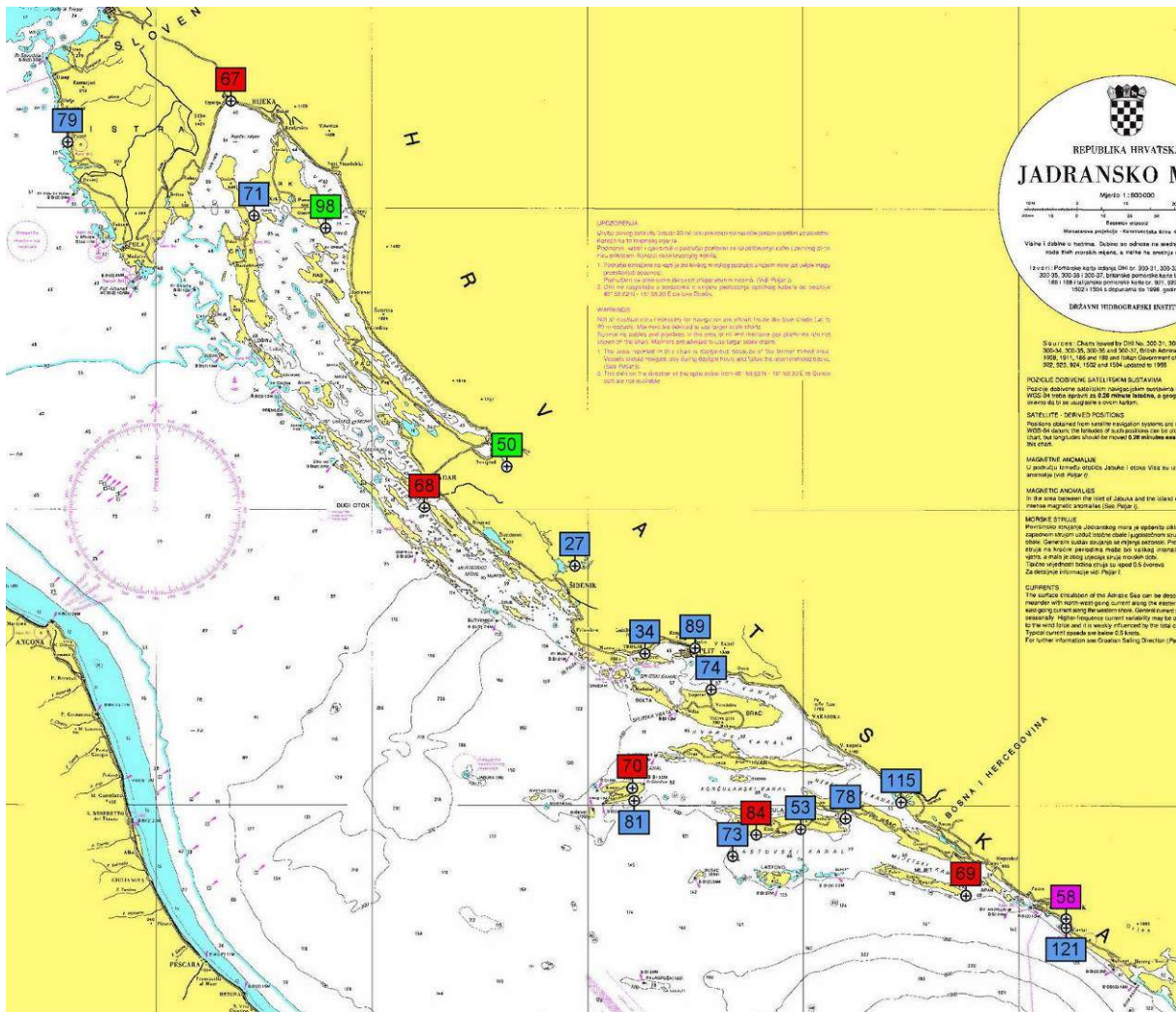
Lokacije na kojima su nađeni uzorci ostalih vrsta kitova prikazala sam na karti na Slici 7.



Slika 6. Karta Jadranskog mora s označenim lokacijama na kojima su pronađeni uzorci dobrih dupina. Uzorci iz sjevernog dijela Jadranskog mora označeni su crvenom bojom, iz srednjeg bijelom, a iz južnog plavom bojom. Takva podjela korištena je kod procjene udaljenosti između jedinki i analizi molekularne varijance na osnovu mikrosatelitskih genotipova.

3.2. Izolacija DNA

Ukupna DNA izolirana je iz uzoraka mišića jednom od sljedećih metoda: metodom isoljavanja ili korištenjem kita JETQUICK Tissue DNA Spin Kit.



Slika 7. Karta Jadranskog mora s označenim lokacijama na kojima su pronađeni uzorci ostalih vrsta kitova. Plavom bojom označeni su uzorci plavobijelih dupina, crvenom bojom glavatih dupina, ljubičastom uzorak krupnozubog dupina, a zelenom bojom su označeni uzorci velikog sjevernog kita.

3.2.1. Izolacija DNA metodom izoliranja (modificirano prema protokolu Bruford i sur. 1998)

U plastične epruvete (Eppendorf, 2 ml) stavili smo 1 ml TNE pufera (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.5). Oko 50 mg tkiva smo usitnili skalpelom u plastičnoj petrijevki, a komadiće tkiva dodali u epruvetu s TNE puferom. Dodali smo 1.5 µl proteinaze K, koncentracije 50 mg/ml, te 30 µl 20 %-tnog SDS-a, dobro promiješali te inkubirali preko noći na 45° C (od 37° C do 50° C). Nakon inkubacije dodali smo 0.5 ml 6 M

NaCl i snažno miješali 15 sekundi, te centrifugirali 10 minuta na 2500 okretaja/minuti u mikrocentrifugi (Centrifuge 5415, Eppendorf). U novu epruvetu prenijeli smo 0.5 ml supernatanta, te dodali 1.25 ml 100%-tnog etanola, ohlađenog na -20 °C. Pažljivo smo miješali epruvete izvrtanjem do pojave taloga DNA, a zatim centrifugirali 5 minuta na 13000 okretaja/min. Etanol smo pažljivo izlili iz epruvete, a talog DNA isprali s 1 ml 70 %-tnog etanola, te ponovo centrifugirali epruvete 5 minuta na 13000 okretaja/min. Konačno samo etanol odlili, a epruvete ostavili preko noći okrenute naopako s ciljem sušenja DNA. Dodali smo 50 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), ostavili preko noći na 4 °C radi otapanja DNA. Otopljenu DNA pohranili smo na -20 °C.

3.2.2. Izolacija DNA korištenjem komercijalno dostupnog kita – JETQUICK Tissue DNA Spin Kit, GENOMED GmbH, Löhne, Germany

Izolaciju DNA smo izvršili prema protokolu proizvođača, koji koristi kolonice za koje se veže DNA. JETQUICK protokol je modifikacija metode koju je objavio Bowtell (Bowtell 1987). U krajnjem koraku smo eluirali DNA s 200 µl deionizirane vode zagrijane na 70 °C. Tubice s otopljenom DNA smo također pohranili na -20 °C.

Izoliranu DNA dalje sam koristila za genotipizaciju mikrosatelitskih lokusa i za sekvenciranje.

3.3. Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa

3.3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančanom reakcijom polimerazom umnažala sam 12 mikrosatelitskih lokusa, koji se svi sastoje od dinukleotidnih ponavljanja. Korišteni lokusi bili su slijedeći:

EV1Pm, EV14Pm, EV37Mn, EV94Mn (Valsecchi i Amos 1996), D08, D14, D18, D22, D28 (Shinohara i sur. 1997), TexVet3, TexVet5 i TexVet7 (Rooney i sur. 1999).

Za svaki uzorak sam provodila po četiri PCR reakcije, a u svakoj reakciji umnažala po tri mikrosatelitska lokusa zajedno (združena PCR reakcija, engl. multiplex PCR), što znači da sam u svaku združenu PCR reakciju dodavala po tri uzvodne i tri nizvodne početnice. Svaka uzvodna početnica bila je obilježena jednom od tri fluorescencijske boje (JOE - zelena, FAM - plava ili TAMRA - žuta). Početnice su sintetizirali u VBC-GENOMICS, Beč, Austrija. Svaku početnicu sam otopila u TE puferu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) tako da

sam dobila „stock“ otopine koncentracije 50 μM , koje sam čuvala na -20°C , a od njih sam dalje radila „radnu“ otopinu početnica (10XPM), koja je sadržavala šest početnica (tri obilježene, uzvodne i tri neobilježene, nizvodne, odn. po dvije početnice za svaki od tri lokusa), svaku u koncentraciji od 2 μM .

Kod združivanja lokusa za zajedničko umnažanje, vodila sam računa da im se rasponi duljina uzeti iz referentne literature ne preklapaju. Združene PCR reakcije s pripadajućim lokusima, sekvencama početnica za njihovo umnažanje, fluorescencijskim bojama kojima su obilježene pojedine uzvodne početnice i očekivanim veličinama umnoženog PCR proizvoda (veličine dobivene u referentnoj literaturi) prikazane su u Tablici 3.

Za PCR reakcije koristila sam QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN GmbH, Germany), koji je razvijen posebno u svrhu umnažanja združenih PCR reakcija. Kit se sastoji od „Master Mix“-a koji sadrži optimizirane koncentracije HotStarTaq DNA polimeraze, MgCl_2 , dNTP-e i PCR pufer koji ima uravnoteženu kombinaciju soli i dodataka tako da osigurava učinkovito vezanje i produljenje svih početnica u reakciji.

Za svaku združenu PCR reakciju koristila sam:

4 μl Qiagen Master Mix

0.8 μl 10 X PM (mješavina početnica, engl. primer mix): sadrži 2 μM svake početnice

1.2 μl destilirane vode

2 μl DNA kalupa

Ukupni volumen PCR smjese bio je 8 μl , a PCR reakcije sam provodila u plastičnim tubicama od 0.2 ml, Micro-Strips & Caps (Advanced Biotechnologies LTD). PCR reakcije sam provodila koristeći uređaje GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) ili GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Uvjeti izvođenja PCR (temperatura i trajanje svakog koraka, te broj ciklusa) bili su slijedeći:

95° C, 15 min (početna aktivacija polimeraze)

30 ciklusa: 94° C, 30 s (denaturacija)

55° C, 90 s (spajanje početnica)

72° C, 60 s (produljenje početnica)

60° C, 30 min (konačno produljenje umnoženih slijedova DNA).

Nakon završetka PCR reakcije, uzorke sam pohranjivala na 4° C do daljnje analize PCR proizvoda.

Tablica 3. Sljedovi uzvodne i nizvodne početnice za mikrosatelitske lokuse koje sam umnažala podijeljene u četiri združene PCR reakcije. Uzvodne početnice bile su obilježene određenom fluorescentnom bojom, koju je genski analizator detektirao kao zelenu, plavu ili žutu boju (boje pozadine u tablici odgovaraju fluorescentnim bojama: JOE daje zelenu boju, FAM plavu, a TAMRA žutu). Lokusi za umnažanje združeni su u PCR reakcije tako da im se očekivane veličine ne preklapaju, tako da se nakon PCR reakcija mogu zajedno odvajati u polimeru.

Združeni PCR	Lokus	Skraćeni naziv lokusa	Fluorescentna boja	Sekvenca uzvodne (gornji red) i nizvodne (donji red) početnice	Očekivana veličina umnoženog PCR proizvoda
1	D18	D18	JOE	CCCAAAACCGACAGACAGAC GATCTGGGGATGCAGG	90
	EV1Pm	EV1	FAM	CCCTGCTCCCCATTCTC ATAAACTCTAATACACTTCCTCCAAC	115-197
	TexVet3	TV3	TAMRA	GCCCTCACGTTTCATTCATGTTGTT CCGTGTTCACTCCAGCATTATTTCCACA	207-267
2	D08	D08	JOE	GATCCATCATATTGTCAAGTT TCCTGGGTGATGAGTCTTC	103
	D14	D14	FAM	CTAGTCATATAGTGGTAACAC GTTTTGTTGAAAGGAGGTCTC	120
	TexVet5	TV5	TAMRA	GATTGTGCAAATGGAGACA TTGAGATGACTCCTGTGGG	236-260
3	EV14Pm	EV14	TAMRA	TAAACATCAAAGCAGACCCC CCAGAGCCAAGGTCAAGAG	123-159
	TexVet7	TV7	JOE	TGCACTGTAGGGTGTTTCAGCAG CTTAATTGGGGGCGATTTTAC	155-163
	EV94Mn	EV94	FAM	ATCGTATTGGTCCTTTTCTGC AATAGATAGTGATGATGATTCACACC	198-261
4	D22	D22	TAMRA	GGAAATGCTCTGAGAAGGTC CCAGAGCACCTATGTGGAC	135
	D28	D28	JOE	ATCCCTTTTCTAAGTCAAAGG TATTACCTCTCACTTTTATAGG	145
	EV37Mn	EV37	FAM	AGCTTGATTTGGAAGTCATGA TAGTAGAGCCGTGATAAAGTGC	178-224

Za pozitivnu kontrolu PCR reakcije koristila sam DNA kalup nekog od uzoraka za koje sam u ranijim reakcijama utvrdila da se uspješno umnaža, te sam imala točno određen genotip za pojedine lokuse za uzorak koji mi je služio za pozitivnu kontrolu.

3.3.2. Elektroforeza i analiza rezultata elektroforeze

3.3.2.1. Priprema uzoraka za elektroforezu

U tubice za elektroforezu Genetic Analyzer 0.5 ml Sample Tubes dodala sam 12 μ l smjese formamida i standarda veličine ROX (11.75 μ l formamida i 0.25 μ l ROX standarda) i 1 μ l PCR proizvoda, tubice poklopila poklopcima Genetic Analyzer Septa for 0.5 ml Sample Tubes i denaturirala 3 minute na 94° C, te ih odmah nakon toga rashladila na 4° C. Takve tubice složila sam na stalak koji se stavlja u genski analizator u kojem se provodi elektroforeza. ROX (GeneScan - 350 ROX™ Standard, Applied Biosystems) je unutrašnji standard veličina, a neophodan je za precizno određivanje duljine DNA fragmenata kod genske analize. Sastoji se od 16 jednolančanih fragmenata slijedećih veličina:

35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350 baza.

3.3.2.2. Elektroforeza

Elektroforezu smo provodili u genskom analizatoru ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) koristeći Virtual Filter Set A, prema uputama proizvođača.

3.3.2.3. Analiza rezultata elektroforeze

Rezultate elektroforeze analizirala sam pomoću programa GeneScan Analysis Software, Version 3.1. On koristi unutrašnji standard veličina (u ovom istraživanju to je bio GeneScan – 350 ROX) da bi napravio kalibracijsku krivulju veličine jednolančanih DNA fragmenata za svaki uzorak na kojem sam provodila elektroforezu, te uz pomoć nje određuje duljinu svakog PCR proizvoda. Za konverziju veličina DNA fragmenata u genotipove koristila sam program ABI PRISM Genotyper 2.5.2. Software.

3.3.3. Statistička analiza genotipova

3.3.3.1. Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže

Za procjenu broja alela, alelnih frekvencija i očekivane heterozigotnosti (H_E) (Nei 1978) koristila sam program Genetix 4.05. (Belkhir i sur. 1996-2004). Program PowerMarker v.3.25 (Liu i Muse 2005) koristila sam za procjenu uočene heterozigotnosti (H_O), očekivane heterozigotnosti (H_E), koja se još naziva i genskom raznolikošću (Weir 1996), koeficijenta križanja u bliskom srodstvu (f , engl. inbreeding coefficient), procijenjen metodom momenata, te za testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE). Za testiranje HWE koristila sam permutacijsku verziju egzaktnog testa Guo i Thompsona (1992).

3.3.3.2. Procjena neravnoteže vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium)

Obzirom da kromosomske lokacije korištenih mikrosatelitskih lokusa nisu poznate, a vezani geni imaju smanjenu upotrebljivost za neka populacijsko-genetička istraživanja, testirala sam da li eventualno postoji neravnoteža vezanosti gena, odn. mogu li se korišteni lokusi koristiti kao neovisni genetički biljezi. Koristila sam program GENEPOP, web-verzija (Raymond and Rousset 1995). Za svaki par lokusa napravljene su tablice kontingencije. Nulta hipoteza (H_0) glasi: genotipovi jednog lokusa ne ovise o genotipovima drugog lokusa. Test vjerojatnosti navedene hipoteze temelji se na Fisherovom egzaktnom testu uz poduzorkovanje po metodi Markovljevih lanaca (Guo i Thompson 1992). U svrhu korekcije dobivenih vjerojatnosti na višestruko testiranje korištena je postupna Bonferronijeva korekcija (Holm 1979, Rice 1989) uz pomoć programa SAS Release 8.02 (SAS Institute 1999).

3.3.3.3. Procjena „uskog grla“ (engl. bottleneck)

Da bi procijenila da li je populacija dobrih dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora nedavno prošla kroz „usko grlo“ (engl. bottleneck) efektivne veličine svoje populacije, koristila sam program „Bottleneck, A program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data“, v. 1.2.02. (Cornuet i Luikart 1996). U populacijama koje su nedavno prošle kroz „usko grlo“, genska raznolikost (H_E) je veća od genske raznolikosti koja se očekuje pod pretpostavkom da je populacija bila konstantne veličine, odn. da je populacija u ravnoteži između mutacija i genetičkog drifta (H_{EQ}). Program Bottleneck

uspoređuje te dvije genske raznolikosti, a H_{EQ} računa iz uočenog broja alela po različitim modelima mutacije: modelu beskonačnog broja alela (IAM, engl. Infinite Allele Model), modelu postupnih mutacija (SMM, engl. Stepwise Mutation Model), te dvofaznom modelu (TPM, engl. Two-Phase Model). Model beskonačnog broja alela pretpostavlja da svakom mutacijom nastaje novi alel (Kimura i Crow 1964). Model postupnih mutacija pretpostavlja da novi aleli nastaju dobitkom ili gubitkom jedne ponavljajuće jedinice, odnosno mikrosatelitskog motiva (Ohta i Kimura 1973). Dvofazni model pretpostavlja da većina mutacija slijedi SMM, ali dozvoljava i određeni postotak promjena po modelu IAM (Di Rienzo i sur. 1994). S obzirom da malo mikrosatelitskih lokusa strogo slijedi SMM model, autori preporučuju koristiti TPM model, te sam uz IAM i SMM primijenila i TPM, i to pod pretpostavkom da postoji 70% (TPM-70) i 95% (TPM-95) postupnih mutacija. Da bi utvrdila da li u istraživanoj populaciji postoji značajan višak heterozigota po svim lokusima izabrala sam predloženi Wilcoxonov test zbroja rangova.

3.3.3.4. Procjena udaljenosti među jedinkama

Genetičke udaljenosti na temelju udjela zajedničkih alela (engl. proportion of shared alleles distance) $1-P_{SA}$ (Bowcock i sur. 1994) između jedinki izračunala sam pomoću programa Microsat (Minch i sur. 1997). Neukorjenjeno filogenetsko stablo je konstruirano na osnovi dobivene matrice udaljenosti pomoću „neighbour-joining“ (NJ) metode implementirane u programu Phylip 3.5 (Felsenstein 1993). „Bootstrap“ poduzorkovanje sam koristila da bi procijenila pouzdanost pojedinih skupina na dobivenom stablu. Uzorke dobrih dupina iz Jadranskog mora sam podijelila prema mjestu nalaza na uzorke iz sjevernog, srednjeg i južnog Jadranskog mora (Slika 6).

3.3.3.5. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

Razdiobu genetičke varijacije između i unutar regija na kojima su sakupljeni uzorci dobrih dupina istražila sam analizom molekularne varijance (AMOVA) i procjenom fiksacijskog indeksa (F_{ST}), korištenjem programa Arlequin, ver. 3.1 (Excoffier i sur. 2005), na osnovi matrice genetičke udaljenosti na temelju udjela zajedničkih alela ($1-P_{SA}$) između jedinki (izračunatu programom Microsat). Statističku značajnost procijenila sam korištenjem 10000 permutacija. Prvo sam provela analizu između dvije skupine uzoraka: hrvatskih i

izraelskih. Nakon toga sam hrvatske uzorke podijelila u tri skupine - uzorci iz sjevernog, srednjeg i južnog Jadrana (Slika 6), te provela analizu između svih parova skupina.

