

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martina Pauk

**Određivanje slijeda kontrolne regije mitohondrijske
DNA dobrog dupina *Tursiops truncatus*
(Montagu, 1821)**

Diplomski rad

Zagreb, 2007. godina

Ovaj rad, izrađen, u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta “Zdravstvene i ostale biološke osobitosti sisavaca Jadranskog mora” (0053317, glavni istraživač H. Gomerčić) Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske i uz Dopuštenje Ministarstva kulture Republike Hrvatske te uz financijsku pomoć Gesellschaft zur Rettung der Delphine e. V. (GRD) iz Münchena, pod vodstvom prof.dr.sc. Hrvoja Gomerčića (Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu), u laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc. dr.sc. Dubravke Hranilović i dr. sc. Ane Galov, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

Najljepše zahvaljujem prof.dr.sc. Hrvoju Gomerčiću na pruženoj prilici za rad i stjecanje iskustva na ovom Projektu i doc.dr.sc. Dubravki Hranilović na stručnom vodstvu. Veliko hvala dr.sc. Ani Galov na savjetima i nesebičnoj pomoći bez koje ne bih uspjela. Također zahvaljujem Gordani Žakman na susretljivosti i pomoći pri radu. Ovaj rad posvećujem obitelji.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Određivanje slijeda kontrolne regije mitohondrijske DNA dobrog dupina *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821)

Martina Pauk

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

Sažetak

Dobri dupin (*Tursiops truncatus*) je jedina vrsta morskog sisavca koja stalno nastanjuje hrvatski dio Jadranskog mora. U svrhu istraživanja genetičke raznolikosti ove populacije ispitivana je kontrolna regija mtDNA koja služi kao koristan genetski biljeg u filogenetskim istraživanjima na razini vrste. U sklopu ovog istraživanja dizajnirana je unutrašnja nizvodna početnica nazvana „DUPr“. Istraživanje je provedeno na 24 uzorka mišićnog tkiva dobrog dupina. Iz tkiva je izolirana ukupna genomska DNA. U lančanoj reakciji polimerazom (PCR) korištene su početnice MTCRf i DUPr, čime je uspješno umnožen dio kontrolne regije mtDNA dugačak oko 900 parova baza (pb). Pročišćeni PCR proizvodi su sekvencirani uporabom DUPr početnice s 3' kraja kontrolne regije i dobiveni su sljedovi veličine 679 pb. Provedeno je sravnjenje parova uzoraka sa sljedovima dobivenim s početnicom MTCRf nakon čega je slijed za daljnju analizu povećan na 767 pb. Utvrđeno je postojanje 5 haplotipova s 23 varijabilna mjesta.

(38 stranica, 10 slika, 3 tablice, 44 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: dobri dupin / *Tursiops truncatus* /kontrolna regija mtDNA

Voditelj: Prof.dr.sc. Hrvoje Gomerčić
Suvoditelj: Doc.dr.sc. Dubravka Hranilović
Pomoćni voditelj: Dr.sc. Ana Galov

Ocjenitelji: Prof.dr.sc. Hrvoje Gomerčić
Doc.dr.sc. Dubravka Hranilović
Doc.dr.sc. Božena Mitić
Mr.sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen : 12. rujna 2007.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

**Sequencing of mitochondrial DNA control region of bottlenose
dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821)**

Martina Pauk

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

Abstract

The bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) is the only resident marine mammal species in Croatian part of the Adriatic Sea. Studies of mitochondrial control region diversity are invaluable in research of genetic variety and population structure. Internal reverse primer was designed and named „DUPr“. Total genomic DNA was isolated from 24 bottlenose dolphin muscle tissues. Polymerase chain reaction with forward MTCRf and reverse DUPr primers yielded around 900 bp long fragment of mtDNA control region. Purified PCR products were sequenced with reverse DUPr primer and the resulting sequences were 679 base pair long. These sequences were aligned with sequences obtained with forward MTCRf primer and final fragments were 767 bp long. Further analysis was performed on 767 bp fragments and 5 unique haplotypes were identified with 23 polymorphic sites.

(38 pages, 10 figures, 3 tables, 44 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: bottlenose dolphin / *Tursiops truncatus* / mitochondrial DNA control region

Supervisor: Dr. Hrvoje Gomerčić, Prof.

Co-supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Asst. Prof.

Assistent supervisor: Dr.sc. Ana Galov

Reviewers: Dr. Hrvoje Gomerčić, Prof.

Dr. Dubravka Hranilović, Asst. Prof.
Dr. Božena Mitić, Asst. Prof.
M.S. Jasna Lajtner

Thesis accepted : 12 September 2007.

SADRŽAJ:

1. UVOD	10
1.1. Dobri dupin (<i>Tursiops truncatus</i>).....	11
1.1.1. RASPROSTRANJENOST	12
1.1.2. UGROŽENOST I ZAŠTITA DOBROG DUPINA	14
1.1.3. ISTRAŽIVANJA U JADRANU	15
1.2. Mitohondrijska DNA.....	16
1.2.1. METODA SEKVENCIRANJA mtDNA	17
1.2.2. POSTUPAK DIZAJNIRANJA POČETNICE	18
1.3. Cilj istraživanja	20
2. MATERIJALI I METODE	22
2.1. Materijali	23
2.1.1. UZORCI DOBROG DUPINA	23
2.1.2. KEMIČALIJE I PUFERI	24
2.1.3. KOMPLETI.....	24
2.1.4. PRIBOR	25
2.2. Metode.....	25
2.2.1. IZOLACIJA DNA.....	25
Ukupnu DNA sam izolirala korištenjem kompleta – Wizard Genomic DNA Purification Kit (prilagođen protokol).....	25
2.2.2. DIZAJNIRANJE POČETNICE	26
2.2.4. ELEKTROFOREZA NA AGAROSNOM GELU.....	28
2.2.5. PROČIŠĆAVANJE PCR PROIZVODA	29
2.2.6. SEKVENCIRANJE KONTROLNE REGIJE MITOHONDRIJSKE DNA I ANALIZA	29
DOBIVENIH SLJEDOVA	29
3.1. Unutrašnja nizvodna početnica	31
3.2. Umnožene kontrolne regije na agaroznom gelu.....	33
3.3. Sljedovi kontrolne regije mitohondrijske DNA	33

3.3.1. ANALIZA SLJEDOVA.....	34
4. RASPRAVA	38
5. ZAKLJUČAK	40
6. LITERATURA.....	42

POPIS KRATICA

DNA	deoksiribonukleinska kiselina
mtDNA	mitohondrijska DNA
PCR	lančana reakcija polimerazom
UNEP	Program Ujedinjenih naroda za okoliš (United Nations Environment Programme)
ACCOBAMS	Sporazum o zaštiti kitova (Cetacea) u Crnom moru, Sredozemnom moru i susjednom atlantskom području (Agreement on the conservation of cetaceans of the Black Sea, Mediterranean Sea and contiguous Atlantic Area)
pb	parovi baza
Tm	temperatura denaturacije (razdvajanja) DNA lanaca
Ta	temperatura nalijeganja početnica