3.4. Sekvenciranje kontrolne regije mitohondrijske DNA

3.4.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR reakcijom sam umnažala kontrolnu regiju mitohondrijske DNA. Za to sam koristila uzvodnu početnicu MTCRf i nizvodnu početnicu MTCRr (Hoelzel i Green 1998, Natoli i sur. 2005), koje su malo skraćene verzije originalnih početnica, a kojima nastaje PCR proizvod dugačak oko 1000 pb (Hoelzel i sur. 1991).

Sljedovi početnica su slijedeći:

Uzvodna početnica MTCRf: 5' – TTC CCC GGT CTT GTA AAC C – 3'

Nizvodna početnica MTCRr: 5' – ATT TTC AGT GTC TTG CTT T – 3'

Mjesta koja prepoznaju navedene početnice prikazala sam u Literaturnom pregledu, na Slici 4.

Početnice su sintetizirali u VBC-GENOMICS, Beč, Austrija. Svaku početnicu sam otopila u deioniziranoj vodi tako da sam dobila „stock“ otopine koncentracije 100 μ M, koje sam čuvala na -20° C, a od njih sam dalje radila „radnu“ otopinu početnica (10XPM), koja je sadržavala obje početnice, svaku u koncentraciji 2 μ M.

I za ove PCR reakcije sam koristila QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN GmbH, Germany), premda se nije radilo o združenim PCR reakcijama.

Prvo sam provodila optimizaciju PCR reakcija, za što sam koristila:

4 μ l Qiagen Master Mix

0.8 μ l 10 X PM (sadrži 2 μ M početnice MTCRf i 2 μ M početnice MTCRr)

2.4 μ l destilirane vode

0.8 μ l DNA kalupa

Znači da je ukupni volumen kod PCR reakcija za optimizaciju iznosio 8 μ l, što je bilo dovoljno za provjeru PCR proizvoda na gelu. U toku optimizacije, mijenjala sam uvjete izvođenja PCR reakcije u uređaju za izvođenje PCR (uglavnom sam optimizirala temperaturu vezanja početnica za kalup DNA, engl. annealing temperature), sve dok nisam dobila zadovoljavajući izgled PCR proizvoda na gelu, što je značilo da nema nespecifičnih fragmenata.

Nakon što sam izoptimizirala PCR reakciju, umnažanje kontrolne regije mtDNA za svaki uzorak sam provodila u većem volumenu (25 μ l), jer mi za daljnje postupke dobivanja konačne sekvence konačni volumen od 8 μ l nije bio dovoljan.

Za svaku PCR reakciju koristila sam:

12.5 μ l Qiagen Master Mix

2.5 μ l 10 X PM (sadrži 2 μ M početnice MTCRf i 2 μ M početnice MTCRr)

7.5 μ l destilirane vode

2.5 μ l DNA kalupa

Ukupni volumen PCR smjese bio je 25 μ l, a PCR reakcije sam provodila u plastičnim tubicama od 0.2 ml, MicroAmp Reaction Tubes (8 Tubes/Strip) i MicroAmp Caps (8 Caps/Strip), Applied Biosystems. PCR reakcije sam provodila koristeći uređaje GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Optimizirani uvjeti izvođenja PCR (temperatura i trajanje svakog koraka, te broj ciklusa) bili su slijedeći:

95° C, 15 min (početna aktivacija polimeraze)

36 ciklusa: 94° C, 30 s (denaturacija)

61° C, 90 s (spajanje početnica)

72° C, 90 s (produljenje početnica)

72° C, 20 min (konačno produljenje umnoženih slijedova DNA).

Nakon završetka PCR reakcije, uzorke sam pohranjivala na 4° C do daljnje analize PCR proizvoda.

3.4.2. Provjera PCR proizvoda elektroforezom u agaroznom gelu

PCR proizvode provjeravala sam elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu koji sam napravila otapanjem 0.5 g agaroze (Certified™ PCR Agarose, Bio-Rad, SAD) u 50 ml 0.5X TBE pufera, zagrijavanjem do vrenja, sve dok se agarozna nije potpuno otopila. Otopinu sam izlila u kalup, stavila češalj za jažice i pustila da se gel polimerizira na sobnoj temperaturi. 0.5X TBE pufer sadrži 0.045 M Tris-borat i 0.001 M EDTA, a dobije se razrjeđivanjem „stock“ otopine 5X TBE (koja se priređuje otapanjem 54 g Tris baze, 27.5 g borne kiseline i 20 ml 0.5 M EDTA, pH 8 u destiliranoj vodi, tako da konačni volumen otopine iznosi 1l). Iz gela sam izvukla češalj, a gel stavila u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazio 0.5X TBE pufer. Na parafilmu sam izmiješala 2.4 μ l PCR proizvoda i 2 μ l pufera za nanošenje uzoraka na gel (LB pufer, engl. loading buffer), koji sadrži 0.25% bromfenol plavila, 0.25%

ksilencijanolo fluorofosfata i 15% fikola, te to nanijela u gel. Kada sam izvodila elektroforezu PCR proizvoda kod optimizacije PCR uvjeta, tada sam u gel nanosila svih 8 μ l PCR proizvoda pomiješanih s 2 μ l LB-a. U nekoliko prvih elektroforeza sam uz PCR proizvode u jednu jažicu nanijela i biljeg veličine DNA fragmenata koji se sastoji od 10 dvolančanih DNA molekula veličina 100 pb, 200 pb, 300 pb itd., do 1000 pb (100 bp Molecular Ruler, 100 μ g/ml, Bio-Rad, SAD), što mi u kasnijim elektroforezama više nije bilo potrebno, jer sam u PCR reakcije uvijek uključivala po jednu pozitivnu kontrolu, a za sve PCR proizvode sam očekivala da budu podjednake dužine. Elektroforezom sam provjeravala samo da li je došlo da umnažanja istraživanog fragmenta ili nije, te da li su se pojavili dodatni, nespecifični fragmenti. Elektroforezu sam provodila na sobnoj temperaturi, pri naponu od 90 V, a trajala je oko 30 minuta. Nakon elektroforeze gel sam stavila na 20 minuta u otopinu etidij-bromida (koncentracije 0.5 μ g/ml) u 0.5X TBE puferu radi vizualizacije DNA fragmenata obasjavanjem ultraljubičastom svjetlošću. Nakon obrade etidij-bromidom gelove sam promatrala u transiluminatoru i fotografirala digitalnim fotoaparatom.

3.4.3. Pročišćavanje PCR proizvoda

Prije sekvenciranja umnoženih željenih fragmenata DNA, potrebno je PCR proizvode pročitati. To znači da je potrebno odvojiti željene PCR proizvode od tvari koje potencijalno mogu ometati reakciju sekvenciranja, a koje se nakon PCR reakcije nalaze u PCR otopini zajedno sa željenim PCR proizvodom. Od tvari koje zaostaju, najbitnije je odstraniti preostale početnice i neiskorištene nukleotide. Čistoća i koncentracija DNA kalupa su dva najvažnija čimbenika za dobivanje kvalitetnih sekvenci u reakciji sekvenciranja.

Za pročišćavanje PCR proizvoda koristili smo komercijalno dostupan kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, SAD, prema protokolu proizvođača. Pročišćavali smo izravno ukupni volumen PCR otopine, umanjen jedino za 2.4 μ l PCR proizvoda, koje smo potrošili za provjeru uspješnosti PCR reakcije na agaroznom gelu. Nakon vezanja umnoženih fragmenata DNA na membranu, te njihovog ispiranja, eluciju smo vršili s 35 μ l deionizirane vode. Tubice s pročišćenim PCR proizvodima pohranili smo na -20 °C.

3.4.4. Sekvenciranje

Pročišćene PCR proizvode slali smo u servise za sekvenciranje, zajedno s uzvodnom početnicom MTCRF.

Servisi za sekvenciranje koje smo koristili bili su:

- DNA servis, Zavod za molekularnu biologiju, Institutu Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska, koristi četvero-kapilarni genski analizator „3100-Avant™ Genetic Analyzer“, Applied Biosystems
- „Macrogen“, Seul, Koreja, koristi 96-kapilarni genski analizator „ABI3730xl DNA Analyzer“, Applied Biosystems

Oba servisa koriste Big Dye® Terminator kit i protokol za fluorescento automatsko sekvenciranje.

3.4.5. Analiza rezultata sekvenciranja

Provjeru dobivenih rezultata sekvenciranja izvršila sam pomoću programa Chromas Lite (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html). Uspjele sekvence dalje sam analizirala u BioEdit programu (Hall 1999). U BioEditu je implementiran ClustalW program (Thompson i sur. 1994) kojim sam provela višestruko sravnjenje sljedova DNA i identificirala polimorfna nukleotidna mjesta.

3.4.6. Intra-populacijske mjere genetičke raznolikosti

Programski paket Arlequin, ver. 3.1 (Excoffier i sur. 2005) koristila sam za procjenu haplotipskih frekvencija, genetičkih udaljenosti između DNA sljedova, te osnovnih indeksa raznolikosti unutar populacija. Genetička udaljenost između parova haplotipova prikazana je kao broj različitih nukleotida između svih parova haplotipova unutar istraživanog uzorka. Od indeksa raznolikosti unutar populacija koristila sam gensku raznolikost (H), srednji broj razlika između parova sljedova (π), te nukleotidnu raznolikost (Π).

Genska raznolikost ili haplotipska raznolikost (engl. gene diversity, haplotype diversity), H , ekvivalentna je očekivanoj heterozigotnosti za diploidne podatke, a definirana je kao vjerojatnost da su dva haplotipa nasumično odabrana u uzorku različita (Nei 1987). Nukleotidna raznolikost (engl. nucleotide diversity), Π predstavlja vjerojatnost da su dva nasumično odabrana homologna nukleotida različita, odnosno predstavlja srednji broj nukleotidnih razlika po nukleotidnom mjestu između dva nasumično odabrana homologna slijeda. Ekvivalentna je genskoj raznolikosti, samo što se nukleotidna raznolikost odnosi na pojedine nukleotide, a ne na cijele sljedove.

3.4.7. Usporedba sljedova korištenih u ovom istraživanju sa sljedovima preuzetih iz GenBank baze podataka

Računalnu bazu podataka GenBank, odnosno NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pretraživala sam korištenjem alata BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), koji pronalazi sljedove slične slijedu kojeg istražujemo (megablast ili nucleotide-nucleotide blast).

3.4.8. Prikaz odnosa između haplotipova

Filogenetske analize haplotipova dobrih dupina provela sam u programu MEGA v.3.1 (Kumar i sur. 2004). Evolucijske udaljenosti procijenila sam korištenjem „Kimura 2-parametra“ modela (Kimura 1980), a filogenetsko stablo rekonstruirala pomoću „neighbor-joining“ (NJ) metode. Na isti način provela sam i 1000 „bootstrap“ poduzorkovanja, te dobila „bootstrap“ vrijednosti pouzdanosti. Konačno stablo kondenzirala sam na način da sam članke sa „bootstrap“ vrijednostima manjim od odabranih 30% kolabirala, makar se smatra da skupine s kritičnim vrijednostima manjim od 50% nisu pouzdane. Stablo je ukorijenjeno pomoću homolognog slijeda vrste *Lagenorhynchus albirostris* (engl. white-beaked dolphin), koja također pripada porodici šiljatozubih dupina (Delphinidae) (GenBank pristupni broj AJ554061, Arnason i sur. 2004), a koji je služio kao uljez (engl. outgroup).

Za prikaz filogenetskih odnosa između mtDNA haplotipova plavobijelih dupina koristila sam program Network 4.2 (<http://www.fluxus-engineering.com>) koji se temelji na „median joining“ (MJ) metodi za konstruiranje mreža (Bandelt i sur. 1995). Čvorovi u mreži predstavljaju pojedine haplotipove. Duljina grana koje povezuju pojedine haplotipove razmjerna je broju polimorfni mjesta u kojima se razlikuju haplotipovi koje određena grana povezuje.

4. REZULTATI

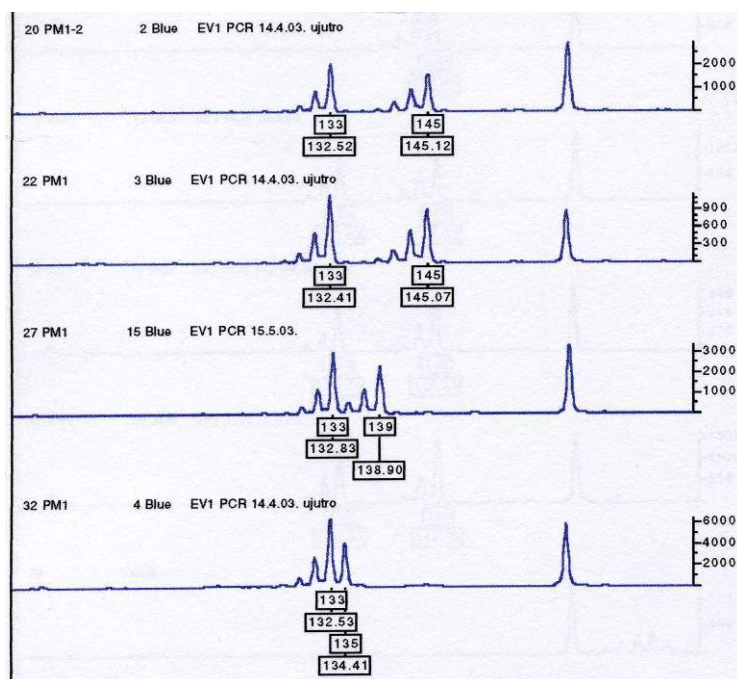
4.1. Mikrosatelitski genotipovi

4.1.1. Dobri dupin

4.1.1.1. Mikrosatelitski genotipovi i uspješnost genotipizacije

Uzorci dobrog dupina koji su uključeni u istraživanje imali su sedam ili više uspješno genotipiziranih lokusa. Trideset hrvatskih uzoraka je trebalo dati 360 genotipova, međutim 22 genotipa (6,11%) nisam uspjela dobiti čak ni nakon ponavljanja postupka genotipizacije, što znači da je uspješnost genotipizacije hrvatskih uzoraka dobrih dupina iznosila 93,89%. Uspješnost genotipizacije za pet izraelskih dobrih dupina iznosila je 100%. U Tablici 2 u poglavlju Materijal i metode označene su slovom M jedinice za koje je uspjela genotipizacija mikrosatelitskih lokusa.

Genotipove sam određivala neposredno iz elektroferograma. Primjer elektroferograma prikazala sam za lokus EV1, na Slici 8.



Slika 8. Elektroferogrami uzoraka 20, 22, 27 i 32 za lokus EV1. Vrijednosti na ordinati predstavljaju intenzitet fluorescencije, a vrijednosti na apscisi veličinu DNA fragmenata. Genotipovi (duljine alela) su sljedeći: 133/145 (uzorak 20), 133/145 (uzorak 22), 133/139 (uzorak 27), 133/135 (uzorak 32).

Dobivene genotipove dobrih dupina prikazala sam u Tablici 4. Na mjestu podataka koji nedostaju nalazi se prazno mjesto u tablici.

4.1.1.2. Opisna statistika i testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže

Svi istraženi mikrosatelitski lokusi su polimorfni. U uzorcima dobrih dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora ukupno sam našla 86 alela. Najmanje alela, samo tri, našla sam na lokusu TV7, dok najveći broj alela, čak 15, ima lokus EV37. Srednji broj alela po lokusu iznosi 7,17. U uzorcima dobrih dupina iz Izraela našla sam i pet alela koji se ne nalaze u hrvatskim uzorcima: na lokusu D08 alel 101, na lokusu EV14 alele 154 i 162, na lokusu EV37 alel 213, te na lokusu D28 alel 127 (Tablica 5). Veliki broj alela koji je nađen u hrvatskim uzorcima nisam našla i u izraelskim, no to je i bilo očekivano s obzirom da je izraelskih uzoraka bilo samo pet, tako da se broj alela i frekvencije alela izračunata iz tako malog uzorka nemogu smatrati relevantnim, te ih ovdje niti ne navodim.

Distribucija alela je isprekidana (disjunktna) za sve lokuse, osim za lokus EV1 i D08.

Broj alela po lokusu, uočena heterozigotnost (H_O) i očekivana heterozigotnost (H_E), koeficijent križanja u srodstvu (f), te P-vrijednosti testiranja Hardy-Weinbergove ravnoteže prikazala sam u Tablici 6 za populaciju dobrog dupina Jadranskog mora. Najniža vrijednost genske raznolikosti (očekivane heterozigotnosti) nađena je za lokus TV7, te iznosi 0,344; dok najviša procjenjena vrijednost iznosi 0,906, za lokus EV37. Srednja vrijednost genske raznolikosti za sve lokuse iznosi 0,699. Lokus D28 pokazuje značajno odstupanje od HWE ($P < 0.05$), te ima visok koeficijent križanja u srodstvu ($f = 0,395$) koji ukazuje na znatan deficit heterozigota na tom lokusu. Kod ostalih lokusa nije pronađeno značajno odstupanje od HWE (Tablica 6).

4.1.1.3. Procjena neravnoteže vezanosti gena (engl. linkage disequilibrium)

Niti jedan lokus u populaciji dobrih dupina iz Hrvatske ne pokazuje znatnu vezanost niti s jednim drugim lokusom, odn. nije uočena neravnoteža vezanosti gena među 12 istraženih lokusa. Nijedna P-vrijednost nakon sekvencijalnog Bonferroni ispravka nije $P < 0.05$ (Tablica 7), što znači da se nul-hipoteza (genotipovi na jednom lokusu nisu ovisni o genotipovima na drugom lokusu) ne odbacuje.

Tablica 4. Genotipovi dobrih dupina. U stupcima su navedeni mikrosatelitski lokusi, u redovima uzorci dupina. Odvojeni su u dvije grupe genotipovi uzoraka iz hrvatskog dijela Jadranskog mora i iz Izraela (izraelski su označeni sivom pozadinom).