1. UVOD

1.1. Dobri dupin (*Tursiops truncatus*)

Opažanja i bilježenje pojavljivanja kitova u Jadranu datiraju od sredine 19. stoljeća pa i ranije. U Jadranu su do sada zabilježene ove vrste kitova: obični dupin - *Delphinus delphis* Linnaeus, 1758, dobri dupin - *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), glavati dupin - *Grampus griseus* (Cuvier, 1812), obalni dupin - *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758), crni dupin - *Pseudorca crassidens* (Owen, 1846), plavobijeli dupin - *Stenella coeruleoalba* (Mayen, 1833), krupnozubi dupin - *Ziphius cavirostris* Cuvier, 1823, veliki sjeverni kit - *Balaenoptera physalus* (Linnaeus, 1758), glavata ulješura - *Physeter catodon* Linnaeus, 1758, sjeverna kljunata ulješura - *Hyperoodon ampullatus* (Forster, 1770), bjelogrli dupin - *Globicephala melas* (Traill, 1809), patuljasti kit - *Balaenoptera acutorostrata* Lacépède 1804 i crni ledni kit - *Eubalaena glacialis* (Müller, 1776).



Slika 1: Dobri dupin u blizini otoka Iža

Među svim ovim vrstama samo su obični i dobri dupini bili pravi stalni stanovnici Jadrana (Gomerčić i sur. 1998). Danas, jedina vrsta morskog sisavca koja stalno nastanjuje Jadransko

more je dobri dupin - *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). Klasificira se kao: Mammalia - sisavci, Cetacea - kitovi, Odontoceti - kitovi zubani, Delphinidae - šiljatozubi dupini, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) - dobri dupin. Ostale vrste kitova samo ponekad zalutaju i povremeno borave u Jadranskom moru.

Dobri dupini su vrlo društvene životinje. Žive u skupinama različite veličine i sastava, ovisno o dobi, spolu, reproduktivnom statusu i obiteljskim odnosima.

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), s tim da su mužjaci veći za 10-20 cm od ženki, dok mladunče teži 12 do 15 kg i duljine je 1 do 1,3 m nakon rođenja (Nishiwaki 1972). Vrlo su mobilni i mogu prijeći velike udaljenosti, čak i do 1000 km (Wood 1998, Wells i sur. 1999). Postižu brzinu i preko 30 km/h (Fish 2002). Ženke spolno sazrijevaju između 5. i 12. godine, a mužjaci između 9. i 12. godine života.

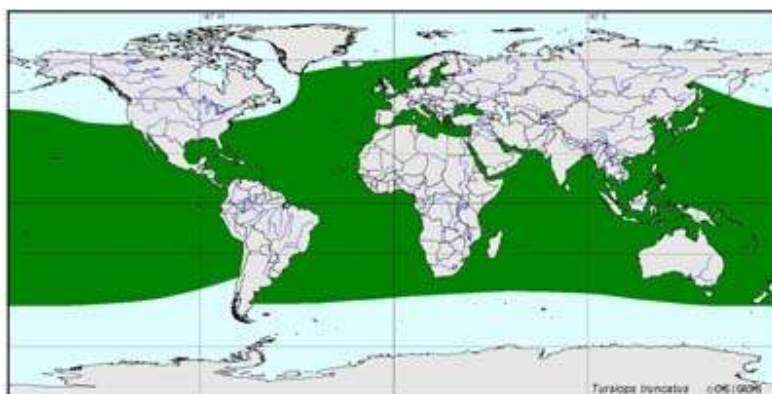
Kao član podreda kitova zubana, dupini imaju razvijeno zubalo kojim se služe prilikom lova na plijen. Pretežno se hrane ribom na dnu, manjim pelagičkim vrstama plave ribe te u manjoj mjeri glavonošcima, mekušcima i rakovima. Dobri dupini u potrazi za ribom obično ostaju pod morem 4-5 minuta.

1.1.1. RASPROSTRANJENOST

Dobri dupin je vjerojatno najbolje poznata i jedna od najrasprostranjenijih vrsta u porodici Delphinidae. Spadaju u društvene vrste s veoma širokom distribucijom na obje hemisfere, od hladnih temperatura sve do tropskih voda, uključujući Tih, Indijski i Atlantski ocean (Rice 1998) (Slika 2).

Postoje mnoge procjene veličine populacije dobrog dupina pojedinih regija, no ne postoji procjena veličine svjetske populacije (Baird i sur. 1993). Veličina populacije dobrih dupina u hrvatskom dijelu Jadranskog mora procjenjuje se na 220 do 250 jedinki (Gomerčić i sur. 2002, Gomerčić i sur. 2004a).

Zbog izuzetne prilagodljivosti omogućeno im je naseljavanje širokog spektra staništa. Općenito, naseljavaju dublja područja mora i oceana, te priobalne i pliće vode, riječna ušća, zaljeve, lagune, estuarije, te mogu ulaziti i u rijeke. Staništa se mogu razlikovati u temperaturi vode, dubini, raznolikosti plijena. Diferencijalno korištenje ovih staništa može biti posljedica specijalizacije temeljene na jednoj ili više karakteristika staništa.



Slika 2: Rasprostranjenost dobrog dupina (preuzeto i modificirano od Wells i Scott 2002).

S obzirom na heterogenost staništa koja naseljavaju, prisutne su morfološke varijacije između regija, gdje se morfotipovi razlikuju u uzorku boje, tjelesnim dimenzijama i strukturi lubanje (Walker 1981, Ross i Cockcroft 1990). Postoji jasna razlika između populacija obalnih i pelagičkih staništa. Obalne i pelagičke populacije ponekad se razlikuju u morfologiji, izboru plijena i parazitima (Mead i Potter 1995, Hoelzel 1998a), ali razlika varira između geografskih regija (Walker 1981, Mead i Potter 1995).

Poznata su dva morfološka tipa dobrih dupina – pelagički (pučinski), vezan za otvoreni ocean te priobalni, koji je manji i pokazuje vezanost uz područje u kojem obitava tvoreći zajednice različitih veličina.

U hrvatskom dijelu Jadranskog mora, međutim, postoji samo jedan morfološki tip dobrog dupina (Đuras Gomerčić 2006).

1.1.2. UGROŽENOST I ZAŠTITA DOBROG DUPINA

Glavni razlog ugroženosti dupina danas je veliki utjecaj čovjeka na njihova staništa – onečišćenje okoliša, ribarske mreže, prekomjerni izlov ribe, nestajanje prirodnih staništa, pretjerana uporaba pesticida, te pojava masovnog turizma. Time se ne smanjuje samo broj ovih dupina već se uništava i smanjuje njegov potencijalni životni prostor. 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 zaštićen je prema Zakonu o zaštiti prirode (NN 70/05) te Pravilniku o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 07/06). Prema Pravilniku o visini naknade štete prouzročene nedopuštenom radnjom na zaštićenim životinjskim vrstama (NN 84/96) novčana kazna za ubijanje jedinke vrste *Tursiops truncatus* iznosi 35 000,00 Kn.

Svi kitovi koji se zateknu u Jadranu zaštićeni su prema Zakonu o zaštiti prirode (NN 70/05), Pravilniku o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 07/06), te međunarodnoj konvenciji ACCOBAMS koje je i Hrvatska potpisnik. Prema Pravilniku o visini naknade štete prouzročene nedopuštenom radnjom na zaštićenim životinjskim vrstama (NN 84/96) novčana kazna za ubijanje bilo kojeg kita iznosi 40 000,00 Kn.

Dobri dupini u Jadranu su suočeni s više uzroka ugroženosti, s obzirom na malu površinu i zatvorenost Jadranskog mora, te velik pritisak stanovništva i turista tijekom ljetnih mjeseci. Različite toksične tvari koje dolaze s kopna se nakupljaju u velikim količinama u tkivima dupina te imaju dugoročan učinak na populaciju (smanjenje reproduktivne sposobnost, povećana smrtnost mladunaca, smanjenja imuniteta i pojave bolesti, parazitskih infekcija te patoloških promjena na organima). Prekomjeren ulov morskih organizama koji im služe za prehranu predstavlja veliku prijetnju. Zvuk je također jedan od zagađivača životnog prostora jer se većina zvukova koje proizvode čamci, gliseri ili brodovi preklapa s frekvencijama koje koriste dupini, što dovodi do otežane komunikacije i snalaženja. Degradacija staništa (povezana s kočarenjem, izgradnjom u priobalju itd.), slučajni ulov u mreže i namjerno ubijanje, te plutajući otpad (prvenstveno plastika), daljnji su uzroci ugroženosti.

1.1.3. ISTRAŽIVANJA U JADRANU

Početakom 80-tih godina dvadesetog stoljeća pokrenut je rad na istraživanju i zaštiti morskih sisavaca u Jadranu koji provodi Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekata „Istraživanje i zaštita morskih sisavaca Jadranskog mora“ i „Istraživanje sisavaca Jadranskog mora“ te radova na UNEP-ovim projektima. Godine 2000. pokrenut je projekt „Spašavanje posljednjih jadranskih dupina“ od strane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i njemačkog Društva za spas dupina (Gesellschaft zur Rettung der Delphine e. V. (GRD) München) pod pokroviteljstvom Ministarstva zaštite okoliša i prostornog uređenja Republike Hrvatske. Gomerčić i sur. (1998) su utvrdili da u zimskom periodu na 31.660 km² hrvatskog dijela Jadrana živi 218 dobrih dupina (202 odrasle jedinke i 16 mladunaca) u 40 jata. Izračunat je prosječan broj od 5,5 dupina u pojedinom jatu. Samo jedno jato dobrih dupina je nađeno u otvorenim vodama, dok su ostala viđena u unutarnjim vodama ili manje od 5 km od obale. Prebrojavanje jata i pojedinih jedinki je provedeno jednodnevnim letom s 4 mala aviona na visini od 200 m.

U sklopu Jadranskog Projekta Dupin od 1990.-1994. godine u Kvarneriću su u sjevernom dijelu Jadrana metodom foto-identifikacije obrađeni brojčani podaci o dobrim dupinima, gdje je utvrđeno 106 pojedinačno prepoznatih dupina (Bearzi i Notarbartolo di Sciara 1995).

Uz laboratorijski rad na lešinama dupina, obavlja se i terenski rad gdje se iz čamaca ili aviona prebrojavaju viđena jata i jedinke u pojedinom jatu u teritorijalnom moru Republike Hrvatske. U zadnjih 20 godina u Jadranu je stradalo 115 jedinki dupina (desetak ih ne pripada dobrom dupinu) od čega je polovica uginula prirodnom smrću, od posljedica bolesti, a polovica zbog djelovanja čovjeka (Gomerčić 2004b). Podatke o uginulim dupinima u teritorijalnom moru RH prikuplja Veterinarski fakultet u Zagrebu.

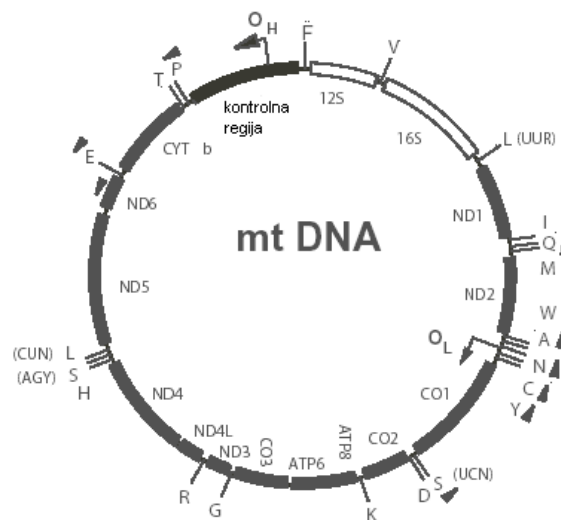
Proučavanjem i identifikacijom živih uzoraka prati se brojnost, prostorna i vremenska rasprostranjenost, reproduktivne sposobnosti, ponašanje i odnos odraslih jedinki i mladunčadi.

Ovaj način promatranja omogućava bolji uvid u način života populacija dobrog dupina, iz čega proizlaze mogući daljnji prijedlozi mjera za zaštitu i preživljavanje vrste u Jadranu.

1.2. Mitohondrijska DNA

Mitohondrijski genom predstavlja tek 0.00055 % ukupnog genoma sisavaca. Dvije glavne razlike između mitohondrijskog i nuklearnog genoma jesu majčinsko nasljeđivanje i haploidnost mitohondrijskog genoma (Ballard i Whitlock 2004).

Mitohondrijska DNA je kružna, dvolančana molekula DNA veličine 15000 – 17000 pb koja kodira 37 gena, od kojih 24 kodiraju za procese translacije mtDNA (22 za tRNA i 2 za rRNA mitohondrijskog ribosoma). Ostatak od 13 gena kodira za proteine uključene u oksidativnu fosforilaciju. Prisutna je i velika nekodirajuća regija koja kontrolira replikaciju i transkripciju, nazvana kontrolna regija (Slika 3).



Slika 3: Mitohondrijska DNA (Arnason i Janke 2002).

Brzina mutacije za mtDNA iznosi 2% na milijun godina tj. 10^{-8} /nukleotidno mjesto/god. (Brown i sur. 1979) što znači da evoluiraju 10 puta brže nego nuklearna DNA. Razlog tome je nedostatak nekih enzima u mitohondriju koji služe za popravak oštećenja, a koji postoje u jezgri. Najveći dio mutacija pripada točkastim mutacijama; kod supstitucija su tranzicije češće od transverzija (Kocher i sur. 1989, Avise 1994).