	EV 1	D 18	TV 3	D 14	D 8	TV 5	EV 94	TV 7	EV 14	EV 37	D 28	D 22
hrvatski												
10	133 133	68 82	223 225	125 127	109 111	211 215	251 251	158 164	160 160	235 245	139 139	114 114
20	133 145	90 90	223 225	119 129	103 105	213 213	235 237	158 158	150 150	197 237	139 143	126 126
22	133 145	82 82	223 223	129 133	105 109	213 213	235 251	154 158	152 164	203 231	137 143	114 126
23	133 141	70 90	225 225	125 125	109 111	213 213	235 257	158 158	158 160	201 219	129 137	114 126
25	133 133	88 90	223 233	127 129	103 107	203 203	237 251	158 158	150 160	237 243	137 137	126 126
28		82 90			103 103		237 237	158 164		227 227	129 137	126 126
32	133 135	90 90	225 231	129 129	105 105	213 213	235 237	154 158	160 160	215 241	143 143	114 126
38	133 133	82 90	223 233	127 127	105 107	201 213	237 237	158 158	150 160	187 201	137 137	114 126
39	133 133	82 88	223 233	125 125	109 109	203 215	235 251	154 158	152 160	227 241	129 145	114 114
40	133 133	90 92		127 129	105 109	207 213	251 251	158 164		227 237	137 137	126 126
41	143 143	82 92	227 229	125 127	103 109	211 211	237 257	158 158	158 158	187 235	137 143	114 126
46	133 133	68 82	225 225	119 129	103 103	213 215	243 251	158 158	150 160	203 239	139 143	126 126
51		76 86			103 109		235 237	158 158		201 239	129 129	114 126
54	133 145	90 92	223 231	129 131	109 109	213 215	237 251	154 158	150 152	201 203	125 139	126 132
55	133 133	90 90	225 227	125 129	105 109	211 213	237 253	154 158	150 150	227 227	137 137	114 128
56	133 133	82 90			103 107		235 251	158 158	160 160	187 237	137 137	126 126
57	133 133	78 86			107 107	201 211	235 251	158 158		203 237	137 137	114 126
62	133 133	68 82		119 127	109 111	213 213	237 257	154 154	152 160	197 203	129 129	126 128
64	145 145	76 90	225 227	129 129	105 105	213 213	235 237	158 158	150 152	203 237	129 135	114 126
76		82 90	225 233	119 125	105 109	213 213	241 243	158 158	160 160	203 235	137 137	126 126
80	133 133	82 82	223 223	129 129	103 103	213 213	237 243	158 158	150 152	201 239	137 143	114 124
87	133 143	68 90	237 237	119 125	103 111	203 203	235 235	158 158	152 160	245 245	129 129	122 126
91	133 139	86 90	223 231	129 129	107 111	211 213	237 251	158 158	150 164	197 227	129 129	114 126
92	133 133	82 90	227 229	125 129	109 109	215 215	235 235	158 164	150 160	237 241	137 139	114 120
93	133 133	82 82	229 233	131 131	103 103	211 213	251 251	154 158	150 152	203 205	129 143	124 126
95	133 137	68 76	223 231	127 129	105 107	213 215	235 251	158 158	158 158	215 227	139 139	114 126
99	133 145	70 90	225 231	129 129	103 107	213 215	243 251	158 158	152 160	201 227	135 135	114 122
101	133 133	82 86		125 127	109 109		237 237	158 158	148 150	203 227	135 137	126 126
102	133 133	82 90	223 227	119 129	103 111	213 213	239 239	158 158	150 160	201 203	129 143	114 126
103	133 133	82 90	225 231	119 125	107 109	203 213	235 235	158 158	150 164	201 201	137 137	114 126
izraelski												
A502	135 137	68 82	231 231	129 129	107 109	213 213	237 237	154 158	154 160	213 231	137 137	114 114
DO 98	133 133	82 90	225 229	125 125	101 111	213 215	251 251	154 158	162 162	203 239	127 127	126 126
Mi01a	143 143	76 82	225 231	125 125	109 109	213 215	237 251	158 158	162 162	205 215	127 137	126 126
Mi01b	133 133	76 82	229 231	125 125	101 109	213 213	251 251	158 158	162 162	203 215	127 127	126 132
PA 98	133 133	82 82	231 231	133 133	111 111	213 213	251 251	154 154	160 160	203 241	127 139	126 126

Tablica 5. Za svaki lokus prikazani su broj alela, te frekvencije svakog alela u populaciji dobrih dupina u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Sivom pozadinom prikazani su aleli koji nisu nađeni u hrvatskoj populaciji, ali su nađeni u uzorcima iz Izraela.

Lokus	Broj alela	Veličina alela (pb)	Frekvencija alela
EV1	7	133	0.7593
		135	0.0185
		137	0.0185
		139	0.0185
		141	0.0185
		143	0.0556
		145	0.1111
D18	9	68	0.0833
		70	0.0333
		76	0.0500
		78	0.0167
		82	0.3167
		86	0.0667
		88	0.0333
		90	0.3500
TV3	7	223	0.2826
		225	0.2609
		227	0.1087
		229	0.0652
		231	0.1304
		233	0.1087
D14	6	119	0.1346
		125	0.2308
		127	0.1731
		129	0.3846
		131	0.0577
D08	5	101	0
		103	0.2667
		105	0.1833
		107	0.1500
		109	0.3000
TV5	6	201	0.0385
		203	0.1154
		207	0.0192
		211	0.1346
		213	0.5385
		215	0.1538

Lokus	Broj alela	Veličina alela (pb)	Frekvencija alela
EV94	8	235	0.2667
		237	0.2833
		239	0.0333
		241	0.0167
		243	0.0667
		251	0.2667
		253	0.0167
		257	0.0500
		TV7	3
158	0.8000		
164	0.0667		
EV14	6	148	0.0192
		150	0.3077
		152	0.1731
		154	0
		158	0.0962
		160	0.3462
		162	0
EV37	15	164	0.0577
		187	0.0500
		197	0.0500
		201	0.1500
		203	0.1667
D28	7	205	0.0167
		213	0
		215	0.0333
		219	0.0167
		227	0.1667
		231	0.0167
		235	0.0500
		237	0.1167
		239	0.0500
		241	0.0500
		243	0.0167
245	0.0500		
D22	7	125	0.0167
		127	0
		129	0.2333
		135	0.0667
		137	0.3833
		139	0.1333
		143	0.1500
		145	0.0167
		114	0.3333
120	0.0167		
122	0.0333		
124	0.0333		
126	0.5333		
128	0.0333		
132	0.0167		

Tablica 6. Broj alela po lokusu, uočena heterozigotnost, genska raznolikost, koeficijent križanja u srodstvu i P-vrijednosti testiranja Hardy-Weinbergove ravnoteže u populaciji dobrog dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora

Lokus	n	N _a	H _O	H _E [*]	H _E	f	P _{HWE}
EV1	27	7	0,333	0,398	0,414	0,199	0,363
D18	30	9	0,800	0,746	0,771	-0,038	0,803
TV3	23	7	0,783	0,787	0,823	0,050	0,154
D14	26	6	0,654	0,731	0,762	0,144	0,408
D08	30	5	0,633	0,757	0,786	0,197	0,249
TV5	26	6	0,500	0,637	0,666	0,253	0,163
EV94	30	8	0,667	0,754	0,782	0,150	0,178
TV7	30	3	0,333	0,332	0,344	0,030	0,525
EV14	26	6	0,692	0,727	0,757	0,087	0,109
EV37	30	15	0,867	0,876	0,906	0,044	0,686
D28	30	7	0,467	0,736	0,766	0,395	0,002
D22	30	7	0,667	0,591	0,611	-0,093	0,915
srednja vrijednost		7,167	0,616	0,673	0,699	0,120	

n – broj uspješno genotipiziranih jedinki

N_a – broj alela

H_O – uočena heterozigotnost

H_E^{*} – genetički diverzitet (očekivana heterozigotnost), dobiven u programu PowerMarker

H_E – očekivana heterozigotnost (Nei, 1978), dobivena u programu Genetix

f – koeficijent križanja u bliskom srodstvu procjenjen korištenjem metode momenta

P_{HWE} – vjerojatnost podataka ako se podrazumijeva nul-hipoteza (HWE). Crveno je označena vrijednost P koja je značajna (P<0,05)

Tablica 7. Genotipska neravnoteža vezanosti gena između svih parova lokusa. P_{Markov} – P-vrijednosti dobivena metodom Markovljevih lanaca, P_{SEQBON} – korigirana P-vrijednost dobivena sekvencijalnim Bonferroni ispravkom

Broj usporedbe	Lokus1	Lokus2	P _{Markov}	P _{SEQBON}
1	D14	D22	0.434	1.000
2	D14	D28	0.210	1.000
3	D14	D8	0.856	1.000
4	D14	EV14	0.622	1.000
5	D14	EV37	1.000	1.000
6	D14	EV94	0.385	1.000
7	D14	TV5	0.441	1.000
8	D14	TV7	0.077	1.000
9	D18	D14	0.810	1.000
10	D18	D22	0.712	1.000
11	D18	D28	0.103	1.000
12	D18	D8	0.604	1.000

13	D18	EV14	0.019	1.000
14	D18	EV37	1.000	1.000
15	D18	EV94	0.344	1.000
16	D18	TV3	0.678	1.000
17	D18	TV5	0.516	1.000
18	D18	TV7	0.570	1.000
19	D28	D22	0.134	1.000
20	D8	D22	0.439	1.000
21	D8	D28	0.260	1.000
22	D8	EV14	0.894	1.000
23	D8	EV37	1.000	1.000
24	D8	EV94	0.894	1.000
25	D8	TV5	0.461	1.000
26	D8	TV7	0.946	1.000
27	EV1	D14	0.966	1.000
28	EV1	D18	0.025	1.000
29	EV1	D22	0.944	1.000
30	EV1	D28	0.032	1.000
31	EV1	D8	0.264	1.000
32	EV1	EV14	0.128	1.000
33	EV1	EV37	1.000	1.000
34	EV1	EV94	0.680	1.000
35	EV1	TV3	0.827	1.000
36	EV1	TV5	0.979	1.000
37	EV1	TV7	0.958	1.000
38	EV14	D22	0.583	1.000
39	EV14	D28	0.328	1.000
40	EV14	EV37	1.000	1.000
41	EV37	D22	0.649	1.000
42	EV37	D28	1.000	1.000
43	EV94	D22	0.461	1.000
44	EV94	D28	0.965	1.000
45	EV94	EV14	1.000	1.000
46	EV94	EV37	1.000	1.000
47	EV94	TV7	0.614	1.000
48	TV3	D14	0.679	1.000
49	TV3	D22	0.900	1.000
50	TV3	D28	0.217	1.000
51	TV3	D8	1.000	1.000
52	TV3	EV14	0.770	1.000
53	TV3	EV37	1.000	1.000
54	TV3	EV94	0.564	1.000
55	TV3	TV5	0.657	1.000
56	TV3	TV7	0.989	1.000
57	TV5	D22	0.412	1.000
58	TV5	D28	0.994	1.000
59	TV5	EV14	0.985	1.000
60	TV5	EV37	1.000	1.000
61	TV5	EV94	0.314	1.000
62	TV5	TV7	0.330	1.000
63	TV7	D22	0.005	0.362
64	TV7	D28	0.450	1.000
65	TV7	EV14	0.860	1.000
66	TV7	EV37	0.623	1.000

4.1.1.4. Procjena „uskog grla“ (engl. bottleneck)

Postoje značajna odstupanja od ravnoteže između mutacija i genetičkog drifta za nekolicinu lokusa (Tablica 8), koja ukazuju na postojanje manjka heterozigota, kao u slučaju lokusa EV1 ili na postojanje viška heterozigota, kao u slučaju lokusa D8 ($P < 0,05$). Unatoč tome, u dvosmjernom Wilcoxon testu sume rangova $P > 0,05$ pod pretpostavkom sva četiri mutacijska modela, odn. hrvatska populacija dobrih dupina ne pokazaje značajan višak heterozigota po svim lokusima, niti po jednom mutacijskom modelu (Tablica 9). To znači da Bottleneck program niti po jednom mutacijskom modelu nije našao dokaze koji bi upućivali da je hrvatska populacija dobrih dupina nedavno prošla kroz „usko grlo“.

4.1.1.5. Udaljenost između jedinki

Genetičku udaljenost između jedinki, dobivenu temeljem udjela zajedničkih alela, prikazala sam na Slici 9. Postoji vrlo mala podudarnost između topologije stabla i geografskog porijekla jedinki. Tri (DO98, Mi01a i Mi01b) od pet izraelskih uzoraka se grupira zajedno i petero uzoraka iz sjevernog Jadrana (25, 38, 56, 57 i 103) se također grupira zajedno. Dva para uzoraka (izraelski DO98 i Mi01b, te hrvatski 25 i 56) unutar para imaju bar po jedan zajednički alel na svim lokusima (Tablica 4).

4.1.1.6. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

Rezultate analize molekularne varijance prikazala sam u Tablici 10. Kod usporedbe hrvatske i izraelske populacije dobrih dupina 89% varijabilnosti pripisuje se razlikama unutar populacija, a čak 11 % opada na različitosti između te dvije populacije. Fiksacijski indeks iznosi 0,11 i statistički je značajan. Ako usporedimo hrvatske uzorke dobrih dupina podijeljene u tri skupine, tada se može uočiti da između skupina sjevernog i srednjeg Jadrana postoji veća različitost unutar svake skupina (101,47%) od različitosti između skupina (-1.47%). Slični se rezultati dobiju usporedbom skupina srednjeg Jadrana i južnog Jadrana. Međutim, usporedbom skupina sjeverni Jadran i južni Jadran ipak se pojavljuje mali udio različitost od 5,6% između skupina, a fiksacijski indeks iznosi 0,056.

Tablica 8. Vjerojatnosti da su lokusi u ravnoteži između mutacije i genetičkog drifta. Uočeni genetički diverzitet (H_E) se uspoređuje s genetičkim diverzitetom očekivanim pod pretpostavkom ravnoteže između mutacija i genetičkog drifta (H_{EQ}), a koji se dobije iz uočenog broja alela pod pretpostavkom četiri mutacijska modela mikrosatelita: IAM (model bezgraničnih alela), TPM-70 (dvofazni model s 70% mutacija korak po korak i 30% višestrukih mutacija), TPM-95 (dvofazni model s 95% mutacija korak po korak i 5% višestrukih mutacija), te SMM (model korak po korak). Crveno su označene vrijednosti $p < 0,05$

Locus	n	N_a	H_E	IAM		TPM-70		TPM-95		SMM	
				H_{EQ}	p	H_{EQ}	p	H_{EQ}	p	H_{EQ}	p
EV1	54	7	0.414	0.679	0.033	0.737	0.006	0.773	0.001	0.784	0.000
D18	60	9	0.771	0.741	0.447	0.801	0.221	0.826	0.098	0.836	0.046
TV3	46	7	0.823	0.696	0.040	0.744	0.105	0.781	0.217	0.789	0.264
D14	52	6	0.762	0.625	0.108	0.692	0.238	0.733	0.425	0.741	0.458
D8	60	5	0.786	0.560	0.004	0.619	0.017	0.666	0.027	0.684	0.034
TV5	52	6	0.666	0.624	0.472	0.688	0.338	0.734	0.135	0.745	0.100
EV94	60	8	0.782	0.707	0.259	0.766	0.484	0.802	0.266	0.813	0.183
TV7	60	3	0.344	0.360	0.459	0.405	0.358	0.463	0.213	0.475	0.169
EV14	52	6	0.757	0.628	0.145	0.685	0.227	0.734	0.447	0.744	0.514
EV37	60	15	0.906	0.863	0.114	0.896	0.414	0.907	0.412	0.912	0.299
D28	60	7	0.766	0.671	0.193	0.733	0.420	0.769	0.395	0.783	0.299
D22	60	7	0.611	0.659	0.272	0.732	0.072	0.769	0.016	0.781	0.008

n – broj jedinki koji je uspješno izgenotipiziran

N_a – broj alela

H_E – uočen genetički diverzitet

H_{EQ} – genetički diverzitet očekivan pod pretpostavkom ravnoteže između mutacija i genetičkog drifta

Tablica 9. Rezultati Wilcoxon testa sume rangova provedenog da se utvrdi da li u populaciji postoji značajan broj lokusa koji imaju višak heterozigota, pod pretpostavkom četiri mutacijska modela

Vjerojatnosti	IAM	TPM-70	TPM-95	SMM
p_d	0.961	0.689	0.102	0.039
p_e	0.046	0.339	0.912	0.968
p_{de}	0.092	0.677	0.204	0.077

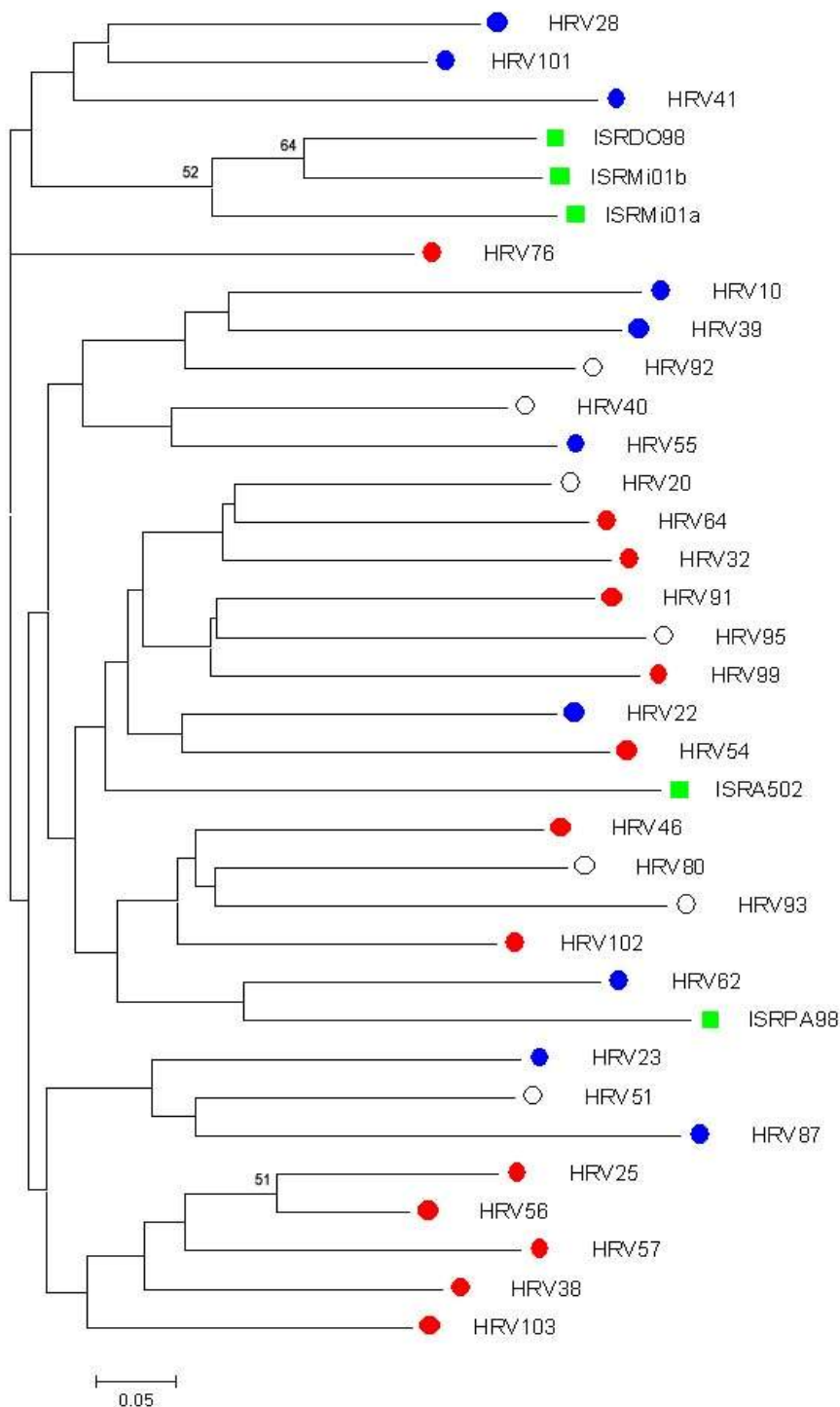
p_d – vjerojatnost dobivena testiranjem manjka heterozigota jednosmjernim testom (ukazuje na širenje populacije)

p_e – vjerojatnost dobivena testiranjem viška heterozigota jednosmjernim testom (ukazuje da je populacija prošla kroz „usko grlo“)

p_{de} – vjerojatnost dobivena testiranjem viška i manjka heterozigota dvosmjernim testom

Tablica 10. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) prikazuju razdiobu genetičke (mikrosatelitne) varijacije između i unutar grupa dobrih dupina. Značajne p-vrijednosti označene su crvenom bojom

Razdioba	Izvor varijacije	Stupnjevi slobode	% ukupne varijance	F_{ST}	$p(F_{ST})$
Hrvatska - Izrael	između grupa	1	10.97	0.110	< 0.001
	unutar grupa	33	89.03		
sjeverni Jadran – srednji Jadran	između grupa	1	-1.47	-0.015	0.728
	unutar grupa	18	101.47		
srednji Jadran – južni Jadran	između grupa	1	-0.24	-0.002	0.511
	unutar grupa	15	100.24		
sjeverni Jadran – južni Jadran	između grupa	1	5.61	0.056	0.002
	unutar grupa	21	94.39		



Slika 9. Neukorijenjeno NJ („neighbour-joining“) stablo izračunato programom PHYLIP korištenjem genetičkih udaljenosti između jedinki na temelju udjela zajedničkih alela ($1-P_{SA}$) mikrosatelitskih multilokusnih genotipova. Navedene su samo „bootstrap“ vrijednosti veće od 50. Zelenim kvadratom označeni su uzorci dobrih dupina iz Izraela, crvenim krugom uzorci dobrih dupina iz sjevernog Jadrana, bijelim krugom iz srednjeg Jadrana, a plavim iz južnog Jadrana.