Dio mitohondrijskog genoma koji najbrže evoluiraju je nekodirajuća kontrolna regija koja sadrži D-petlju, trolančanu strukturu koja nastaje tijekom replikacije. U kontrolnoj regiji čovjeka procjenjuje se da je brzina supstitucije između 2,8 do 5 puta veća od brzine supstitucija ostatka mtDNA (Aquadro i Greenberg 1983, Cann i sur. 1984). Najmanju brzinu supstitucija u mitohondrijskom genomu imaju geni za tRNA i rRNA, dok geni za proteine evoluiraju otprilike dvostruko brže od njih. Duljina kontrolne regije se razlikuje među vrstama, a iznosi od oko 200 do 4100 pb. U kitova je dugačka oko 1000 pb (Hoelzel i sur. 1991, Árnason i sur. 1993).

1.2.1 METODA SEKVENCIRANJA mtDNA

Uporaba mtDNA je sve više zastupljena u filogenetskim i populacijsko genetičkim istraživanjima. Prvotno su korišteni restriksijski enzimi za pronalazak nukleotidnih razlika (Lansman i sur. 1981), a kasnije, s razvojem PCR metodologije i primjenjivosti univerzalnih početnica (Kocher i sur. 1989) je omogućeno umnažanje mtDNA.

Posjedovanjem regija koje evoluiraju različitim brzinama omogućeno je rješavanje filogenetskih problema na različitim taksonomskim razinama (Zhang i Hewitt 1996). Za filogenetska istraživanja na razini 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. 2005).

Molekularne metode najčešće uključuju analizu sljedova mtDNA, a sekvenciranje DNA daje najveću moguću rezoluciju genetičke raznolikosti. Jedna od najčešće upotrebljivanih metoda sekvenciranja DNA je Sangerova ili dideoksi metoda koja se izvodi u automatskim sekvenatorima. Ova tehnika koristi 2',3'-dideoksinukleotid trifosfate koji umjesto OH skupine na 3' C atomu imaju atom vodika, te kad se vežu na lanac ove molekule završavaju proces produljenja lanca jer ne mogu tvoriti fosfodietersku vezu sa slijedećim deoksinukleotidom. Svaki od 4 ddNTPa je označen različitim fluorescencijskim biljekom, te se zbog male koncentracije u reakcijskoj smjesi vežu povremeno i nasumično na lanac DNA. Prvotni korak je denaturacija DNA, nakon čega započinje njeno produljenje djelovanjem DNA polimeraze. Nakon više ponavljanih ciklusa produljenja, rezultat su umnoženi fragmenti DNA različitih

duljina sa fluorescentnom oznakom na kraju lanca. Nastali fragmenti se razdvajaju putem elektroforeze tako da se razlikuju u veličini za jedan nukleotid, te kako označena DNA stiže do dna gela, tako laser detektira fluorescenciju pojedinog lanca tj. označenog ddNTPa. Svaki ddNTP emitira različiti fluorescentni signal, te je njihova prisutnost na kraju lanca zabilježena u računalu gdje program sastavlja podatke u obliku kromatograma pokazujući određenu sekvencu gdje je svaka baza označena različitom bojom.

1.2.2. POSTUPAK DIZAJNIRANJA POČETNICE

Jedan od najvažnijih čimbenika za uspješno sekvenciranje DNA je pravilan dizajn početnice. Početnica je kratak sintetizirani oligonukleotid koji se koristi u mnogim molekularnim metodama. Izabiru se tako da prepoznaju određen slijed nukleotida u DNA koja služi kao kalup na koji djeluje DNA polimeraza i umnaža željeni dio lanca (Slika 4).



Slika 4: Prikaz vežanja početnice na ciljno mjesto na lancu DNA

Dizajnirane su početnice za istraživanje kontrolne regije 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 (Hoelzel i

sur. 1991). To su univerzalne početnice, uzvodna MTCRf i nizvodna MTCRr, za umnažanje kontrolne regije mtDNA u sisavaca i ptica (Hoelzel i Green 1998).

Prilikom sinteze početnice treba uzeti u obzir pravila za dizajn (Innis i Gelfand, 1990):

1. početnice bi trebale biti veličine 17-28 nuleotida
2. sadržaj G-C parova bi se trebao kretati oko 50-60%
3. na 3' kraju početnice preferira se G ili C dušična baza
4. temperatura denaturacije (T_m) bi se trebala kretati između 55-80°C
5. ako se na 3' kraju početnice nalaze ≥ 3 C ili G dušičnih baza, može doći do pogrešnog vezanja početnice na području bogatog G-C parovima
6. 3' krajevi početnica ne smiju biti komplementarni jer će inače doći do stvaranja dimera početnica
7. treba izbjegavati komplementarnost početnice samoj sebi koja može dovesti do stvaranja sekundarnih struktura kao što su ukosnice

Optimalna dužina početnice ovisi o sadržaju (A+T) i temperaturi denaturacije (T_m) te treba uzeti u obzir složenost početnica da bi vjerojatnost prijanjanja na one sekvence koje nisu ciljno mjesto bila vrlo niska. T_m možemo izračunati iz formule:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$$

Temperatura nalijeganja (T_a) početnice na lanac DNA u lančanoj reakciji polimerazom ovisi direktno o dužini i sastavu početnice. U pravilu bi trebala biti za oko 5°C ispod najniže temperature denaturacije (T_m) početnica koje se koriste za PCR (Innis i Gelfand, 1990). Jedna od posljedica preniske temperature nalijeganja je prijanjanje jedne ili obje početnice na sljedove koji ne predstavljaju ciljno mjesto što može dovesti do nespecifične amplifikacije i neželjenih produkata, dok previsoka T_a dovodi do malog broja produkata kao i smanjene vjerojatnosti vezanja početnica na DNA kalup. Mora se uzeti u obzir da par početnica s vrlo različitom T_a vjerojatno neće dati značajne rezultate te također mogu rezultirati asimetričnom amplifikacijom. Većini početnica je potrebno svega 30 sekundi ili manje za vezanje na lance DNA.

Temperatura produženja lanaca se kreće oko 70 - 72°C. Proces produljivanja lanca započinje odmah nakon vezanja početnice i na 70°C iznosi i do 100 baza po sekundi. Samo jedna minuta je

potrebna za povećanje lanca za 2 kb (kilobaza) sekvence (Innis i Gelfand 1990), dok veći produkti zahtijevaju više vremena. Prilikom dizajna početnice treba uzeti u obzir da položaj željene sekvence pada u najtočniju regiju u kromatogramu. Najpouzdanije sekvence se nalaze na udaljenosti oko 80 – 150 nukleotida od početnice, dok sekvence dobivene vrlo daleko od početnice nisu pouzdane.

1.3. Cilj istraživanja

Iako je dobri dupin jedina trajno nastanjena vrsta morskog sisavca u Jadranu, prvo istraživanje raznolikosti sljedova kontrolne regije mtDNA provedeno je tek 2007. godine (Galov 2007). U svojoj disertaciji dr. sc. Galov je analizirala sljedove kontrolne regije mtDNA dobrih dupina dugačke 470 pb, te je unutar 27 jedinki utvrdila postojanje pet haplotipova. Međutim, haplotip D3 se značajno razlikovao od ostalih haplotipova, te je autorica izrazila sumnju u njegovu ispravnost.

Cilj ovog istraživanja je provjeriti ispravnost upitnih sljedova uzoraka haplotipa D3 dobivenih u disertaciji Galov (2007). Za to je potrebno:

1. dizajnirati novu unutrašnju početnicu s 3'-kraja kontrolne regije
2. provesti PCR reakcije korištenjem MTCRf i nove unutrašnje početnice
3. sekvencirati PCR proizvode nastale korištenjem nove unutrašnje početnice. Korištenje novo-dizajnirane početnice biti će posebno važno za određivanje slijeda uzoraka kod kojih je sekvenciranje dužih fragmenata, nastalih korištenjem početnica MTCRf i MTCRr dalo dvojbene rezultate.
4. odrediti sljedove kontrolne regije mitohondrijske DNA dobrih dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora dužine veće od 470 pb, koji su dobiveni sekvenciranjem s 5'-kraja, korištenjem MTCRf početnice u disertaciji Galov (2007), te na osnovu pronađenih varijabilnih mjesta svrstati uzorke u različite haplotipove.

U daljnjim istraživanjima će na osnovu varijabilnosti mtDNA biti moguće ustanoviti sličnosti i razlike populacije dobrog dupina u Jadranu s populacijama u svjetskim morima, utvrditi u

kolikoj mjeri je jadranska populacija izolirana od ostalih u Mediteranu, te na osnovu toga predložiti daljnje mjere zaštite ove vrste u Jadranu kao potencijalnog izvora bioraznolikosti u budućnosti.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. UZORCI DOBROG DUPINA

Koristila sam 22 uzorka mišićnog tkiva dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) s lešina pronađenih na obali Jadranskog mora, te dva uzorka dobivena iz “The Israel Marine Mammal Research and Assistance Center“, Haifa, Izrael (Tablica 1). Uzorci su bili pohranjeni u epruvetama s 70%-tnim alkoholom na - 20°C, a prikupljeni su od 1997. do 2003. godine.

Tablica 1: Podaci o uzorcima

jedinka	spol	masa / kg	starost /god.	datum nalaza	mjesto nalaza
20	ž	214	21	08.10.1997.	Pirovac
22	m		3	17.03.1998.	Kanica pokraj Rogoznice
28	m	249	16	09.07.1999.	Split
32	m	128	3	01.11.1999.	Rovinj
38	ž	261	21	12.01.2000.	Rijeka Zrmanja
41	ž	224	12	27.04.2000.	Milna, Hvar
46	ž	24	1	03.07.2000.	južno od uvale Miholjašćice, Cres
51	ž		21	15.02.2001.	mjesto Ugljan
55	ž	62	2	23.03.2001.	grad Hvar
57	ž		7	11.04.2001.	Novigrad
64	m	305	17	09.10.2001.	Novigrad, Istra
80	m	324	17	01.03.2002.	Kukljica, Ugljan
87	ž	79	5	16.04.2002.	Žrnovska Banja, Korčula
91	ž	246	13	11.07.2002.	uvala Dalje, Novigrad, Istra
93	ž	65	mladunče	05.08.2002.	Luka, Dugi otok
95	ž	40	mladunče	13.08.2002.	Zaglav, Dugi otok
101	m	98	5	31.10.2002.	Split
102	ž	216	20	24.12.2002.	ušće Mirne, Istra
104	m	210	20	17.07.2003.	između Cresa i Rapca
108	ž	209	17	06.10.2003.	Pirovac
111	ž	130	10	30.11.2003.	Preko, Ugljan
B1	ž			26.06.2003.	između Iža i Sestrinja
DO98					Izrael
PA98					Izrael

2.1.2. KEMIKALIJE I PUFERI

- Nuclei Lysis Solution
- proteinaza K
- Protein Precipitation Solution
- izopropanol (Kemika, Zagreb)
- 70 % -tni etanol (Kemika, Zagreb)
- DNA Rehydration Solution
- 10x smjesa početnica: 2 μ l MTCRf, konačna koncentracija 2 μ M
2 μ l DUPr, konačna koncentracija 2 μ M
96 μ l H₂O, deionizirana
- agaroz: Certified™ PCR Agarose (Bio-Rad, SAD)
- 5x TBE pufer: 54 g Tris, 27,5 g borna kiselina, 20 mL 0,5 M EDTA, pH 8, H₂O, deionizirana (do 1 litre)
- Loading Buffer 2x: 0,25 % bromfenol plavilo, 0,25 % ksilencijanil fluorofosfat, 15 % fikol
- otopina etidij bromida koncentracije 0,5 μ g/ml u 0,5x TBE puferu
- Membrane Binding Solution: 4,5 M guanidin izotijocijanat i 0,5 M kalijev acetat, pH 5
- Membrane Wash Solution
- Nuclease-Free Water
- marker: 100 pb DNA Ladder - 10 fragmenata veličine od 100-1000 pb i fragment od 1500 pb (Promega)

2.1.3. KOMPLETI

- Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, SAD
- QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN GmbH, Germany)

2.1.4. PRIBOR

- Centrifuge 5415C proizvođača Eppendorf (Njemačka)
- Uređaj za lančanu reakciju polimerazom, GeneAmp[®] PCR System 2700 proizvođača Applied Biosystems (SAD)
- Uređaj za elektroforezu, BIO-RAD, SUB-CELL[®] GT
- mikropipete: Labopette[®] Hirschmann[®] Laborgerate

2.2. Metode

2.2.1. IZOLACIJA DNA

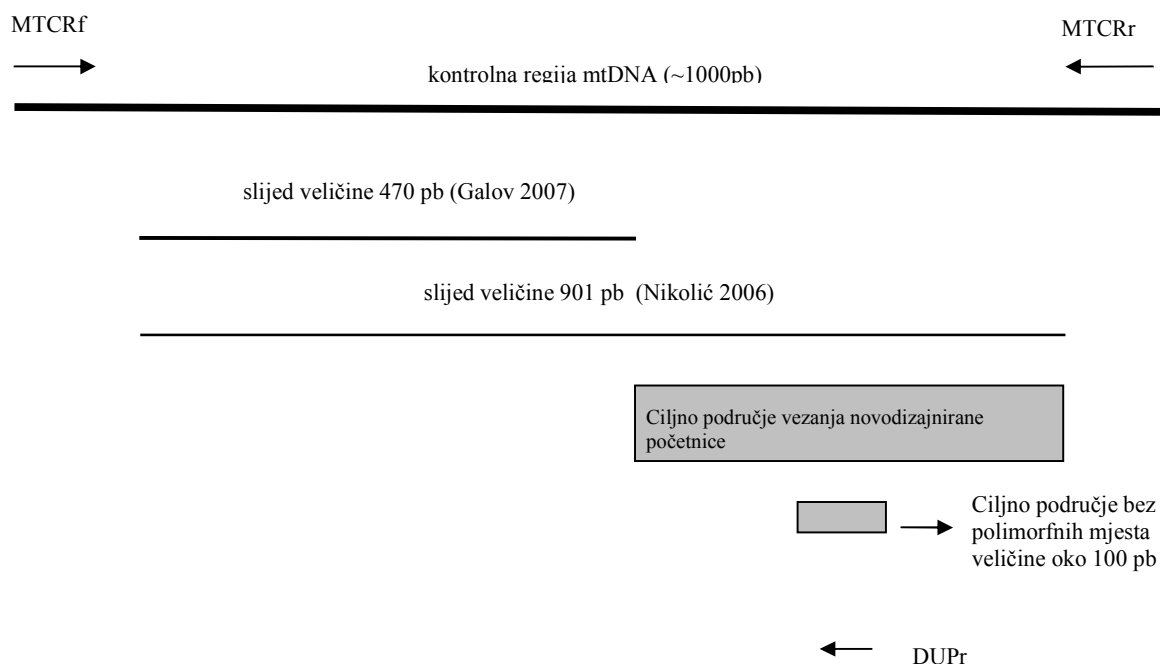
Ukupnu DNA sam izolirala korištenjem kompleta – Wizard Genomic DNA Purification Kit (prilagođen protokol).