4.1.2. Ostale vrste kitova uključene u istraživanje

4.1.2.1. Umnažanje odabranih mikrosatelitskih lokusa u drugim vrstama reda kitova (engl. cross-species amplification)

Genotipove ostalih vrsta reda kitova koje sam istraživala prikazala sam u Tablici 11.

U ostalih vrsta porodice šiljatozubih dupina (*Delphinidae*) koje sam istraživala, a to su plavobijeli dupin i glavati dupin, svi lokusi koji su se uspješno umnožili bili su polimorfni.

U vrsti plavobijeli dupin umnaža se svih 12 lokusa. Distribucija alela se u svakom lokusu preklapa s distribucijom alela u vrste dobri dupin, a u svim lokusima se javljaju i aleli koji nisu uočeni u vrste dobri dupin. Zanimljivo je istaknuti lokuse TV3, D14 i D8 u kojima sam našla veći broj alela u vrsti plavobijeli dupin nego u vrsti dobri dupin, makar je broj uzoraka u kojima je uspjela genotipizacija tih lokusa bio od 28 do 35 za vrstu dobri dupin, a samo devet do 10 za vrstu plavobijeli dupin (Tablica 12).

U vrsti glavati dupin umnažaju se svi lokusi, osim lokusa TV5. Distribucije alela se preklapaju za većinu lokusa sa alelskim distribucijama vrste dobri dupin i/ili s alelskim distribucijama vrste plavobijeli dupin. Iznimka tome je lokus EV94, gdje se alelske distribucije u vrstama dobri i plavobijeli dupin protežu od alela 219 do 257, a u vrste glavati dupin od alela 275 do 285 i lokus TV7 gdje se alelska distribucija u vrste glavati dupin proteže od alela 148 do 150, u vrstama dobri i plavobijeli dupin od alela 154 do 164 (Tablica 12).

U vrste krupnozubi dupin genotipizirala sam samo jedan uzorak, a uspješno sam umnožila samo pet lokusa: TV7, EV14, EV37, D28, D22. Od njih pet, samo je jedan (EV14) u heterozigotnom stanju, a za ostala četiri lokusa ova jedinka je homozigot (Tablica 11).

U vrste veliki sjeverni kit istražila sam dva dostupna uzorka. Umnažanje je uspjelo u devet lokusa, od toga je sedam lokusa (EV1, D8, TV5, EV94, TV7, EV37 i D22) polimorfno, a za lokuse D18 i EV14 to nemogu utvrditi, jer su se uspješno umnožili samo u jedne životinje; dotična jedinka je homozigot ili za D18 ili za EV14 lokuse (Tablica 11).

Tablica 11. Genotipovi uzoraka plavobijelih, glavatih i krupnozubog dupina, te velikih sjevernih kitova. Na mjestima neuspješno umnoženih alela nalaze se prazna mjesta

	EV 1	D 18	TV 3	D 14	D 8	TV 5	EV 94	TV 7	EV 14	EV 37	D 28	D 22
plavobijeli dupin												
27	133 139	84 88	205 221	127 135	91 113	205 205	245 249	156 156	152 156	209 209	147 153	116 116
34	133 147	72 74	233 237	123 127	89 103	203 203	219 245	156 156	152 154	209 213	131 147	112 120
53	133 145	72 86	231 235	115 135	89 101	199 199	245 247	156 156	150 152	199 209	145 153	116 120
71	145 145	72 72	221 221	123 127	91 111		245 249	154 160	152 154	195 199	145 151	116 116
73	133 145	72 74	215 221	129 135	93 119	199 199	245 247	156 156		209 209	143 143	116 122
74	133 145	86 86	213 239	133 135	111 113	211 211	245 257	156 160	148 154	209 209	137 141	120 120
78	145 151	72 72	221 241	127 135	90 115		243 253	156 158	152 154	209 209	143 147	116 120
79	133 141	72 86			115 115	189 189	245 245	156 156	152 156	209 209	143 147	
81	145 145	86 86	243 245	131 135	91 115		247 257	156 158	150 152	209 209	141 147	116 116
89	145 145	86 86	213 221	139 139	117 121		243 257	156 156	152 152	209 209	141 143	116 116
glavati dupin												
67		82 84	215 219	127 133	117 117		275 279	148 148	154 166	193 193	141 147	132 132
68	137 137	84 104	219 219	135 137	109 109		277 285	148 148	154 154	185 187	139 139	130 130
69	159 159	86 88	219 219	135 135	111 111		277 283	148 150	154 154	181 187	139 141	130 130
70	137 137	80 106	215 215	129 135	117 117		275 281	148 150	154 166	187 187	139 139	130 132
84	137 137	80 86	215 215	135 135	117 117		277 285	148 148	162 162	187 187	145 147	130 132
krupnozubi dupin												
58								154 154	147 149	191 191	141 141	110 110
veliki sjeverni kit												
50	155 159	72 72			94 110	185 187	227 237	168 176		189 197		132 134
98	155 159				108 110	189 189	233 241	166 172	150 150	189 197		132 134

Tablica 12. Usporedba distribucija alela i alelnih frekvencija 12 istraživanih mikrosatelitskih lokusa između tri vrste porodice šiljatozubih dupina (Delphinidae): dobri dupin (ružičasta pozadina), plavobijeli dupin (zelena pozadina) i glavati dupin (plava pozadina)

aleli	dobri	plavobijeli	glavati
Lokus EV1			
n	32	10	4
N _a	7	6	2
133	0.7344	0.3000	
135	0.0313		
137	0.0313		0.7500
139	0.0156	0.0500	
141	0.0156	0.0500	
143	0.0781		
145	0.0938	0.5000	
147		0.0500	
151		0.0500	
159			0.2500
Lokus D18			
n	35	10	5
N _a	9	5	7
68	0.0857		
70	0.0286		
72		0.4000	
74		0.1000	
76	0.0714		
78	0.0143		
80			0.2000
82	0.3571		0.1000
84		0.0500	0.2000
86	0.0571	0.4000	0.2000
88	0.0286	0.0500	0.1000
90	0.3143		
92	0.0429		
104			0.1000
106			0.1000
Lokus TV3			
n	28	9	5
N _a	7	12	2
205		0.0556	
213		0.1111	
215		0.0556	0.5000
219			0.5000
221		0.3333	
223	0.2321		
225	0.2500		
227	0.0893		
229	0.0893		
231	0.2143	0.0556	
233	0.0893	0.0556	
235		0.0556	
237	0.0357	0.0556	
239		0.0556	
241		0.0556	
243		0.0556	
245		0.0556	
Lokus D14			
n	31	9	5
N _a	6	8	5
115		0.0556	
119	0.1129		
123		0.1111	
125	0.2903		
127	0.1452	0.2222	0.1000
129	0.3548	0.0556	0.1000
131	0.0484	0.0556	
133	0.0484	0.0556	0.1000
135		0.3333	0.6000
137			0.1000
139		0.1111	

aleli dobri plavobijeli glavati

Lokus D8			
n	35	10	5
N _a	6	12	3
89		0.1000	
90		0.0500	
91		0.1500	
93		0.0500	
101	0.0286	0.0500	
103	0.2286	0.0500	
105	0.1571		
107	0.1429		
109	0.3143		0.2000
111	0.1286	0.1000	0.2000
113		0.1000	
115		0.2000	
117		0.0500	0.6000
119		0.0500	
121		0.0500	

Lokus TV5			
n	31	6	0
N _a	6	5	0
189		0.1667	
199		0.3333	
201	0.0323		
203	0.0968	0.1667	
205		0.1667	
207	0.0161		
211	0.1129	0.1667	
213	0.5806		
215	0.1613		

aleli dobri plavobijeli glavati

Lokus EV94			
n	35	10	5
N _a	8	7	6
219		0.0500	
235	0.2286		
237	0.2857		
239	0.0286		
241	0.0143		
243	0.0571	0.1000	
245		0.4000	
247		0.1500	
249		0.1000	
251	0.3286		
253	0.0143	0.0500	
257	0.0429	0.1500	
275			0.2000
277			0.3000
279			0.1000
281			0.1000
283			0.1000
285			0.2000

Lokus TV7			
n	35	10	5
N _a	3	4	2
148			0.8000
150			0.2000
154	0.1714	0.0500	
156		0.7500	
158	0.7714	0.1000	
160		0.1000	
164	0.0571		

aleli dobri plavobijeli glavati

Lokus EV14

n	31	9	5
N _a	8	5	3
148	0.0161	0.0556	
150	0.2581	0.1111	
152	0.1452	0.5000	
154	0.0161	0.2222	0.6000
156		0.1111	
158	0.0806		
160	0.3387		
162	0.0968		0.2000
164	0.0484		
166			0.2000

Lokus EV37

n	35	10	5
N _a	16	4	4
181			0.1000
185			0.1000
187	0.0429		0.6000
193			0.2000
195		0.0500	
197	0.0429		
199		0.1000	
201	0.1286		
203	0.1857		
205	0.0286		
209		0.8000	
213	0.0143	0.0500	
215	0.0571		
219	0.0143		
227	0.1429		
231	0.0286		
235	0.0429		
237	0.1000		
239	0.0571		
241	0.0571		
243	0.0143		
245	0.0429		

aleli dobri plavobijeli glavati

Lokus D28

n	35	10	5
N _a	8	8	4
125	0.0143		
127	0.0857		
129	0.2000		
131		0.0500	
135	0.0571		
137	0.3714	0.0500	
139	0.1286		0.5000
141		0.1500	0.2000
143	0.1286	0.2500	
145	0.0143	0.1000	0.1000
147		0.2500	0.2000
151		0.0500	
153		0.1000	

Lokus D22

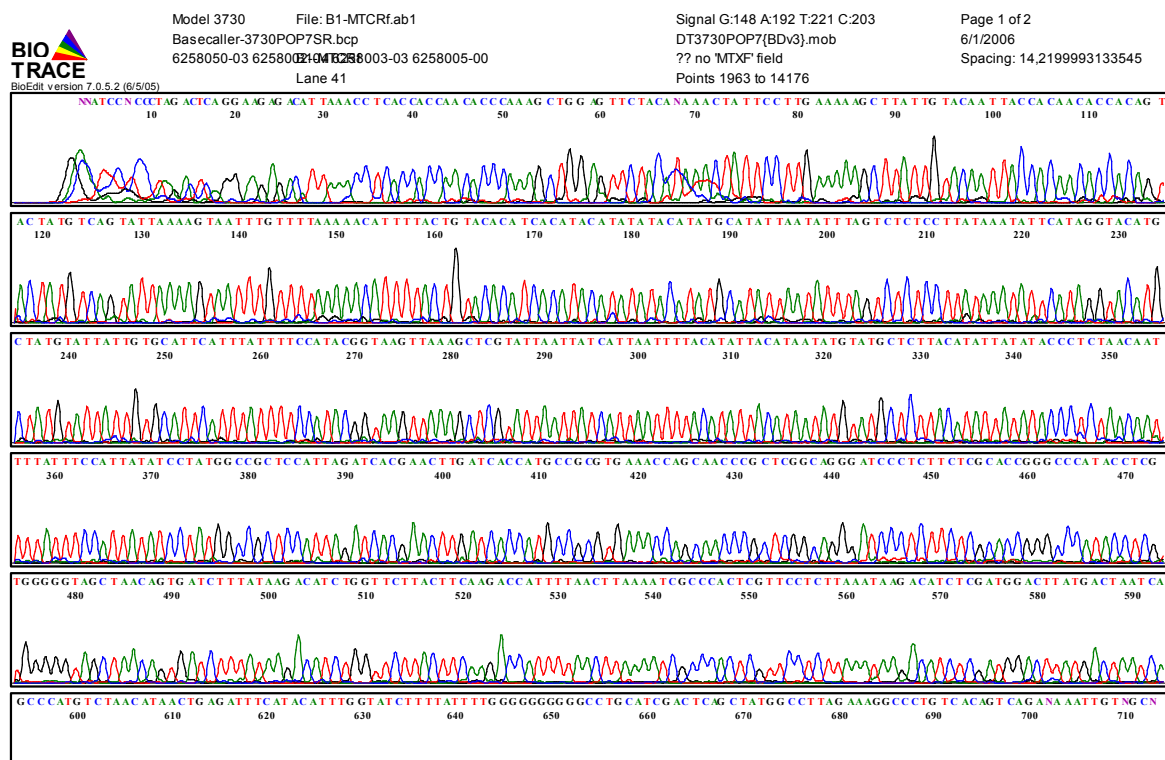
n	35	9	5
N _a	7	4	2
112		0.0556	
114	0.3143		
116		0.6111	
120	0.0143	0.2778	
122	0.0286	0.0556	
124	0.0286		
126	0.5571		
128	0.0286		
130			0.6000
132	0.0286		0.4000

n – broj jedinki koji je uspješno izgenotipiziran
 N_a – broj alela

4.2. Sljedovi kontrolne regije mitohondrijske DNA

4.2.1. Uspješnost sekvenciranja kontrolne regije mitohondrijske DNA

Korištenjem početnice MTCRf za reakciju sekvenciranja dijela kontrolne regije mtDNA dobivala sam sljedove duljine oko 600-700 pb. Za daljnju analizu odabrala sam dio sljeda koji je bio jednoznačan i bliže 5' kraju, a bio je dug 470 pb u dobrim dupina, odnosno 468 pb u plavobijelih dupina, Primjer kromatograma prikazala sam na Slici 10.



Slika 10. Kromatogram uzorka B1 – dio slijeda kontrolne regije mtDNA dobiven reakcijom sekvenciranja korištenjem početnice MTCRf

Uspješnost sekvenciranja uzoraka dobrih dupina iznosila je 69 %, odn. uspješno sekvencirane sljedove dobila sam za 27 uzoraka dobrih dupina (25 hrvatska i dva izraelska) od ukupno 39 uzoraka (34 hrvatska i pet izraelskih). Od 12 plavobijelih dupina dobila sam sljedove za 10 uzoraka (uspješnost 83 %). Uzorke glavatih dupina nisam sekvencirala jer sam kod provjere PCR proizvoda ustanovila da se uz željeni PCR fragment kontrolne regije mtDNA pojavljuje i dodatni, nespecifični fragment DNA, u svim uzorcima glavatih dupina. Uzorak krupnozubog dupina sekvenciran je ranije (Gomerčić i sur. 2006). Od dva uzorka

velikog sjevernog kita, uspjelo je sekvenciranje samo jednoga, a dio koji je bio jednoznačan bio je duljine od 365 pb. U Tablici 2 u poglavlju Materijal i metode označene su slovom S jedinke za koje je uspjelo sekvenciranje.

4.2.2. Raznolikost sljedova dobrih dupina

U analiziranom dijelu kontrolne regije mtDNA dugačkom 470 pb, unutar 27 jedinki dobrog dupina našla sam 38 polimorfnih mjesta (8%), te utvrdila postojanje pet jedinstvenih haplotipova (Slika 11). Pripadnost jedinki pojedinom haplotipu prikazala sam u Tablici 13. Samo jedno polimorfno mjesto proizlazi iz insercije/delecije, koja se nalazi na prvom varijabilnom mjestu, odn. na 16. nukleotidnom mjestu. Svih ostalih 37 polimorfnih mjesta proizlaze iz baznih supstitucija, od kojih je 86,5 % tranzicija (5 transverzija i 32 tranzicije). Od pet haplotipova, četiri su nađena u jedinkama dobrih dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora. Jedna jedinka iz Izraela (D-PA98) dijeli haplotip D4 s hrvatskim jedinkama, dok druga jedinka (D-DO98) ima haplotip različit od svih ostalih (D5). Učestalosti haplotipova prikazala sam u Tablici 14, zajedno sa udaljenošću haplotipova koja se temelji na broju različitih nukleotida između parova haplotipova. Po broju različitih nukleotida najviše se razlikuju haplotipovi D2 i D3, te D3 i D4, gdje svaki par ima po 31 različit nukleotid, a najmanje se razlikuju haplotipovi D2 i D5, sa samo dva različita nukleotida. Indeksi genetičke raznolikosti izračunala sam unutar hrvatske populacije dobrih dupina (Tablica 15). Genska raznolikost iznosi 0,557; srednji broj razlika između parova sljedova 10,417; dok nukleotidna raznolikost iznosi 0,022.

Tablica 13. Pripadnost jedinki dobrog dupina pojedinom haplotipu

D1	22 23 32 38 39 41 46 51 55 57 80 91 93 101 102 108
D2	20 28 64 92 104
D3	87 95 B1 PA98
D4	111
D5	DO98

Tablica 14. Genetička udaljenost između parova haplotipova prikazana brojem različitih nukleotida između parova haplotipova u svih jedinki dobrog dupina (ispod dijagonale), sa standardnim devijacijama (iznad dijagonale), pripadajući broj jedinki, te učestalost pojedinog haplotipa

haplotip	D1	D2	D3	D4	D5	broj jedinki	učestalost
D1		3,42	5,22	3,13	3,42	16	0,593
D2	12		5,38	3,28	1,41	5	0,185
D3	29	31		5,38	5,22	4	0,148
D4	10	11	31		3,28	1	0,037
D5	12	2	29	11		1	0,037

Tablica 15. Indeksi genetičke raznolikosti procijenjeni za uzorke dobrih dupina i plavobijelih dupina nađenih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. U zagradi su navedene standardne devijacije

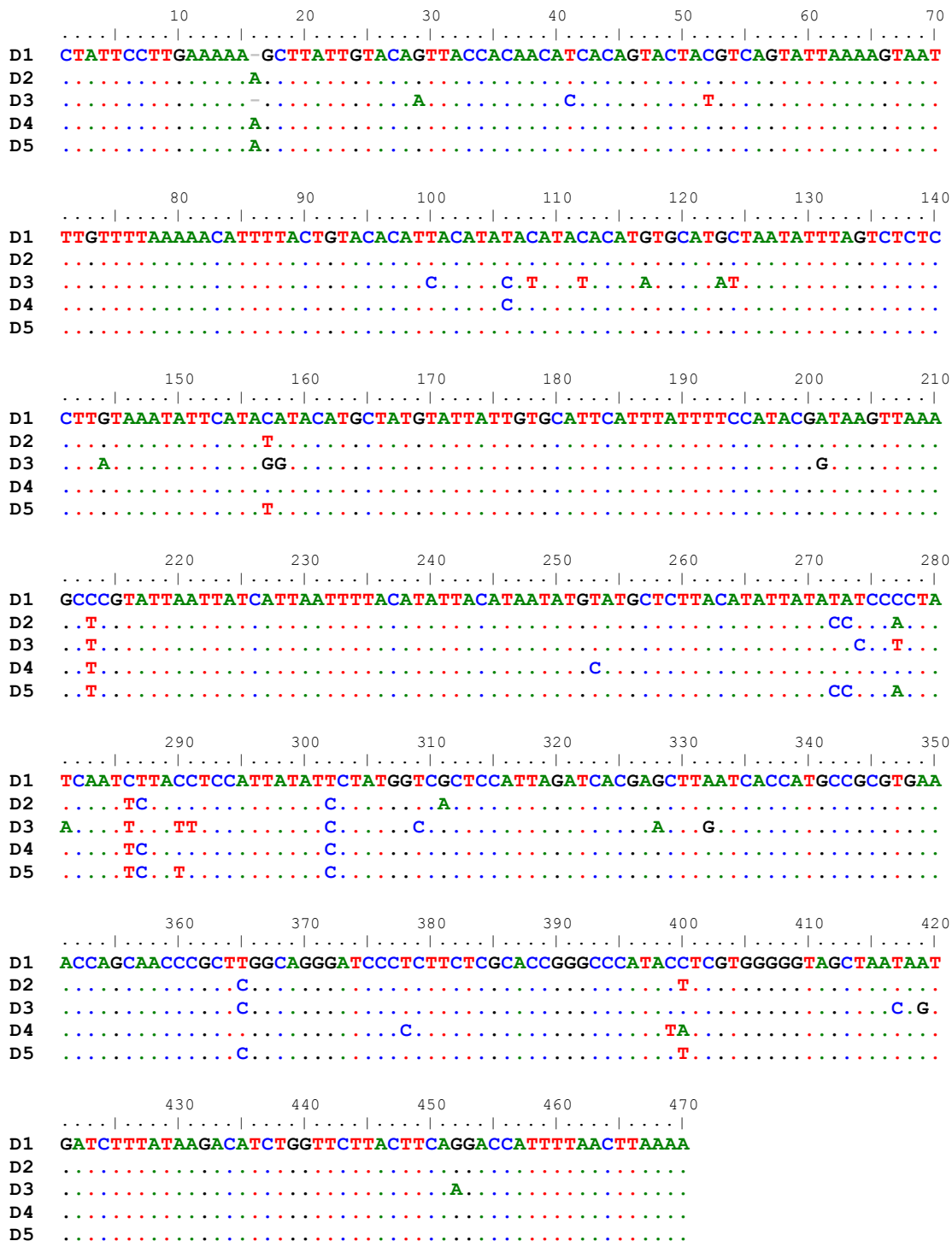
	n	H	π	Π
dobri d.	25	0,557 ($\pm 0,096$)	10,417 ($\pm 4,915$)	0,022 ($\pm 0,0117$)
plavobijeli d.	10	0,667 ($\pm 0,163$)	3,311 ($\pm 1,856$)	0,007 ($\pm 0,004$)

n – broj jedinki u kojih je dobiven istraživani slijed kontrolne regije mtDNA

H – genska raznolikost (haplotipska raznolikost)