Usitnila sam skalpelom 5-10 mg tkiva te prebacila u 1,5 mL epruvete u koje sam prethodno dodala 300 µl Nuclei Lysis Solution. Zatim sam dodala 1,5 µl proteinaze K i inkubirala preko noći na 55°C. Ostavila sam uzorke desetak minuta na sobnoj temperaturi da se ohlade i dodala 100 µl Protein Precipitation Solution te nakon 20 sekundi snažnog vorteksiranja sam uzorke stavila na led (5 minuta). Nakon 3 minute centrifugiranja na 13000 u nastalom talogu su proteini dok supernatant sadrži DNA.

U nove 1,5 mL epruvete sam odpipetirala 300 µl izopropanola i dodala supernatant te pažljivo promiješala sadržaj. Centrifugirala sam uzorke 1 minutu na 13000 i odlila supernatant. U epruvetama je ostao talog sa DNA gdje sam dodala 300 µl 70 % etanola i promiješala okretanjem epruvete. Nakon jednog minute centrifuge na 13000 odstranila sam supernatant i ostavila epruvete na sat vremena da se suše na zraku. Zatim sam dodala 50 µl DNA Rehydration Solution i inkubirala preko noći na 4°C. Izoliranu DNA sam držala u hladnjaku na 4°C.

2.2.2. DIZAJNIRANJE POČETNICE

U ovom istraživanju je korištena univerzalna uzvodna početnica MTCRf slijeda 5'-TTC CCC GGT CTT GTA AAC C-3' iz literature (Hoelzel i Green 1998, Natoli i sur. 2005). Nizvodnu unutrašnju početnicu, koja bi se vezala na ciljno područje na 3' kraju kontrolne regije sama sam dizajnirala. Za to sam koristila sljedove kontrolne regije mtDNA dugačke 901 pb dvaju uzoraka plavobijelog dupina (*Stenella coeruleoalba*) (Nikolić 2006) te jednog uzorka dobrog dupina čiji je potpuni slijed već ranije određen. Nakon odabiranja područja u kontrolnoj regiji mtDNA bez polimorfnih mjesta, koristila sam internetski program „Primer 3“ (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) za odabir najpovoljnije početnice (Slika 5). Sintetiziranje početnice DUPr naručila sam preko „Gorea Plus d.o.o.“ od tvrtke „Invitrogen“.



Slika 5: Prikaz cjelokupne kontrolne regije mitohondrijske DNA duljine 1000 pb s univerzalnim početnicama MTCRf i MTCRr. Ispod se nalazi pregled prijašnjih rezultata sekvenciranja s dobivenim djelomičnim sljedovima kontrolne regije različitih duljina zajedno s ciljnim područjem vezanja novodizajnirane početnice.

2.2.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM

Koristeći početnice MTCRf i DUPr, metodom lančane reakcije polimerazom, umnožila sam željeno područje kontrolne regije mtDNA.

Koristila sam „QIAGEN Multiplex PCR Kit“ (2 x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix i destilirana voda) koji se čuva na -20°C u zamrzivaču.

2 x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix sadrži:

HotStarTaq® DNA Polimeraza - na sobnoj temperaturi je u neaktivnom stanju što sprečava nastajanje dimera početnica i dovodi do visoke PCR specifičnosti. Aktivira se na 95°C .

Multiplex PCR Pufer - omogućava optimalno umnažanje PCR reakcijom. Predstavlja uravnoteženu kombinaciju soli i dodataka te osigurava učinkovito vezanje i produživanje početnica u reakciji. Sadrži 6 mM MgCl_2 . $[\text{Mg}^{2+}]$ utječe na prijanjanje početnice na kalup DNA.

dNTP Mix sadrži dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Smjesa za lančanu reakciju polimerazom je sadržavala:

15 μl	2x Multiplex PCR Master Mix	}	27 μl + 3 μl DNA
3 μl	10x Primer Mix (smjesa početnica)		
9 μl	H_2O , deionizirana		

Svaki uzorak je bio ukupnog volumena 30 μl . Napravila sam reakcijsku smjesu ili „master mix“ za sve uzorke, alikvotirala u svaku PCR epruvetu po 27 μl , te dodala DNA odgovarajućeg uzorka. U negativnu kontrolu sam umjesto DNA dodala jednaki volumen destilirane vode.

Uvjeti izvođenja PCR bili su:

- **početni aktivacijski korak** - 95°C , 15minuta (za aktivaciju Taq polimeraze)

· **ciklus u 3 koraka**

denaturacija	- 94°C 30sekundi (razdvajanje lanaca DNA)	} 36 ciklusa
prianjanje	- 62°C 90sekundi (vezanje početnica na lance kalupa)	
produženje	- 72°C 90sekundi (sinteza novih lanaca)	
· <u>završna ekstenzija</u>	- 72°C 20minuta (završno produljivanje lanaca)	

Nakon reakcije umnožavanja kontrolne regije, uzorke sam ostavila na 4°C preko noći.

2.2.4. ELEKTROFOREZA NA AGAROSNOM GELU

Za provjeru uspješnosti lančane reakcije polimerazom, provela sam elektroforezu produkata na 1,5 % - agaroznom gelu. Gel sam pripremila dodavanjem 1,5 g agaroze u 100 ml 0,5xTBE pufera. Otopinu sam zagrijavala do vrenja tj. otapanja agaroze, nakon čega sam tekućom vodom ohladila smjesu i izlila je u kadicu za elektroforezu koju sam prethodno obrubila ljepljivom trakom i postavila češalj za jažice. Nakon 20-30 minuta gel se polimerizirao, te sam ga premjestila do uređaja za elektroforezu koji je bio ispunjen puferom. Gel sam uronila u 0,5xTBE pufer, fiksirala sam kadicu i izvadila češalj. Kadicu sam postavila u položaj s češljem okrenutim prema katodi (-polu) jer je DNA negativno nabijena pa će tako putovati prema anodi tijekom elektroforeze.

Na parafilm sam odpipetirala 2,4 µl svakog PCR-proizvoda na koji sam dodavala 2 µl pufera za nanošenje uzoraka na gel LB 2x. Ovih 4,4 µl sam pipetom nanosila u jažice. U prvu jažicu sam nanijela 7 µl markera a druga jažica nam je služila kao negativna kontrola. Nakon što su sve jažice bile ispunjene, poklopila sam uređaj za elektroforezu i namjestila struju jakosti 400 mA i napona 90V na 60 minuta. Nakon završene elektroforeze, gel sam uronila u otopinu etidij bromida koncentracije 0,5 µg/ml u 0,5x TBE puferu da bi mogla vidjeti DNA fragmente pod ultraljubičastom svjetlošću. Nakon 20 minuta sam gel promatrala u transiluminatoru i zatim ga fotografirala.

2.2.5. PROČIŠĆAVANJE PCR PROIZVODA

Da bi umnožene PCR proizvode mogla sekvencirati, trebala sam ih najprije pročistiti tj. ukloniti neiskorištene nukleotide i početnice. Koristila sam kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System.

U svaki PCR produkt sam odpipetirala jednaki volumen Membrane Binding Solution. Zatim sam taj volumen prebacila u kolonu, inkubirala 1 minutu i centrifugirala 14000 rpm na 1 minutu. Izvadila sam kolonu, odlila tekućinu iz epruvete i vratila kolonu u epruvetu. Došlo je do vezanja DNA na membranu kolone.

U kolonu sam zatim odpipetirala 700 µl Membrane Wash Solution i centrifugirala 1400 rpm na 1 minutu, te opet odlila tekućinu iz epruvete u koju sam vratila kolonu. Slijedeće sam odpipetirala 500 µl Membrane Wash Solution, centrifugirala 14000 rpm na 5 minuta i odlila tekućinu iz epruvete. Nakon ponovne centrifuge (bez metalnog poklopca) 14000 rpm na 1 minutu, kolonu sam prebacila u novu epruvetu. U kolonu sam dodala 35 µl Nuclease-Free Water, inkubirala 1 minutu i centrifugirala 14000 rpm 1 minutu. Nakon svega kolonu sam bacila, jer je došlo do elucije DNA s membrane, a epruvetu s pročišćenom DNA pohranila na 4°C.

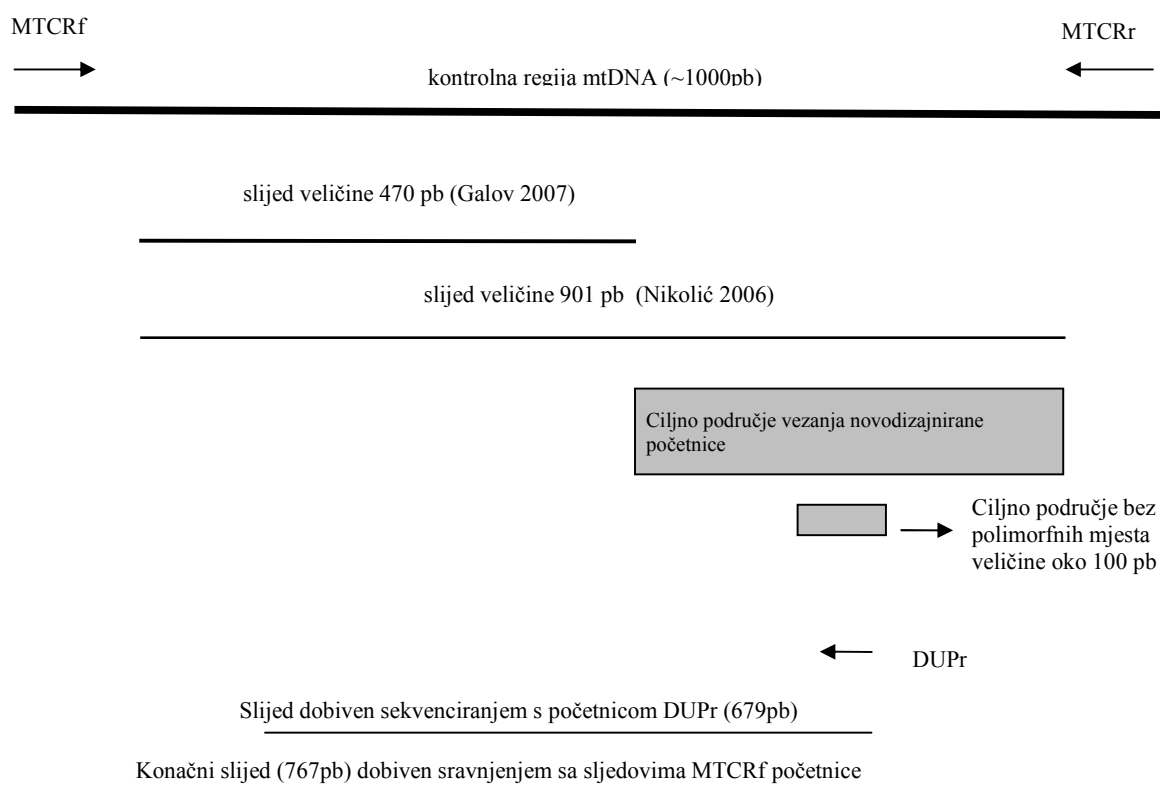
2.2.6. SEKVENCIRANJE KONTROLNE REGIJE MITOHONDRIJSKE DNA I ANALIZA DOBIVENIH SLJEDOVA

Pročišćene PCR proizvode poslala sam na sekvenciranje u servis „Invitrogen“, Seul, Koreja koji koristi 96-kapilarni genski analizator „ABI3730x1 DNA Analyzer“, Applied Biosystems. Dobivene sljedove sam analizirala korištenjem programa BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.5.3. (Hall 1999). S obzirom da je sekvenciranje provedeno pomoću nizvodne početnice, dobivene sljedove sam prebacila u njihov reverzni komplement. Zatim sam provela sravnjenje slijedećih parova sljedova: slijeda dobivenog sekvenciranjem s MTCRf početnicom (Galov 2007) i reverznog komplementa slijeda dobivenog sekvenciranjem s DUPr početnicom u ovom istraživanju. Time sam dobila sljedove dugačke 767 pb, na kojima sam zatim provela višestruko sravnjenje svih uzoraka. Za sravnjenje sljedova koristila sam potprogram ClustalW (Thompson i sur. 1994). Uz pomoć programa Arlequin, ver. 3.1 (Excoffier i sur. 2005) odredila sam haplotipove i polimorfna nukleotidna mjesta.