π – srednji broj razlika između parova sljedova

Π - nukleotidna raznolikost



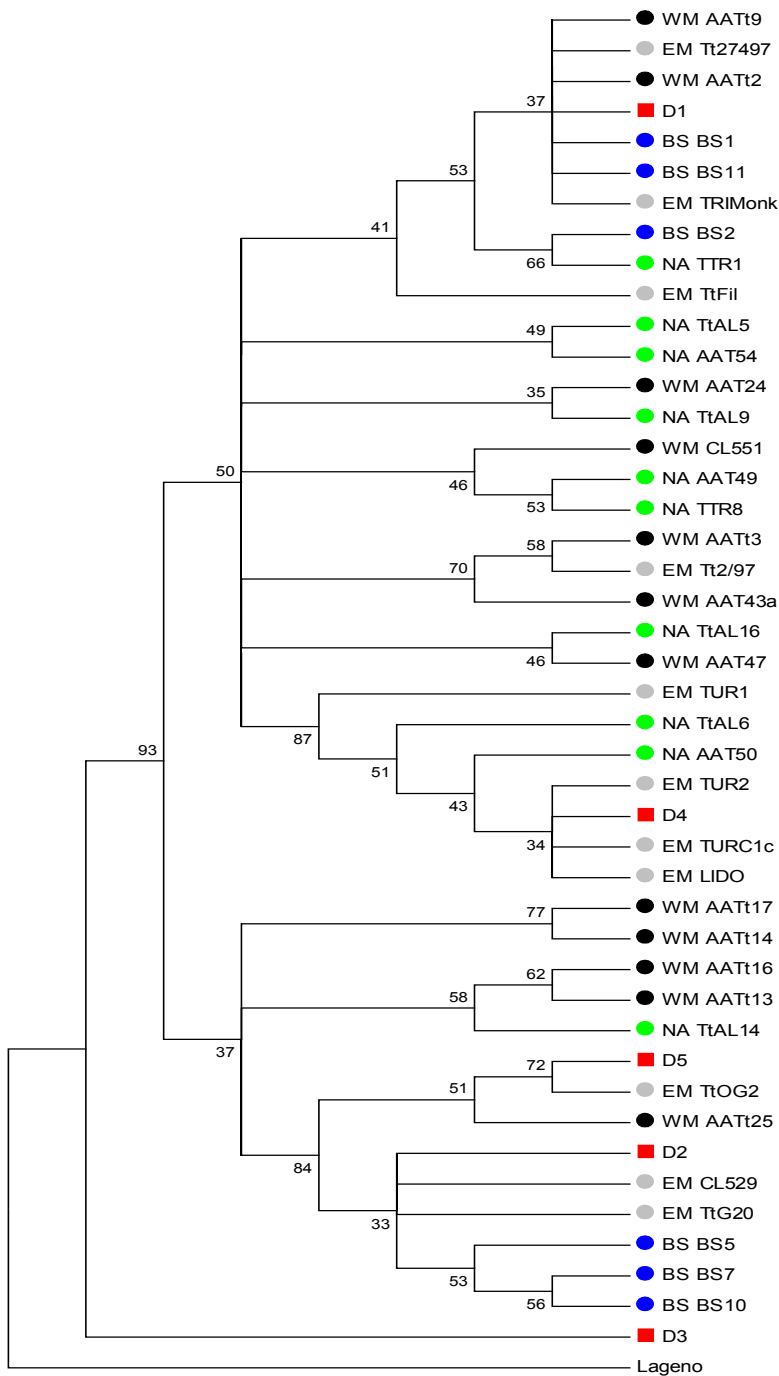
Slika 11. Slijed od 470 pb svih pet jedinstvenih haplotipova nađenih u 27 jedinki vrste dobri dupin. Za najučestaliji haplotip (haplotip D1) naveden je potpuni slijed, dok su u ostalim haplotipovima istaknute samo baze koje se razlikuju od baze u najučestalijem haplotipu (točke označuju baze identične bazama u haplotipu D1)

4.2.3. Usporedba dobivenih sljedova dobrih dupina sa sljedovima preuzetim iz GenBank baze podataka

Pretraživanjem računalne baze podataka NCBI utvrdila sam da postoji veliki broj sljedova kontrolne regije mtDNA dobrih dupina iz različitih svjetskih populacija, međutim nisu svi sljedovi odgovarali dijelu kontrolne regije koji je dobiven u ovom istraživanju. Stoga sam za daljnju usporedbu koristila samo one sljedove koji su po duljini odgovarali dijelu kontrolne regije mtDNA dugom 470 bp koji je bio korišten u ovom istraživanju, a to je bilo 39 sljedova iz područja Sredozemnog i Crnog mora, te istočnog dijela sjevernog Atlantskog oceana. Od pet haplotipova nađenih u ovom istraživanju pokazalo se da su četiri haplotipa već nađena i pohranjena u bazi GenBank, a jedini novi haplotip bio je D3. Podudarnost haplotipova nađenih u ovom istraživanju s onima iz baze GenBank prikazala sam u Tablici 16. Međutim ta podudarnost je upitna jer su objavljeni sljedovi dulji od naših sljedova, tako da se neka polimorfna mjesta nalaze izvan dijela od 470 pb. Slika 12 prikazuje genealoško stablo 36 haplotipova dobrih dupina, od kojih je pet haplotipova iz ovog istraživanja (D1 do D5), a ostalih 31 je preuzeto iz baze GenBank. Na stablu se može uočiti da gotovo uopće ne postoji podudarnost između topologije stabla i geografskog porijekla haplotipova, a haplotipovi iz ovog istraživanja nisu grupirani, već su nasumce raspoređeni među ostalim haplotipovima. Uz to, haplotip D3 potpuno se izdvaja od svih ostalih analiziranih haplotipova dobrih dupina.

Tablica 16. Podudarnost pronađenih haplotipova s haplotipovima pohranjenim u GenBank bazi podataka. U zagradama su navedeni pristupni brojevi (engl. accession numbers) iz Genbank baze. Prva dva slova iz naziva haplotipa iz GenBank baze predstavljaju područje iz kojeg potječe određeni haplotip (WM – zapadno Sredozemlje, EM – istočno Sredozemlje, BS – Crno More)

Pronađeni haplotip	Haplotipovi iz GenBank baze
D1	WM AATt2 (AY963611) EM Tt27497 (AY963599) BS BS1 (AY963588)
D2	EM CL529 (AY963603) EM TtG20 (AY963600)
D4	EM TUR2 (AY963597) EM LIDO (AY963602)
D5	EM TtOG2 (AY963594)



Slika 12. Kondenzirano stablo (kritična vrijednost za odvajanje je „bootstrap“ vrijednost od 30%) procijenjeno iz mtDNA haplotipova dobrih dupina (D1-D5 haplotipovi iz ovog istraživanja, NA – sjeverni Atlantski ocean, WM – zapadno Sredozemlje, EM – istočno Sredozemlje, BS – Crno more) dobiveno iz 1000 „bootstrap“ poduzorkovanja. „Lageno“ je haplotip vrste *Lagenorhynchus albirostris* koja služi kao uljez za ukorjenjivanje stabla.

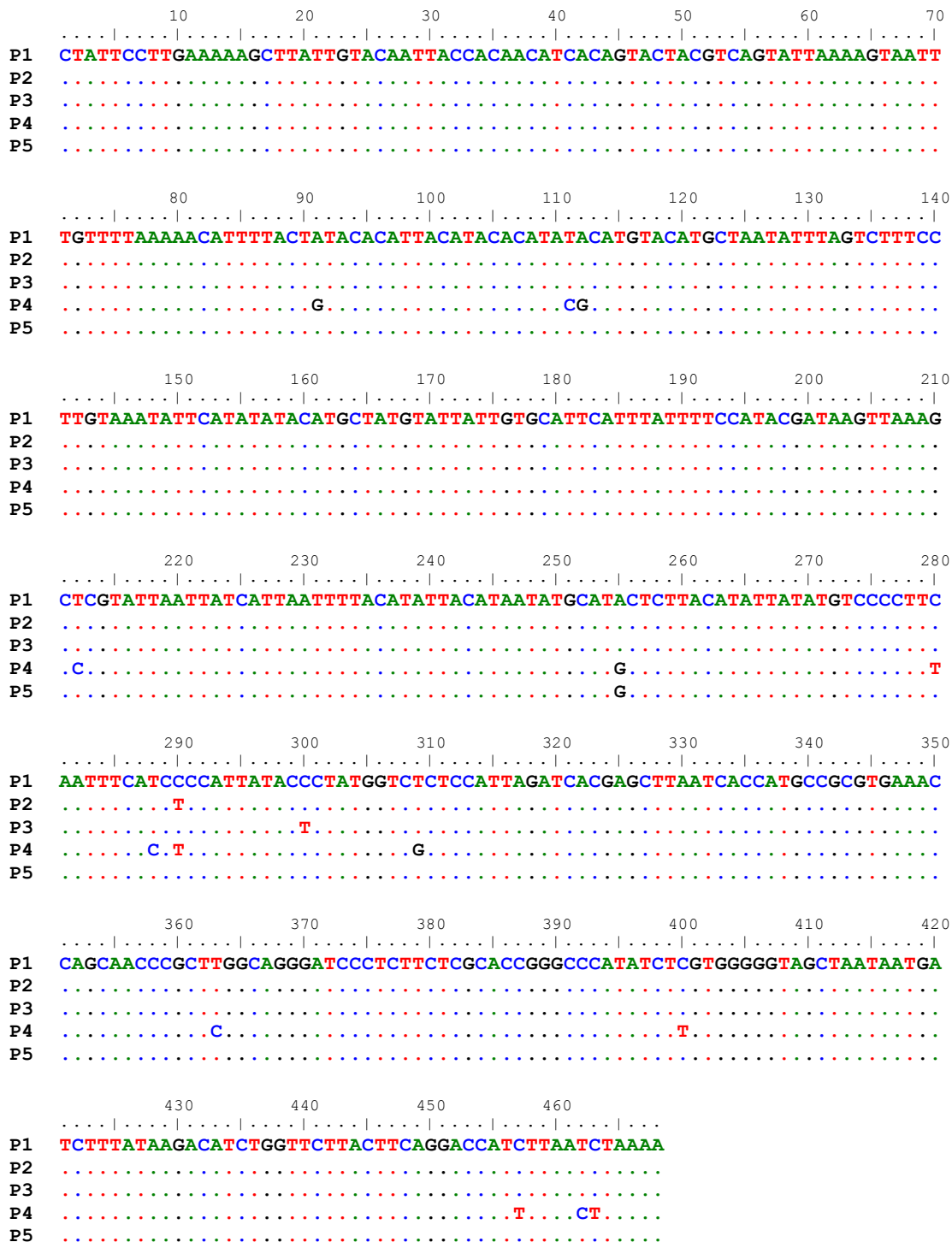
4.2.4. Raznolikost sljedova plavobijelih dupina

U analiziranom dijelu kontrolne regije mtDNA dugačkom 468 pb, unutar 10 jedinki plavobijelog dupina našla sam 15 polimorfnih mjesta (3,2%), te utvrdila postojanje pet jedinstvenih haplotipova (Slika 13). Pripadnost jedinki pojedinom haplotipu prikazala sam u Tablici 17. Sva polimorfna mjesta proizlaze iz baznih supstitucija, odn. nije uočeno postojanje insercija/delecija. Samo jedna supstitucija je transverzija, koja se nalazi na 309. nukleotidnom mjestu, što znači da su čak 93,3 % supstitucija tranzicije.

Učestalosti haplotipova prikazala sam u Tablici 18, zajedno sa udaljenošću haplotipova koja se temelji na broju različitih nukleotida između parova haplotipova. Najučestaliji haplotip je haplotip P1, nađen u šest jedinki, a ostala četiri haplotipa imaju jednaku učestalost, jer je svaki nađen u samo jednoj jedinki. Po broju različitih nukleotida najviše se razlikuju haplotipovi P3 i P4 sa 15 različitih nukleotida, a najmanje se razlikuju haplotipovi P1 i P2, P1 i P3, te P1 i P5, gdje svaki par ima samo po jedan različiti nukleotid. Haplotip P4, kojeg ima jedinka S-074 najrazličitiji od svih ostalih haplotipova, a razlikuje se od svakod drugog haplotipa u 13, 14 ili 15 nukleotida, dok se svi ostali parovi haplotipova razlikuju u samo jednom ili dva nukleotida. Indeksi genetičke raznolikosti unutar jedinki plavobijelih dupina nađenih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora prikazala sam u Tablici 15. Genska raznolikost iznosi 0,667; srednji broj razlika između parova sljedova 3,311; dok nukleotidna raznolikost iznosi svega 0,007.

Tablica 17. Pripadnost jedinki plavobijelog dupina pojedinom haplotipu

P1	27 34 71 79 89 115
P2	53
P3	73
P4	74
P5	121



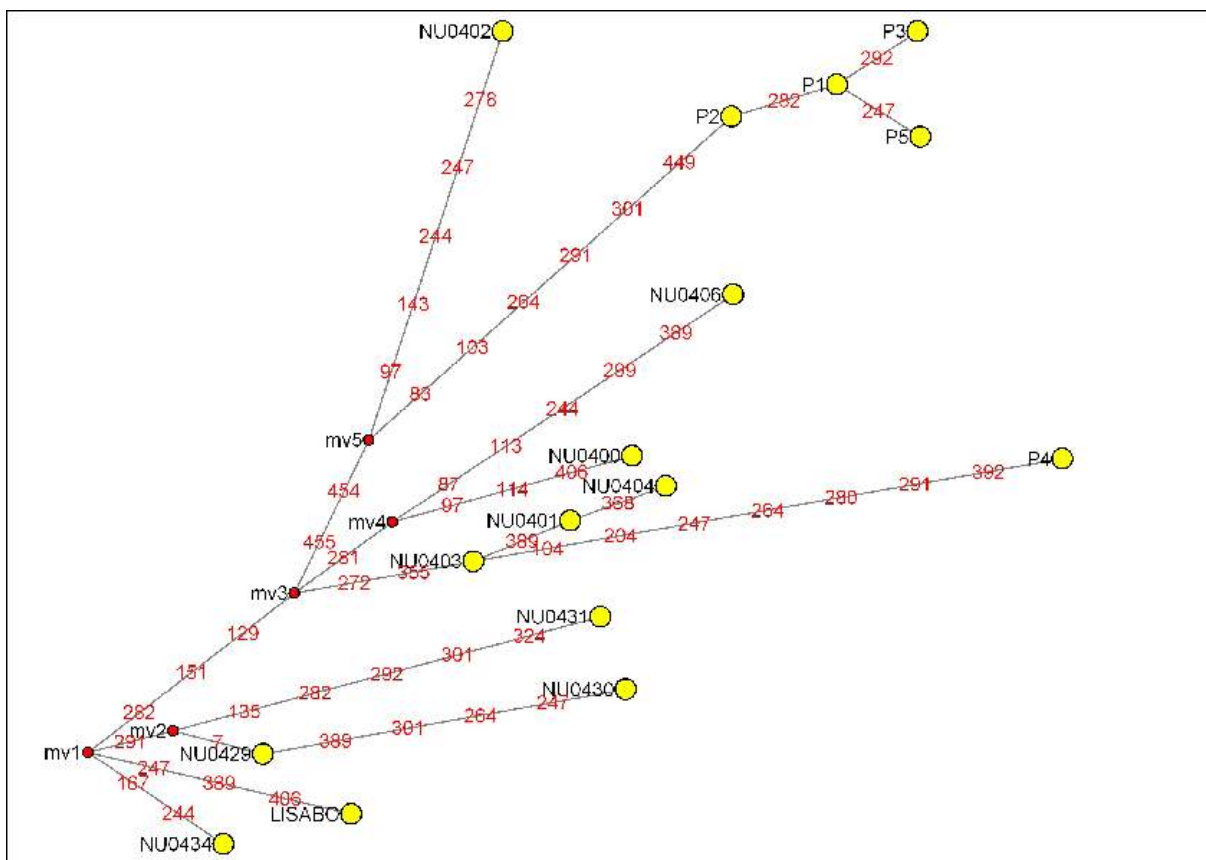
Slika 13. Slijed od 468 pb svih pet jedinstvenih haplotipova nađenih u 10 jedinki vrste plavobijeli dupin. Za najučestaliji haplotip (P1) naveden je potpuni slijed, dok su u ostalim haplotipovima istaknute samo baze koje se razlikuju od baza u najučestalijem haplotipu (točke označuju baze identične bazama u haplotipu P1)

Tablica 18. Genetička udaljenost između parova haplotipova prikazana brojem različitih nukleotida između parova haplotipova u svih jedinki plavobijelog dupina (ispod dijagonale), sa standardnim devijacijama (iznad dijagonale), pripadajući broj jedinki, te učestalost pojedinog haplotipa

haplotip	P1	P2	P3	P4	P5	broj jedinki	učestalost
P1		0,999	0,999	3,685	0,999	6	0,6
P2	1		1,411	3,555	1,411	1	0,1
P3	1	2		3,81	1,411	1	0,1
P4	14	13	15		3,555	1	0,1
P5	1	2	2	13		1	0,1

4.2.5. Usporedba dobivenih sljedova plavobijelih dupina sa sljedovima preuzetim iz GenBank baze podataka

Pretraživanjem računalne baze podataka NCBI pronašla sam mali broj sljedova kontrolne regije mtDNA plavobijelih dupina. Sljedovi pohranjeni u bazi GenBank nisu objavljeni u znanstvenom radu, a niti za jedan sljed nije navedena lokacija na kojoj je uzet uzorak. Koristila sam 11 sljedova koji su se po duljini preklapali sa sljedovima dobivenim u ovom istraživanju, a s obzirom da su na 5' kraju bili malo kraći, konačna duljina iznosila je 460 pb. U bazu GenBank deset sljedova kontrolne regije mtDNA plavobijelih dupina pohranili su autori su iz Kine (pristupni brojevi: AY046539 do AY046549), tako da pretpostavljam da su i uzorci iz tog dijela svijeta. Jedan sljed su pohranili autori iz Portugala (AY168600), ali s obzirom da niti oni nisu naveli lokaciju uzoraka, mogu samo pretpostaviti da je uzorak plavobijelog dupina uzet iz Atlantskog oceana ili Sredozemnog mora. Niti jedan od pet haplotipova pronađenih u uzorcima iz Jadranskog mora se ne podudara niti s jednim sljedom pohranjenim u bazi GenBank. Unutar pet haplotipova plavobijelih dupina iz Jadranskog mora i 11 haplotipova iz GenBank baze postoji 35 polimorfni mjesta. Filogenetski odnos između tih 16 haplotipova prikazan je mrežom na Slici 14. Mrežni prikaz ukazuje da haplotipovi P1, P2, P3 i P5 tvore izdvojenu skupinu, dok se P4 uklapa s haplotipovima autora iz Kine, kao i haplotip LISABO autora iz Portugala.



Slika 14. Filogenetska mreža dobivena „median joining“ metodom u programu Network 4.2. prikazuje odnose između pet haplotipova mtDNA plavobijelih dupina iz Jadranskog mora (haplotipovi P1, P2, P3, P4 i P5) i 11 haplotipova preuzetih iz GenBank baze podataka (haplotipovi oznaka NU0 preuzeti su od autora iz Kine, pristupni brojevi AY046539 do AY046549, a haplotip LISABO preuzet je od autora iz Portugala, pristupni broj AY168600). Istraženi haplotipovi prikazani su žutim čvorovima, dok crveni čvorovi prikazuju ancestralne haplotipove ili haplotipove koji nisu uzorkovani. Brojevi na granama prikazuju polimorfna mjesta u kojima se haplotipovi razlikuju.

4.2.6. Dio kontrolne regije mtDNA velikog sjevernog kita

Uspješno sam sekvencirala dio kontrolne regije duljine 365 pb uzorka velikog sjevernog kita, broj 98. BLAST pretragom baze GenBank utvrdila sam da se taj slijed podudara sa slijedom koji se nalazi u bazi kao haplotip Bp03 (pristupni broj AF119958, Bérubé i sur. 1998), koji je najučestaliji haplotip velikog sjevernog kita u sjevernom dijelu Atlantskog oceana i Sredozemnog mora.

5. RASPRAVA

Srednja genetička raznolikost (očekivana heterozigotnost) populacije dobrog dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora procijenjena na vrijednost od 0,699 relativno je visoka. Natoli i sur. (2005) procijenili su da srednja očekivana heterozigotnost (H_E) uzoraka dobrih dupina iz istočnog Sredozemnog mora na devet mikrosatelitskih lokusa iznosi svega 0,496, što je dosta niže od srednje vrijednosti H_E (odn. genetičke raznolikosti) populacije dobrih dupina iz Jadranskog mora od 0,699. Jadranska populacija bi pripadala toj navodnoj populaciji „istočnog Sredozemlja“. Isto tako su srednje vrijednosti H_E svih ostalih populacija dobrih dupina, a to su populacija iz Crnog mora, zapadnog dijela Sredozemnog mora, istočnog sjevernog Atlantskog oceana i Škotske iznosile redom 0,438; 0,612; 0,575 i 0,536 (Natoli i sur. 2005), što su sve niže vrijednosti od nalaza na jadranskoj populaciji. Ako pak za usporedbu uzmemo očekivane heterozigotnosti različitih svjetskih populacija dobrih dupina, vidjet ćemo da je opet većina očekivanih heterozigotnosti (što uključuje populacije iz Sredozemnog mora, istočnog dijela Atlantskog oceana, obalne populacije zapadnog dijela Atlantskog oceana, Meksički zaljev i istočni dio sjevernog Tihog oceana) niža od jadranskih, osim pelagičke populacije u zapadnom dijelu sjevernog Atlantskog oceana, koja iznosi 0,712 (Natoli i sur. 2004). Populacija dobrih dupina na sjevernim Bahamima ima nešto nižu H_E procijenjenu iz 17 mikrosatelitskih lokusa od jadranske populacije, a iznosi 0,655 (Parsons i sur. 2006). Sellas i sur. (2005) su procijenili očekivane heterozigotnosti različitih populacija dobrih dupina iz Meksičkog zaljeva na devet mikrosatelitskih lokusa i dobili vrijednosti od 0,627 do 0,720; što je slično vrijednosti H_E za jadransku populaciju.

Pet alela istraženih mikrosatelitskih lokusa nađenih samo u izraelskim uzorcima dobrih dupina ukazuju na eventualno postojanje tzv. privatnih alela u izraelskoj populaciji dobrih dupina. Da bi dokazali postojanje „privatnih“ alela u hrvatskoj populaciji dobrih dupina potrebno je provesti daljnja istraživanja na većem broju uzoraka iz Izraela.

S obzirom da nije uočena neravnoteža vezanosti gena između 12 lokusa u jadranskoj populaciji dobrih dupina, taj rezultat ukazuje da se svi lokusi korišteni u ovom istraživanju mogu rabiti kao neovisni genetički biljezi. Međutim, značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže združeno sa znatnim deficitom heterozigota na lokusu D28 ukazuje na vjerojatno postojanje problema u genotipizaciji tog lokusa zbog postojanja tzv. nul-alela. Jedan od razloga nastanka nul-alela je postojanje polimorfizma u mjestu vezanja klice za kalup DNA, tako da u jedinkama koje posjeduju mutaciju ne dolazi do vezanja klice, te ne nastaje odgovarajući PCR proizvod. Zbog toga kod nekih heterozigota nakon elektroforeze nastaje rezultat koji odgovara rezultatu koji se dobije za homozigote (Dakin i Avise 2004). Stoga lokus D28 ne bi bilo preporučljivo koristiti u budućim istraživanjima, pogotovo ako bi

se radilo o istraživanjima socijalne organizacije populacije dobrih dupina, u kojima bi se određivali parovi roditelj – potomak.

S obzirom da kod ostalih lokusa nije pronađeno značajno odstupanje od HWE, mogu utvrditi da nisam našla dokaze koji bi ukazivali na eventualno strukturiranje populacije dobrih dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora. Na temelju dobivenih rezultata, populacija dobrih dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora može se smatrati skupinom panmiktičkih jedinki.

Mala brojnost populacije dobrih dupina u hrvatskom dijelu Jadranskog mora od svega 220 do 250 jedinki (Gomercic i sur. 2002a, Gomerčić i sur. 2004) i anegdotalni dokazi o čestom ubijanju dupina u prošlosti (ribari) dali bi naslutiti da je ta populacija nedavno prošla kroz „usko grlo“. Međutim, korištenjem programa „Bottleneck“ nisu nađeni dokazi za to. Objašnjenje bi moglo biti da u hrvatskom dijelu Jadranskog mora u bližoj prošlosti nije postojala populacija dobrih dupina znatno veće brojnosti, koja je prošla kroz „usko grlo“, odnosno kojoj se veličina populacije nedavno naglo smanjila na današnju veličinu. Druga mogućnost je da je događaj „uskog grla“ vjerojatno postojao, ali je ostao neotkriven, što se može dogoditi u slučaju kada taj događaj nije bio dovoljno velikog obujma ili se nije dogodio nedavno. Isto tako neki događaji „uskog grla“ ostaju neotkriveni zbog toga što nije uzorkovano dovoljno jedinki, ili što uzorkovane jedinke ne predstavljaju reprezentativni uzorak populacije koja je prošla kroz „usko grlo“ ili pak populacija koja je prošla kroz „usko grlo“ nije potpuno izolirana i sadrži gene imigranata koji su prikrili genetički učinak „uskog grla“ (Luikart i Cornuet 1998). U populaciji dobrih dupina Crnog mora također nisu nađeni dokazi za „usko grlo“, premda spomenuta populacija ima vrlo nisku razinu genetičke raznolikosti od samo 0,438 (Natoli i sur. 2005).

Prikaz udaljenosti između jedinki dobiven temeljem udjela zajedničkih alela mikrosatelitskih lokusa pokazuje da se tri izraelska uzorka dobrog dupina grupiraju zajedno, što bi moglo ukazivati na to da su ostala dva izraelska uzorka (uzorci PA98 i A502) zapravo imigranti iz hrvatske populacije, jer se grupiraju s ostalim hrvatskim uzorcima. Međutim, podudarnost topologije stabla i geografskog porijekla uzoraka je slaba, a „bootstrap“ vrijednosti su dosta niske, te bi takvu tvrdnju trebalo provjeriti dodatnim istraživanjima na većem broju uzoraka iz Jadrana, a posebice na većem broju uzoraka iz ostalih dijelova istočnog Sredozemnog mora. Za dva para uzoraka (hrvatski par 25 i 56, te izraelski par DO98 i Mi01b) koji unutar para imaju bar po jedan zajednički alel na svim lokusima mogu pretpostaviti da se radi o paru roditelj – potomak.

Rezultati analize molekularne varijance koji pokazuju razdiobu mikrosatelitne varijacije ukazuju da postoji vrlo slabo strukturiranje unutar jadranske populacije dobrih dupina, koje dolazi do izražaja tek usporedbom skupina dupina iz sjevernog Jadrana sa skupinom iz južnog Jadrana (5,6% ukupne varijance otpada na varijancu među skupinama), a to je u slučaju kada zanemarimo skupinu jedinki iz srednjeg Jadrana. Očekivano se postotak ukupne varijance koji otpada na varijaciju između skupina povećava na 11% kada usporedimo hrvatske i izraelske skupine dobrih dupina, što ukazuje na određen stupanj odvojenosti dotičnih populacija. S obzirom da je istraživanje rađeno na samo pet uzoraka izraelske populacije, ovi rezultati su samo predpripremni, a u budućnosti bi bilo dobro provesti istraživanje na većem broju uzoraka dobrih dupina iz Izraela, a i ostalih populacija Sredozemnog mora.

Neuspješno genotipiziranje određenih mikrosatelitskih lokusa pojedinih uzorka bilo je očekivano jer je materijal za istraživanje uzet s lešina životinja koje su bile u različitim stupnjevima raspadanja. To znači da je u pojedinim uzorcima DNA bila degradirana čime se očekivano smanjuje uspješnost genotipizacije mikrosatelitskih lokusa. Iz istog razloga je i uspješnost sekvenciranja bila smanjena. To je također bilo očekivano, pogotovo ako se uzme u obzir da je prvotno umnažanjem dijela kontrolne regije mtDNA trebalo stvoriti fragment dugačak oko 1000 pb. Tako dugački fragmenti nemogu se dobiti iz starih uzoraka s degradiranom DNA. U budućim istraživanjima trebalo bi dizajnirati unutrašnje početnice koje bi davale kraće PCR proizvode, čime bi se povećala uspješnost sekvenciranja uzoraka raspadnutih lešina.

Obzirom da točan model mutacije mikrosatelita nije dovoljno poznat, oni se koriste u istraživanjima unutar vrste (u populacijskoj biologiji i/ili konzervacijskoj biologiji), gdje genetička divergencija nastaje kao posljedica nedavnog genetičkog „drifta“, prolaska populacije kroz „usko grlo“ ili križanja u visokom srodstvu, a manje kao posljedica mutacija. Mikrosateliti se stoga manje koriste u filogenetskim istraživanjima. Za njihovu upotrebu u filogenetskim istraživanjima bilo potrebno koristiti barem 100 lokusa. Stoga svrha upotrebe odabranih mikrosatelitskih lokusa u genotipiziranju jedinki ostalih vrsti nije bila filogenetsko istraživanje, već sam samo željela ispitati koji bi se od upotrebljenih lokusa mogli eventualno koristiti u populacijskim istraživanjima ostalih vrsta.

Alelne distribucije na vrstama plavobijeli dupin i glavati dupin procijenila sam iz vrlo malog uzorka (na deset jedinki plavobijelog i pet glavatog dupina), tako da ne ocrtavaju prave alelne distribucije, ali mogu služiti kao smjernice za buduća istraživanja na dotičnim vrstama. Mikrosatelitski lokusi EV37Mn, EV94Mn (Valsecchi i Amos 1996), te D08 i D18 (Shinohara

i sur. 1997) korišteni su, među ostalim lokusima, u istraživanjima plavobijelih dupina (Valsecchi i sur. 2004). Ostali lokusi iz ove doktorske disertacije nisu korišteni niti u jednom drugom objavljenom radu na plavobijelim dupinima.

Obzirom da sam istraživala samo jedan uzorak krupnozubog dupina, nemogu utvrditi da li je pet uspješno umnoženih lokusa uopće polimorfno u dotičnoj vrsti. Za ostale lokuse, koji nisu uspješno umnoženi, nemogu znati je li uzrok tome loše stanje uzorka (degradirana DNA), ili pak stvarno postoje mutacije u mjestima vezanja početnica za dotične lokuse.

Za vrstu veliki sjeverni kit dostupna su mi bila samo dva uzorka, te isto tako nemogu utvrditi je li uzrok neuspješnog umnažanja lokusa TV3, D14 i D28 razgrađena DNA u uzorcima ili pak postojanje mutacija u mjestima vezanja početnica za te lokuse.

Općenito za vrste krupnozubi dupin i veliki sjeverni kit nemogu donijeti nikakve zaključke o alelskim distribucijama, no za buduća istraživanja dobiveni rezultati mogu služiti kao smjernice za eventualno korištenje mikrosatelitskih lokusa koji su razvijeni u vrsti dobri dupin.

Genska raznolikost (haplotipska raznolikost) jadranske populacije dobrih dupina od 0,557 dosta je niska. Genska raznolikost populacije iz Crnog mora iznosila je 0,675; dok je ona iz zapadnog Sredozemlja iznosila čak 0,939 (Natoli i sur. 2005). Međutim, nukleotidna raznolikost jadranske populacije dobrih dupina od 0,022 poprilično je visoka. Populacija iz zapadnog Sredozemlja pokazala je nukleotidnu raznolikost od 0,015; dok je škotska populacija pokazala nukleotidnu raznolikost od samo 0,006. Ukupna prosječna nukleotidna raznolikost dobivena od 145 uzoraka od Crnog mora od istočnog dijela sjevernog Atlantskog oceana iznosila je 0,016 (Natoli i sur. 2005). Nukleotidna raznolikost jadranske populacije slična je nukleotidnoj raznolikosti pučinske populacije dobrih dupina istočne obale Sjeverne Amerike, koja iznosi 0,027; dok je ta vrijednost za obalnu populaciju dosta niža i iznosi samo 0,006 (Hoelzel i sur. 1998). Natoli i sur. (2004) su za sredozemnu populaciju dobrih dupina procijenili da ima relativno visoku gensku i nukleotidnu raznolikost (0,94 i 0,023 redom), a isto tako i pučinska populacija iz sjevero-zapadnog Atlantskog oceana (0,88 i 0,022), kineska pučinska (0,92 i 0,024) i populacija zapadnog Atlantika (0,73 i 0,023), dok su za populaciju iz sjevero-istočnog Atlantika (0,42 i 0,016), obalnu populaciju iz sjevero-zapadnog Atlantika (0,43 i 0,018), populaciju iz južne Afrike (0,29 i 0,008), te populaciju dobrih dupina iz Meksičkog zaljeva (0,72 i 0,013) procijenili da imaju relativno niske vrijednosti raznolikosti. Za različite populacije dobrih dupina iz Meksičkog zaljeva procijenjena je haplotipska raznolikost od 0,441 do 0,796; a nukleotidna raznolikost od 0,003 do 0,010 (Sellas i sur. 2005). Ako usporedimo raznolikosti između jadranske populacije dobrih dupina i uzoraka

plavobijelog dupina nađenih u Jadranu, tada se uočava da je genska raznolikost plavobijelog dupina veća od genske raznolikosti dobrog dupina (0,667 nasuprot 0,557), međutim nukleotidna raznolikost plavobijelog dupina je izrazito mala i iznosi svega 0,007; za razliku od one kod dobrog dupina, koja iznosi 0,022. Isto tako u obje vrste sam našla po pet jedinstvenih haplotipova, premda je broj uspješno sekvenciranih sljedova dobrih dupina iz Hrvatske iznosio 25, a plavobijelih samo deset.

Četiri od pet haplotipova pronađenih u dobrim dupina podudaraju se sa sljedovima pohranjenim u bazi podataka GenBank. Tako se primjerice haplotip D1 podudara s tri sljeda koji su pronađeni u jedinkama iz zapadnog Sredozemlja, istočnog Sredozemlja i Crnog mora (pristupni brojevi redom AY963611, AY963599 i AY963588, Natoli i sur. 2005).

Ta tri sljeda zapravo čine tri različita haplotipa, a dugački su oko 630 pb. Međutim, kada se ti sljedovi usporede sa sljedovima dobivenim u ovom istraživanju i skrate na njihovu duljinu (na 470 pb), tada se stapaju u jedan haplotip. Usporedbom samo dijela kontrolne regije mtDNA koji je dugačak samo 470 pb nemožemo utvrditi da li se pronađeni haplotip zaista podudara s nekim od tri pohranjena haplotipa ili možda predstavlja novo nađeni haplotip. Da bi se odgovorilo na to pitanje bilo bi potrebno provesti daljnja istraživanja u kojima bi se sekvencirao dulji dio kontrolne regije mtDNA. Isto se odnosi za ostala tri haplotipa (D2, D4 i D5) za koje sam pronašla da se podudaraju s određenim sljedovima pohranjenima u bazi GenBank.

Nepodudarnost između topologije filogenetskog stabla dobrih dupina i geografskog porijekla haplotipova ukazuje ili na postojanje popriličnog protoka gena između populacija uključenih u analizu ili pak na to da istraženi dio kontrolne regije mtDNA nije dovoljno dobar biljeg za razlikovanje eventualno odvojenih populacija. Stoga bi u budućnosti trebalo provesti analizu sa duljim slijedom kontrolne regije mtDNA.

Odvajanje haplotipa D3 od ostalih analiziranih haplotipova dobrih dupina iznenađujući je nalaz. On bi mogao biti posljedica tehničke pogreške u istraživanju, što bi u budućnosti trebalo istražiti ponavljanjem sekvenciranja jedinki koje pripadaju tom haplotipu uz eventualno korištenje redizajniranih početnica. U slučaju da se pokaže da nije došlo do tehničke pogreške, tada je taj nalaz vrlo zanimljiv i mogao bi ukazivati na postojanje jedinki koje se dosta razlikuju od ostalih jedinki dobrih dupina, barem po haplotipu dijela kontrolne regije mtDNA.

Grupiranje četiri haplotipa plavobijelih dupina iz Jadrana nije neočekivano, s obzirom da su uspoređivani najvjerojatnije s haplotipovima plavobijelih dupina područja oko Kine (pristupni brojevi AY046539 do AY046549), koji su geografski udaljeni a time vjerojatno i

izolirani od jedinki iz Sredozemnog mora. Međutim, haplotipovi P4 iz Jadranskog mora i LISABO (pristupni broj AY168600), čije porijeklo nije poznato, a za pretpostaviti je da potječe ili iz Sredozemnog mora ili iz Atlantskog oceana, grupiraju se s haplotipovima koji su najvjerojatnije iz područja oko Kine. Takve nalaze teško je interpretirati na osnovi dostupnih podataka. Stoga bi bilo potrebno provesti daljnja istraživanja koja bi uključila više uzoraka plavobijelih dupina iz raznih dijelova Sredozemnog mora. Isto tako bi bilo dobro sekvencirati dulji dio kontrolne regije mtDNA, jer se pokazalo da se polimorfna mjesta koja određuju haplotipove nalaze i nizvodno od ovdje istraživane regije.

S obzirom da čak 28,4% uzoraka velikog sjevernog kita sakupljena u sjevernom dijelu Atlantskog oceana i Sredozemnom moru pripada haplotipu Bp02 (GenBank pristupni broj AF119958, Bérubé i sur. 1998), nije neočekivano da je i naš uspješno sekvencirani uzorak velikog sjevernog kita V 98 istovjetan tom haplotipu. Međutim, haplotipovi objavljeni u gore navedenom radu određeni su na osnovi sljeda kontrolne regije mtDNA dugačkog samo 288 pb, stoga nemožemo nedvojbeno potvrditi da i sljed V 98 pripada dotičnom haplotipu.

6. ZAKLJUČCI

Genska raznolikost mjerena mikrosatelitskim lokusima jadranske populacije dobrog dupina relativno je visoka i iznosi 0,699; svi istraženi lokusi polimorfni su, a distribucija alela je disjunktna za većinu lokusa.

Rezultati ukazuju na eventualno postojanje „privatnih“ alela mikrosatelitskih lokusa u različitim populacijama dobrih dupina.

Svi korišteni mikrosatelitski lokusi mogu se rabiti kao neovisni genetički biljezi, jer nije uočena neravnoteža vezanosti gena niti između jednog para lokusa.

Lokus D28 pokazuje značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, što bi mogla biti posljedica postojanja zagonetnosti u genotipizaciji tog lokusa zbog postojanja nul-alela. Stoga lokus D28 nije preporučljivo koristiti u istraživanjima socijalne organizacije i srodstvenih odnosa populacije dobrih dupina.

Nisu nađeni dokazi koji bi ukazivali na strukturiranje populacije dobrih dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora, jer kod ostalih mikrosatelitskih lokusa nije pronađeno značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Stoga se ta populacija može smatrati skupinom panmiktičkih jedinki.

Nisu nađeni dokazi koji bi upućivali na to da je jadranska populacija dobrih dupina nedavno prošla kroz „usko grlo“.

Rezultati analize molekularne varijance ukazuju da postoji vrlo slabo strukturiranje unutar jadranske populacije dobrih dupina, odnosno 5,6% ukupne mikrosatelitne varijacije otpada na varijaciju između skupine uzoraka iz sjevernog i južnog Jadrana, a kada zanemarimo skupinu uzoraka iz srednjeg Jadrana. Sve ostale usporedbe skupina (sjeverni – srednji Jadran i srednji – južni Jadran) pokazuju da postoji veća različitost unutar svake skupine od one između skupina.

Rezultati analize molekularne varijance ukazuju da 11% ukupne mikrosatelitske varijacije pripada varijaciji između populacije dobrih dupina iz Hrvatske i uzoraka iz Izraela.

U istraživanjima ostale dvije vrste šiljatozubih dupina (plavobijeli dupin i glavati dupin) mogli bi se koristiti svi istraženi mikrosatelitski lokusi, jer se uspješno umnažaju i polimorfni su, osim lokusa TV5 koji se ne umnaža u vrsti glavati dupin.

Haplotipska raznolikost jadranske populacije dobrih dupina od 0,557 relativno je niska; ali je nukleotidna raznolikost od 0,022 relativno visoka. Haplotipska raznolikost uzoraka plavobijelih dupina nađenih u Jadranu viša je od haplotipske raznolikosti jadranske populacije dobrih dupina i iznosi 0,667; međutim nukleotidna raznolikost je znatno niža i iznosi 0,007. U obje vrste nađeno je po pet jedinstvenih haplotipova.

Četiri haplotipa nađena u jadranskoj populaciji dobrih dupina podudara se sa sljedovima pohranjenim u bazi GenBank, međutim haplotip D3 po prvi puta je opisan ovdje. S obzirom na veliku različitost tog haplotipa od svih ostalih haplotipova dobrih dupina, trebalo bi provjeriti njegovu točnost i dalje ga istražiti.

Nepodudarnost topologije filogenetskog stabla dobivenog na osnovi sljedova kontrolne regije mtDNA i geografskog porijekla uzoraka dobrih dupina ukazuje ili na postojanje znatnog protoka gena među populacijama ili na nepogodnost dotičnog biljega.

7. CITIRANA LITERATURA

Archer FI (2002) Striped dolphin *Stenella coeruleoalba*. *U*: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM (eds.) Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego, 1201-1203

Archer FI, Perrin WF (1999) *Stenella coeruleoalba*. Mammalian Species 603: 1-9

Árnason Ú, Gullberg A, Widegren B (1993) Cetacean Mitochondrial DNA Control Region: Sequences of All Extant Baleen Whales and Two Sperm Whale Species. Molecular Biology and Evolution 10: 960-970

Árnason Ú, Gullberg A, Janke A (2004) Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution. Gene 333: 27-34

Ashworth D, Bishop M, Campbell K, Colman A, Kind A, Schnieke A, Blott S, Griffin H, Haley C, McWhir J, Wilmut I (1998) DNA microsatellite analysis of Dolly. Nature 394: 329

Bader JM (1998) Measuring Genetic Variability in Natural Populations by Allozyme Electrophoresis. *U*: Karcher SJ (ed.) Tested studies for laboratory teaching 19. Proceedings of the 19th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 25-42

Bailey E, Reid RC, Skow LC, Mathiason K, Lear TL, McGuire TC (1997) Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4, synteny and FISH mapping to ECA9. Animal Genetics 28: 268-273

Baird WR, Walters EL, Stacey PJ (1993) Status of the Bottlenose Dolphin, *Tursiops truncatus*, with Special Reference to Canada. The Canadian Field-Naturalist 107: 466-107

Bearzi G, Holcer D, Notarbartolo Di Sciara G (2004) The role of historical takes and habitat degradation in shaping the present status of northern Adriatic cetaceans. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 14: 363-379

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France)

Bensch S, Akesson M (2005) Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology* 14: 2899-2914

Bérubé M, Aguilar A, Dendanto D, Larsen F, Notarbartolo Di Sciara G, Sears R, Sigurjónsson J, Urban-R J, Palsbøll PJ (1998) Population genetic structure of North Atlantic, Mediterranean Sea and Sea of Cortez fin whales, *Balaenoptera physalus* (Linnaeus 1758): analysis of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Ecology* 7: 585-599

Bérubé M, Urbán JR, Dizon AE, Brownell RL, Palsbøll PJ (2002) Genetic identification of a small and highly isolated population of fin whales (*Balaenoptera physalus*) in the Sea of Cortez, México. *Conservation Genetics* 3: 183-190

Blott SC, Williams JL, Haley CS (1999) Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82: 613-619

Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27: 1767-1780

Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL (1994) High resolution human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455-457

Bowtell DLL (1987) Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Analytical Biochemistry* 162: 463

Bruford MW, Wayne RK (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 939-943

Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T (1998) Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. *U: Hoelzel AR (ed.) Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach*. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 287-336

Centro Studi Cetacei (1987) Cetacei spiaggiati lungo le coste italiane. I. Rendiconto 1986. *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale di Milano* 128: 305-313

Centro Studi Cetacei (1995) Cetacei spiaggiati lungo le coste italiane. VII.. Rendiconto 1992 (Mammalia). Atti della Società Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale di Milano 134: 285-298

Christensen M, Sunde L, Bolund L, Orntoft TF (1999) Comparison of three methods of microsatellite detection. The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 59: 167-177

Ciofi C, Funk SM, Coote T, Cheesman DJ, Hammond RL, Saccheri IJ, Bruford MW (1998) Genotyping with Microsatellite Markers. *U*: Karp A, Isaac PG, Ingram DS (eds.) Molecular Tools for Screening Biodiversity. Chapman & Hall, 195-201

Constable JJ, Packer C, Collins DA, Pusey AE (1995) Nuclear DNA from primate dung. Nature 373: 393

Coughlan JP, Seymour J, Cross TF (2006) Isolation and characterization of seven polymorphic microsatellite loci in the box jellyfish (*Chironex fleckeri*, Cubozoa, Cnidaria). Molecular Ecology Notes 6: 41-43

Cornuet J M, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001-2014

Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. Heredity 93: 504-509

Dalebout ML, Mead JG, Baker CS, Baker AN, Van Helden AL (2002) A new species of beaked whale *Mesoplodon perrini* sp. N. (Cetacea: Ziphiidae) discovered through phylogenetic analyses of mitochondrial DNA sequences. Marine Mammal Science 18: 577-608

Dalebout ML, Robertson KM, Frantzis A, Engelhaupt D, Mignucci-Giannoni AA, Rosario-Delestre RJ, Baker CS (2005) Worldwide structure of mtDNA diversity among Cuvier's

beaked whales (*Ziphius cavirostris*): implications for threatened populations. *Molecular Ecology* 14: 3353-3371

Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutation processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3166-3170

Díaz-Jaimes P, Barbosa-Saldaña MDL, Uribe-Alcocer M (2006) Allozyme variation in eastern Pacific brown shrimp *Farfantepenaeus californiensis* populations. *Fisheries Science* 72: 696-698

Đuras Gomerčić M (2006) Rast, spolni dimorfizam i morfometrijske značajke dobrog dupina (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) iz Jadranskog mora. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50

Felsenstein J (1993) *PHYLIP*. University of Washington, Seattle, WA

Fleischer RC (1996) Application of Molecular Methods to the Assessment of Genetic Mating Systems in Vertebrates. *U: Ferraris JD i Palumbi SR (eds) Molecular Zoology: Advances, Strategies, and Protocols*. Wiley-Liss, Inc., 133-161

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge

Galov A, Byrne K, Đuras-Gomerčić M, Gomerčić T, Nushol Z, Vincek D, Kocijan I, Tadić Z, Benković V, Bašić I, Funk SM (2005) Effectiveness of nine polymorphic microsatellite markers in parentage testing in Posavina, Croatian Coldblood and Lipizzaner horse breeds in Croatia. *Livestock Production Science* 93: 277-282.

García-Martínez J, Moya A, Raga JA, Latorre A (1999) Genetic differentiation in the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* from European waters according to mitochondrial DNA (mtDNA) restriction analysis. *Molecular Ecology* 8: 1069-1073

Gomercic H, Huber D, Gomercic A, Gomercic T (1998) Geographical and historical distribution of the cetaceans in Croatian part of the Adriatic Sea. *Rapport du 35e Congres de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée. CIESM Congress Proceedings, Dubrovnik, Croatia, 35: 440-44*

Gomercic H, Huber C, Mihelic D, Lucic H, Gomercic T, Curas M (2002a) Estimation of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) population in the Croatian part of the Adriatic Sea. 9th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions, Abstracts. p. 43. The Hellenic Zoological Society. Thessaloniki, 2002.

Gomercic H, Curas M, Lucic H, Gomercic T, Huber C, Ckrtic D, Cukrovic S, Galov A, Vukovic S (2002b) Cetacean mortality in Croatian part of the Adriatic Sea in period from 1990 till February 2002. 9th International Congress on the Zoogeography and Ecology of Greece and Adjacent Regions, Abstracts. p. 42. The Hellenic Zoological Society. Thessaloniki, 2002.

Gomerčić H, Huber Đ, Gomerčić T, Gomerčić A, Škrtić D, Vuković S (1994) Plavobijeli dupin (*Stenella caeruleoalba*, Meyen 1833) godine 1991. po prvi puta nađen u Jadranu. Zbornik sažetaka priopćenja. Peti kongres biologa Hrvatske, Pula 3.-7. 10. 1994. Zagreb 1994. str 340-341

Gomerčić T, Đuras Gomerčić M, Gomerčić H, Škrtić D, Ćurković S, Lucić H, Galov A, Vuković S, Huber Đ (2004) Vrste, brojnost i rasprostranjenost morskih sisavaca u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Zbornik radova 1. hrvatsko-slovenskog simpozija o egzotičnim i divljim životinjama. Hrvatsko veterinarsko društvo. Zagreb, 2004. str. 16.

Gomerčić H, Đuras Gomerčić M, Gomerčić T, Lucić H, Dalebout M, Galov A, Škrtić D, Ćurković S, Vuković S, Huber Đ (2006) Biological aspects of Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) recorded in the Croatian part of the Adriatic Sea. *European Journal of Wildlife Research* 52: 182-187

González-Wangüemert M, Giménez-Casalduero F, Pérez-Ruzafa Á (2006) Genetic differentiation of *Elysia timida* (Risso, 1818) populations in the Southwest Mediterranean and Mar Menor coastal lagoon. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 514-527

Grosberg RK, Levitan DR, Cameron BB (1996) Characterization of Genetic Structure and Genealogies Using RAPD-PCR Markers: A Random Primer for the Novice and Nervous. *U: Ferraris JD i Palumbi SR (eds) Molecular Zoology: Advances, Strategies, and Protocols. Wiley-Liss, Inc., 67-100*

Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372. Citirano u: Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21: 2128-2129

Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys A (1991) Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352: 427-429

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98

Hammond RL, Saccheri IJ, Ciofi C, Coote T, Funk SM, McMillan WO, Bayes MK, Taylor E, Bruford MW (1998) Isolation of Microsatellite Markers in Animals. *U: Karp A, Isaac PG, Ingram DS (eds.) Molecular Tools for Screening Biodiversity. Chapman & Hall, 279-285*

Hancock JM (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *U: Goldstein DB i Schlötterer C (eds.) Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, 1-9*

Hansen MM, Mensberg K-L D, Rasmussen G, Simonsen V (1997) Genetic variation within and among Danish brown trout (*Salmo trutta* L.) hatchery strains, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Aquaculture* 153: 15-29

Hartmann GM (2000) The European studbook of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): 1998 survey results. *Aquatic Mammals* 26: 95-100

Hoelzel AR, Dover GA (1991) Molecular genetic ecology. IRL press at Oxford University Press, Oxford

Hoelzel AR, Green A (1998) PCR protocols and population analysis by direct DNA sequencing and PCR-based DNA fingerprinting. *U: Hoelzel AR (ed.) Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach*. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 201-235

Hoelzel AR, Hancock JM, Dover GA (1991) Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-Loop Region. *Molecular Biology and Evolution* 8: 475-493

Hoelzel AR, Potter CW, Best PB (1998) Genetic differentiation between parapatric „nearshore“ and „offshore“ populations of the bottlenose dolphin. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265: 1177-1183

Holcer D (2006) Dobri dupin. *U: Tvrtković N (ur.) Crvena knjiga sisavaca Hrvatske*. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska, 52-53

Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6: 65-70

Ivanković A, Dovč P, Kavar T, Caput P, Mioč B, Pavić V, Štuhec V, Leto J (2005) Genetic characterisation of the Pag island sheep breed based on microsatellite and mtDNA data. *Small ruminant Research* 57: 167-174

Jefferson TA, Leatherwood S, Webber MA (1993) Marine mammals of the World, FAO Species Identification Guide, United Nations Environment Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Individual-specific „fingerprints“ of human DNA. *Nature* 316: 76-79

Jemeršić L, Tomašković I, Keros T, Mikulić B, Tadić Z, Galov A, Lojkić M Bašić I (2003) Parentage testing of cattle in Croatia based on DNA analysis. Proceedings of the papers of IV Central European Buiatric Congress, Lovran, Croatia, April 23 – 27, 2003, p. 323-327

Ji G, Yang G, Liu S, Zhou K (2002) Variability of the mitochondrial DNA control region of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Acta Zoologica Sinica* 48: 487-493

Kadri K, Snoussi H, M'Barek B, Abdallah BA (2006) Using RAPD markers to assess the genetic diversity of almond trees (*Prunus dulcis* Mill.) *Cahiers Agricultures* 15: 195-202

Kashi Y, Soller M (1999) Functional roles of microsatellites and minisatellites. *U: Goldstein DB i Schlötterer C (eds.) Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, 10-23*

Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738. Citirano u: Cornuet J M, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 86: 6196-6200

Kohn MH, Wayne RK (1997) Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 223-227

Kohn MH, York EC, Kamradt DA, Haught G, Sauvajot RM, Wayne RK (1999) Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266: 657-663

Koskinen MT, Bredbacka P (1999) A convenient and efficient microsatellite-based assay for resolving parentages in dogs. *Animal Genetics* 30: 148-149

Krützen M, Sherwin WB, Berggren P, Gales N (2004) Population structure in an inshore cetacean revealed by microsatellite and mtDNA analysis: bottlenose dolphins (*Tursiops* sp.) in Shark Bay, Western Australia. *Marine Mammal Science* 20: 28-47

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163

Leatherwood S, Reeves RR (1983) *The Sierra Club Handbook of Whales and Dolphins*. Sierra Club Books, San Francisco

Li A, Ge S (2006) Genetic variation and conservation of *Changnienia amoena*, an endangered orchid endemic to China. *Plant Systematics and Evolution* 258: 251-260

Li L, Zhang J, Zhu JQ, Gu S, Sun Q, Zhou GM, Fu CX, Li Q, Yang ZR (2006) Genetic diversity of nine populations of the black goat (*Capra hircus*) in Sichuan, PR China. *Zoological Science* 23: 229-234

Lipej L, Dulčić J, Kryštufek B (2004) On the occurrence of the fin whale (*Balaenoptera physalus*) in the northern Adriatic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 84: 861-862

Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21: 2128-2129

Luikart G, Cornuet JM (1998) Empirical Evaluation of a Test for Identifying Recently Bottlenecked Populations from Allele Frequency Data. *Conservation Biology* 12: 228-237

MacHugh DE, Loftus RT, Cunningham P, Bradley DG (1998) Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics* 29: 333-340

Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, Sandberg K, Andersson L (1994) Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics* 25: 19-23

Martín-Burriel I, García-Muro E, Zaragoza P (1999) Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics* 30: 177-182

Mattiangeli V, Galvin P, Ryan AW, Mork J, Cross TF (2002) VNTR variability in Atlantic poor cod (*Trisopterus minutus minutus*) throughout its range: single locus minisatellite data suggest reproductive isolation for the Faroe Bank population. *Fisheries Research* 58: 185-191

May B (1998) Starch gel electrophoresis of allozymes. *U: Hoelzel AR (ed.) Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach*. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 1-28

Minch E, Ruiz-Linares A, Goldstein DB, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL (1997) MICROSAT: A computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data. Stanford University, Palo Alto, CA

Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269-292

Moxon ER, Wills C (1999) DNA Microsatellites: Agents of Evolution? *Scientific American*. January 1999: 72-77

Mueller UF, Wolfenbarger LL (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 389-394

Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R (1987) Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science* 235: 1616-1622

Narodne novine 70/2005 (8.6.2005) Zakon o zaštiti prirode

Narodne novine 7/2006 (16.1.2006) Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim

Natoli A, Peddemors VM, Hoelzel R (2004) Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 363-375

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

Natoli A, Cañadas A, Peddemors VM, Aguilar A, Vaquero C, Fernández-Piqueras, Hoelzel AR (2006) Phylogeography and alpha taxonomy of the common dolphin (*Delphinus* sp.). *Journal of Evolutionary Biology* 19: 943-954

Neff BD, Gross MR (2001) Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55: 1717-1733

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590

Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA

Ngamsiri T, Ohashi Y, Sukumasavin N, Nakajima M, Na-Nakorn U, Taniguchi N (2006) Characterization of microsatellite DNA markers in a critically endangered species, Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*. *Molecular Ecology Notes* 6: 313-315

Notarbartolo di Sciara G, Demma M (1994) *Guida dei Mammiferi Marini del Mediterraneo*. Franco Muzzio Editore, Padova

Ohta T, Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Research* 22: 201-204.
Citirano u: Cornuet J M, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014

Page RDM, Holmes EC (1998) *Molecular Evolution, A Phylogenetic Approach*. Blackwell Science

Parsons KM, Dallas JF, Claridge DE, Durban JW, Balcomb KC, Thompson PM, Noble LR (1999) Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. *Molecular Ecology* 8: 1753-1768

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

Parsons KM, Noble LR, Reid RJ, Thompson PM (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

Parsons KM, Durban JW, Claridge DE (2006) Population genetic structure of coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the northern Bahamas. *Marine Mammal Science* 22: 276-298

Petit RJ, Mousadik AE, Pons O (1998) Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. *Conservation Biology* 12: 844-855

Pichler FB, Robineau D, Goodall RNP, Meyers MA, Olivarría C, Baker CS (2001) Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). *Molecular Ecology* 10: 2215-2223

Podestà M, Bortolotto A (2001) Il Progetto Spiaggiamenti del Centro Studi Cetacei: analisi dei risultati di 11 anni di attività. *Natura - Società Italiana di Scienze Naturali Museo Civico di Storia Naturale di Milano* 90: 145-158 (citirano u Bearzi i sur 2004)

Poldan I (2004) Analiza čeljusti glavonožaca (Cephalopoda) iz želudaca dobrih dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskog mora. Studentski rad nagrađen Rektorovom nagradom 2004. god. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, 2004.

(<http://www.vef.hr/dolphins/radovi/pdf/poland2004.pdf>)

Randi E, Francisci F, Lucchini V (1995) Mitochondrial DNA restriction-fragment-length monomorphism in the Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 33: 97-100

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249

Reeves RR, Stewart BS, Clapham PJ, Powell JA (2002) *Guide to marine mammals of the world*. AA Knopf, New York

Rice DW (1998) *Marine Mammals of the World, Systematics and Distribution*. Special Publication Number 4, The Society for Marine Mammalogy

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225

Rooney AP, Merritt DB, Derr JN (1999) Microsatellite Diversity in Captive Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). *The Journal of Heredity* 90: 228-231

Rosel PE, Dizon AE, Heyning JE (1994) Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*). *Marine Biology* 119: 159-167

Rudnick JA, Katzner TE, Bragin EA, Rhodes OE, Dewoody JA (2005) Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Molecular Ecology* 14: 2959-2967

SAS Institute 1999. Proprietary Software Release 8.02, Cary, NC, USA

Schmitt T, Habel JC, Zimmermann M, Müller P (2006) Genetic differentiation of the marbled white butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and postglacial range expansion in southeastern Europe. *Molecular Ecology* 15: 1889-1901

Sellas AB, Wells RS, Rosel PE (2005) Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal fine scale geographic structure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Gulf of Mexico. *Conservation Genetics* 6: 715-728

Shibata D (1999) Microsatellite analysis of human tumours. *U: Goldstein DB i Schlötterer C* (eds.) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, 266-274

Signer EN, Dubrova YE, Jeffreys AJ, Wilde C, Finch LMB, Wells M, Peaker M (1998) DNA fingerprinting Dolly. *Nature* 394: 329-330

Schlötterer C (1998) Microsatellites. *U: Hoelzel AR* (ed.) *Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach*. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 237-261

Shinohara M, Domingo-Roura X, Takenaka O (1997) Microsatellites in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. *Molecular Ecology* 6: 695-696

Strassmann JE, Solis CR, Peters JM, Queller DC (1996) Strategies for Finding and Using Highly Polymorphic DNA Microsatellite Loci for Studies of Genetic Relatedness and Pedigrees. *U: Ferraris JD i Palumbi SR* (eds) *Molecular Zoology: Advances, Strategies, and Protocols*. Wiley-Liss, Inc., 163-180

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680

Tiedemann R, Nadlinger K, Pucek Z (1998) Mitochondrial DNA RFLP analysis reveals low levels of genetic variation in European bison *Bison bonasus*. *Acta Theriologica Suppl*5: 83-87

Torres LG, Rosel PE, D'Agrosa C, Read AJ (2003) Improving management of overlapping bottlenose dolphin ecotypes through spatial analysis and genetics. *Marine Mammal Science* 19: 502-514

Triant DA, Pace, III RM, Stine M (2004) Abundance, genetic diversity and conservation of Louisiana black bears (*Ursus americanus luteolus*) as detected through noninvasive sampling. *Conservation Genetics* 5: 647-659

Valsecchi E, Glockner-Ferrari D, Ferrari M, Amos W (1998) Molecular analysis of the efficiency of sloughed skin sampling in whale population genetics. *Molecular Ecology* 7: 1419-1422

Valsecchi E, Amos W (1996) Microsatellite markers for the study of cetacean populations. *Molecular Ecology* 5: 151-156

Valsecchi E, Amos W, Raga JA, Podestà M, Sherwin W (2004) The effects of inbreeding on mortality during a morbillivirus outbreak in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Animal Conservation* 7: 139-146

Van Houdt JKJ, Pinceel J, Flamand M-C, Briquet M, Dupont E, Volckaert FAM, Baret PV (2005) Migration barriers protect indigenous brown trout (*Salmo trutta*) populations from introgression with stocked hatchery fish. *Conservation Genetics* 6: 175-191

Viaud K, Bohonak AJ, Brownell RL, Komnenou A, Mukhametov LM (2004) Conservation status of Black Sea bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): assessment using morphological and genetic variation. Report to ACCOBAMS scientific committee. Document MOP 2 / Inf 30. Second Meeting of the Parties, Palma de Mallorca 9-12 11 2004 (<http://www.accobams.org/2006.php/parties/documents/2>)

Wang JY, Chou L-S, White BN (1999) Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Molecular Ecology* 8: 1603-1612

- Wasser SK, Houston CS, Koehler GM, Cadd GG, Fain SR (1997) Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology* 6: 1091-1097
- Weir BS (1996) Genetic data analysis II Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Citirano u: Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21: 2128-2129
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M (1992) A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359: 794-801
- Weissenbach J (1998) The human genome project – from mapping to sequencing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 36: 511-514
- White PS, Tatum OL, Tegelström H, Densmore III L (1998) Mitochondrial DNA isolation, separation, and detection of fragments. *U: Hoelzel AR (ed.) Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 65 - 101*
- Wu S-B, Collins G, Sedgley M (2004) A molecular linkage map of olive (*Olea europea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome/Génome* 47: 26-35
- Xu QH, Fang SG (2006) Variable number tandem repeats in the mitochondrial DNA Control region of the Chinese alligator, *Alligator sinensis*. *Amphibia-Reptilia* 27: 93-101
- Yang G, Ji G, Ren W, Zhou K, Wei F (2005) Pattern of genetic variation of bottlenose dolphins in Chinese waters. *The Raffles Bulletin of Zoology* 53: 157-164
- Zangari F, Cimmaruta R i Nascetti G (2006) Genetic relationships of the western Mediterranean painted frogs based on allozymes and mitochondrial markers: evolutionary and taxonomic inferences (Amphibia, Anura, Discoglossidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 87: 515-536
- Zhang D-X Hewitt GM (1996) Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 247-251

PRILOZI

Životopis

Ana Galov (rođ. Gomerčić)

Datum i mjesto rođenja

28. travnja 1971., Zagreb

Bračni status

udana, majka dvoje djece

Zaposlenje

Od 1997. zaposlena na Zavodu za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Nastavna zaduženja

Asistentica na praktikumima kolegija Animalna fiziologija, Imunologija, Ekološka imunologija, Imunologija i imunogenetika.

Obrazovanje

Poslijediplomsko: 1997. upisala poslijediplomski studij PMF-a Molekularne i stanične biologije. Magistarski rad «Mikrosatelitski lokusi u genotipizaciji konja pasmine hrvatski posavac» obranila 2000.

Dodiplomsko: 1989. upisala studij biologije – molekularna biologija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala 1996. godine i stekla zvanje dipl. inž. biologije smjer molekularna biologija. Diplomski rad: «Konstruiranje kompeticijske DNA gena za retinoblastom».

Srednjoškolsko: 1985. - 1989., Centar za odgoj i obrazovanje u kulturi, Zagreb

Završeni tečajevi

- 2006. – Specijalistički tečaj: Analiza molekularne raznolikosti. Voditelj: prof.dr.sc. Zlatko Šatović, Zavod za sjemenarstvo, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Organizator: Hrvatsko botaničko društvo, Zagreb (4. – 6. listopada)
- 2003. – 2004. – Aktivno učenje i kritičko mišljenje u visokoškolskoj nastavi. Međunarodni projekt Reading and writing for critical thinking – RWCT (Čitanje i pisanje za kritičko mišljenje). Nositelj projekta: nevladina udruga *Forum za slobodu odgoja*. Zagreb, Hrvatska (8 radionica)
- 2002. - A training course: Microsatellites, mitochondrial DNA and conservation genetics. Principles and applications. Voditelj: Dr.Stephan M. Funk, Institute of Zoology, Zoological Society of London. Mjesto održavanja: Zavod za animalnu fiziologiju, PMF, Zagreb, Hrvatska (25. – 27. veljače)
- 1998. – ICLAS/FELASA Educational Programme on Laboratory Animal Science in Central Europe, Budimpešta, Mađarska (12. – 23. siječnja)

Znanstveno usavršavanje

- 2001 (jedan mjesec) - Institute of Zoology, Zoological Society of London, London, Velika Britanija, kod Stephan Funka, PhD, u sklopu ALIS (Academics Links and Interchange Scheme) projekta «Conservation genetics of large Carnivores of Croatia», financiranog od The British Council Croatia i Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske
- 2001 (tri mjeseca) – Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Ozzano dell'Emilia (Bologna), Italija, kod dr. sc. Ettore Randija, stipendija Ministero degli affari esteri, Direzione generale delle relazioni culturali, Rim, Italija
- 2000 (dva mjeseca) – Institute of Zoology, Zoological Society of London, London, Velika Britanija, kod Dr Kate Byrne, stipendija zaklade British Scholarship Trust

- 1999 (tri mjeseca) – Institute of Zoology, Zoological Society of London, London, Velika Britanija, kod Dr Kate Byrne, stipendija European Molecular Biology Organization
- 1995 (tri mjeseca) – Laboratory of Comparative Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, SAD, kod dr.sc. Danice Ramljak

Pomoćni voditelj diplomskog rada

- Ana-Marija Sulić: Određivanje spola nekih vrsta kitova (Cetacea) umnažanjem dijela gena *sry*. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, 2004. (www.vef.hr/dolphins/)
- Nela Nikolić: Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA plavobijelog dupina, *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833), u Jadranskom moru. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, 2006

Voditelj znanstvenog studentskog rada

- Pezer Željka: Određivanje spola dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) i plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) metodom lančane reakcije polimerazom. Studentski rad nagrađen Rektorovom nagradom 2003. god. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, 2003. (www.vef.hr/dolphins/)

Aktivnosti u zaštiti prirode

- Autor plakata „S.O.S. - dupini“ (1995)

Popis radova

Ana Galov (rođ. Gomerčić)

Radovi citirani u Current Contents

1. Gomerčić, H., Huber Đ., Gomerčić V., Škrtić D., **Gomerčić A.** and Vuković, S. (1998). Dolphin morbilliviral infection from the Mediterranean sea did not spread into the Adriatic Sea. *Acta Veterinaria Hungarica* 46 (1), 127-134
2. Lucchini, V., **Galov, A.** and Randi, E. (2004). Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Molecular Ecology* 13 (3), 523-536.
3. **Galov, A.**, Byrne, K., Đuras-Gomerčić, M., Gomerčić, T., Nushol, Z., Vincek, D., Kocijan, I., Tadić, Z., Benković, V., Bašić, I and Funk, S. M. (2005). Effectiveness of nine polymorphic microsatellite markers in parentage testing in Posavina, Croatian Coldblood and Lipizzaner horse breeds in Croatia. *Livestock Production Science* 93, 277-282.
4. Gomerčić, H., Đuras Gomerčić, M., Gomerčić, T., Lucić, H., Dalebout, M., **Galov, A.**, Škrtić, D., Čurković, S., Vuković, S. and Huber, Đ. (2006). Biological aspects of Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) recorded in the Croatian part of the Adriatic Sea. *European Journal of Wildlife Research* 52: 182-187.
5. Šeol, B., Đuras Gomerčić, M., Naglič, T., Gomerčić, T., **Galov, A.** and Gomerčić, H. (2006). Isolation of *Clostridium tertium* from the Striped Dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in the Adriatic Sea. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 709-711

Radovi citirani u Biological Abstract

1. Bašić, I., Tadić, Z., Lacković, V. and **Gomerčić, A.** (1997). Stress syndrome: Ryanodine receptor (RYR1) gene in malignant hyperthermia in humans and pigs. *Periodicum biologorum* 99 (3), 313-317.
2. Gomerčić, H., Huber, Đ., Gomerčić, V., Vuković, S., Škrtić, D., Gomerčić, T., Dobranić, V., Lucić, H., Đuras, M., Čurković, S., **Gomerčić, A.** and Kardoš, Lj. (2000). Fatty liver and subcutaneous edema in a free-living bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*, Montagu 1821) from the Adriatic Sea; light- and electron-microscopical study. *Veterinarski arhiv* 70 (5), 259-277.

Ostali radovi

1. Lacković, V., **Gomerčić, A.**, Tadić, Z., Vitković, A., Sušić, V., Balenović, T., Sabo, D., Bašić, I. (1998). Utvrđivanje statusa gena za malignu hipertermiju u farmskom uzgoju svinja u Hrvatskoj. *Stočarstvo* 52 (3), 163-169.

Kongresna priopćenja

1. Gomerčić, H., Huber, Đ., Gomerčić, T., **Gomerčić, A.**, Škrtić, D. i Vuković, S (1994). Plavobijeli dupin (*Stenella caeruleoalba*, Meyen 1833) godine 1991. po prvi puta nađen u Jadranu. Zbornik sažetaka priopćenja petog Kongresa biologa Hrvatske, Pula, Hrvatska, 3. – 7. listopada 1994. str. 340-341.
2. Gomerčić, H., Gomerčić, V., Vuković, S., Škrtić, D. i **Gomerčić, A.** (1994). Akutno toksično djelovanje žive, olova I kadmija na kamenu kozicu (*Palaemon squilla*, L.) iz čistog mora. Zbornik sažetaka priopćenja petog Kongresa biologa Hrvatske, Pula, Hrvatska, 3. – 7. listopada 1994. str. 361-362.
3. Gomerčić, H., Gomerčić, T., **Gomerčić, A.**, Huber, Đ., Škrtić, D. i Vuković, S. (1996). Samotni dobri dupin (*Tursiops truncatus*) u bakarskoj luci. Znanstveno savjetovanje, Prirodoslovna istraživanja riječkog područja, Rijeka, 23. - 26. 10. 1996., p. 53.
4. **Gomerčić, A.**, Gomerčić, T. and Stipetić, K. (1996). The Research of Marine Mammals in Croatia. Proceedings of The International Veterinary Students' Association Winter Symposium. Zagreb, Croatia, 28 December – 5 January 1996, p. 17-19.
5. Vuković, S., **Gomerčić, A.**, Pišl, Z., Škrtić, D., Jurković, S. i Gomerčić, H. (1997). Međuodnos veličine lubanje i tijela jadranskog dobrog dupina (*Tursiops truncatus*, Montagu 1821). Zbornik sažetaka priopćenja šestog Kongresa biologa Hrvatske, Opatija, Hrvatska, 22. – 26. rujna 1997., str. 153-154.
6. Tadić Z., Nikolić T., **Gomerčić A.**, Lacković V., Vitković A., Bosnić P. i Bašić I. (1998). Istraživanje varijabilnosti morfometrijskih značajki hrvatskih hladnokrvnih konja, te njihova primjena u uzgoju i procjeni biološke raznolikosti. XXXIV. znanstveni skup hrvatskih agronoma s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka. Opatija 25.-28. 2. 1998, str. 327.
7. Gomercic, H., Huber, D., **Gomercic, A.**, and Gomercic, T. (1998). Geographical and historical distribution of the cetaceans in Croatian part of the Adriatic Sea. Rapport du 35e Congres de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée. CIESM Congress Proceedings, Dubrovnik, Croatia, 35 (2), p. 440-441.
8. **Gomerčić, A.**, Bašić, I., Tadić, Z., Lacković, V., Gomerčić, T., Đuras, M. i Byrne, K. (2000). Varijabilnost 12 mikrosatelitskih lokusa u konja pasmine hrvatski posavac. Zbornik sažetaka priopćenja sedmog Hrvatskog biološkog kongresa. Hvar, 24. – 29. 9. 2000., str.341-342.
9. Gomercic, H., Curas, M., Lucic, H., Gomercic, T., Huber, C., Ckrtic, D., Curkovic, S., **Galov, A.** and Vukovic, S. (2002). Cetacean mortality in Croatian part of the Adriatic Sea in period from 1990 till February 2002. Abstracts of 9th International Congress on the Zoogeography and Ecology of the Greece and Adjacent Regions (ICZEGAR), Thessaloniki, Greece, 22.-25.5.2002., p. 42.
10. Jemeršić, L., Tomašković, I., Keros, T., Mikulić, B., Tadić, Z., **Galov, A.**, Lojkić, M. i Bašić, I. (2003). Utvrđivanje očinstva goveda u Hrvatskoj primjenom analize DNK. Zbornik radova IV. Srednjoeuropskog bujatričkog kongresa, Lovran, Hrvatska, 23. – 27. travnja 2003, str. 323-327.

11. Gomerčić, H., Dalebout, M., **Galov, A.**, Đuras Gomerčić, M., Gomerčić, T., Lucić, H., Škrtić, D., Čurković, S., Vuković, S. i Huber, Đ. (2003). Krupnozubi dupin (*Ziphius cavirostris*) prvi puta nađen u Hrvatskom Jadranu. Zbornik sažetaka priopćenja osmog Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, 27. rujna – 2. listopada 2003., str. 252-253.
12. Pezer, Ž., Tomašković, I., **Galov, A.**, Đuras Gomerčić, M., Gomerčić, T., Tadić, Z., Bašić, I. i Gomerčić, H. (2003). Određivanje spola u nekih vrsta kitova (Cetacea) pomoću lančane reakcije polimerazom. Zbornik sažetaka priopćenja osmog Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, 27. rujna – 2. listopada 2003. str. 269-271.
13. Tomašković, I., **Galov, A.**, Kusak, J., Bašić, I., Huber, Đ. i Funk, S. (2003). Upotreba molekularnih biljega u određivanju veličine populacije vukova u Gorskom kotaru – preliminarno istraživanje. Zbornik sažetaka priopćenja osmog Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, 27. rujna – 2. listopada 2003. str. 398-399.
14. **Galov, A.**, Kusak, J., Tomašković, I., Huber, Đ. i Funk, S. (2003). Metode prikupljanja i spremanja uzoraka izmeta vukova (*Canis lupus*) za genetička istraživanja. Zbornik sažetaka priopćenja osmog Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Zagreb, 27. rujna – 2. listopada 2003. str. 416-417.
15. Gomerčić, T., Đuras Gomerčić, M., Gomerčić, H., Škrtić, D., Čurković, S., Lucić, H., **Galov, A.**, Vuković, S. i Huber, Đ. (2004). Vrste, brojnost i rasprostranjenost morskih sisavaca u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Zbornik radova 1. hrvatsko-slovenskog simpozija o egzotičnim i divljim životinjama, Hrvatsko veterinarsko društvo. Zagreb, 25. -27. studenog, 2004. str. 16.
16. Gomerčić T., Gottstein Ž., Sadarić I., Sadarić J., Đuras Gomerčić M., **Galov A.** i Huber Đ. (2006) Kontrolna regija mitohondrijske DNA euroazijskog risa (*Lynx lynx*) iz Hrvatske. Zbornik sažetaka priopćenja devetog Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Rovinj, 23. – 29. rujna 2006. str. 217-219.
17. Pađen L., Maurić M., Gomerčić T., Gottstein Ž., Đuras Gomerčić M., **Galov A.**, Kusak J. i Huber Đ. (2006) Genetska razlika vuka i psa usporedbom kontrolnih regija mitohondrijske DNA. Zbornik sažetaka priopćenja devetog Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Rovinj, 23. – 29. rujna 2006. str. 230 – 232.
18. **Galov A.**, Lauc G., Gomerčić T., Kocijan I., Đuras Gomerčić M., Bašić I. i Gomerčić H. (2006) Genetička raznolikost dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) iz hrvatskog dijela Jadranskog mora mjerena analizom mikrosatelitskih lokusa. Zbornik sažetaka priopćenja devetog Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Rovinj, 23. – 29. rujna 2006. str.293 – 295.
19. Nikolić N., **Galov A.**, Gomerčić T., Đuras-Gomerčić M., Kocijan I., Bašić I. i Gomerčić H. (2006) Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) iz hrvatskog dijela Jadranskog mora – preliminarno istraživanje. Zbornik sažetaka priopćenja devetog Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Rovinj, 23. – 29. rujna 2006. str. 313 – 315.

20. Kocijan I., Nenadić D. D., Sušić G., Đuras Gomerčić M., **Galov A.**, Tadić Z. i Bašić I. (2006) Određivanje spola u vrste bjeloglavi sup (*Gyps fulvus*, Hablizl, 1783.) lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Zbornik sažetaka priopćenja devetog Hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem. Rovinj, 23. – 29. rujna 2006., dodatak