3. REZULTATI

3.1. Unutrašnja nizvodna početnica

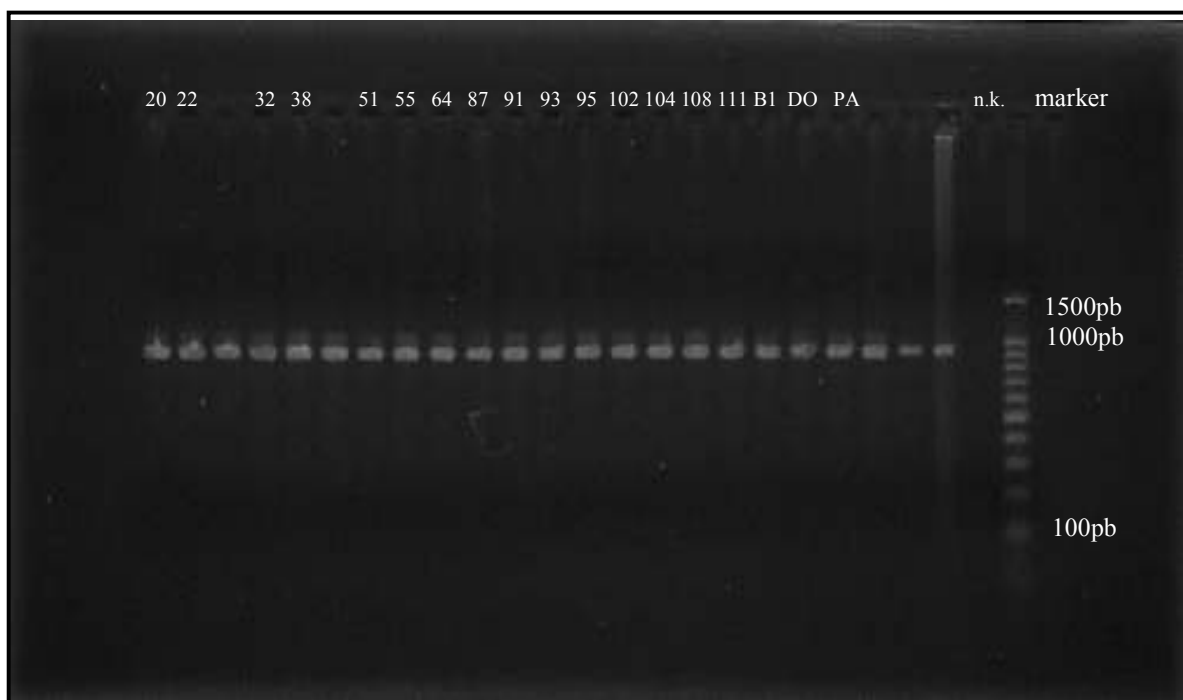
Koristeći program „Primer3“ dobila sam najpovoljniju sekvencu oligonukleotida tj. nizvodnu unutrašnju početnicu koju sam nazvala DUPr (Slika 6).



Slika 6: Prikaz cjelokupne kontrolne regije mitohondrijske DNA duljine 1000 pb s univerzalnim početnicama MTCRf i MTCRr. Ispod se nalazi pregled prijašnjih rezultata sekvenciranja s dobivenim djelomičnim sljedovima kontrolne regije različitih duljina zajedno s ciljnim područjem vezanja novodizajnirane početnice, te krajnjim rezultatima - sljedovi dugački 679 pb i 767 pb.

3.2. Umnožene kontrolne regije na agaroznom gelu

Elektroforezom sam pokazala da se uspješno umnožio ciljani dio kontrolne regije mtDNA dugačak oko 900 pb. Na Slici 8 prikazani su PCR proizvodi za neke od uzoraka. U elektroforezi sam koristila marker „100 pb DNA Ladder“.

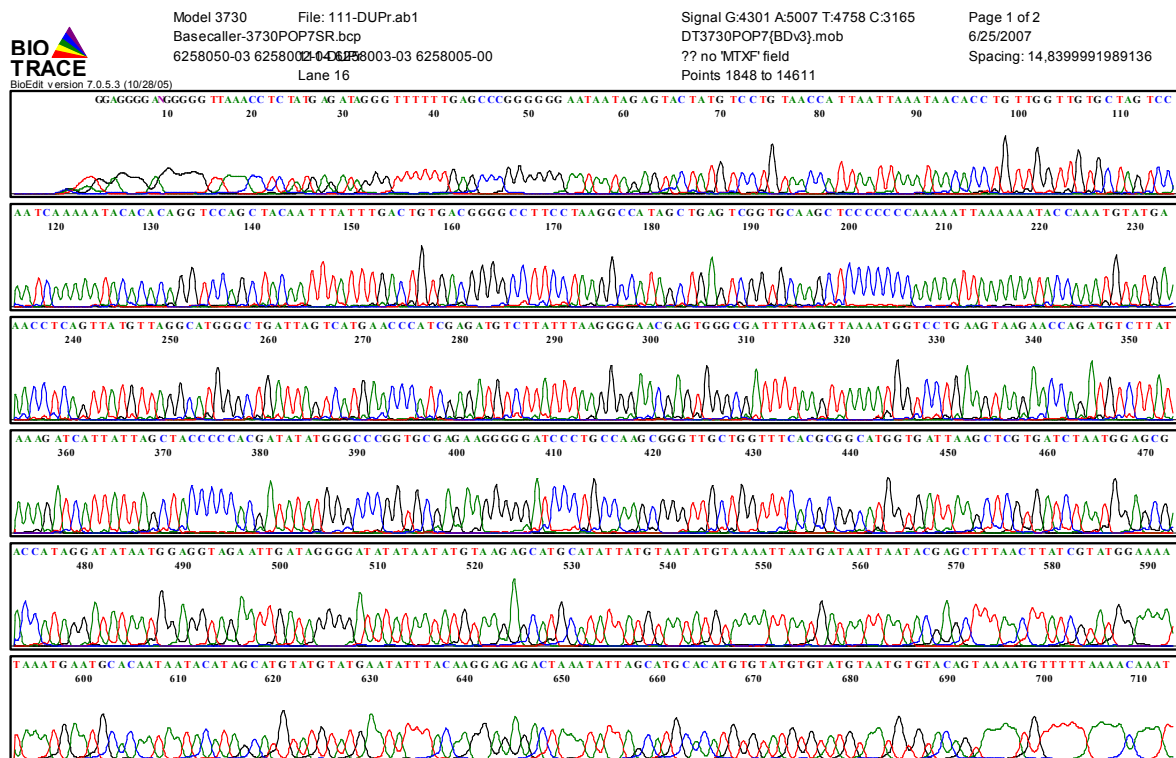


Slika 8 : Izgled gela nakon elektroforeze PCR proizvoda : 18 uzoraka umnožene kontrolne regije, negativna kontrola i marker.

3.3. Sljedovi kontrolne regije mitohondrijske DNA

Uporabom nosintetizirane početnice DUPr s 3' kraja kontrolne regije u reakciji sekvenciranja dobila sam slijed od oko 900 pb. Kromatogram uzorka 111 prikazan je na Slici 9. Početni i završni dio svakog slijeda je bio loše kvalitete, te sam za analizu odabrala slijed od 679 pb. Koristeći sljedove dobivene početnicom MTCRf u doktorskoj disertaciji (Galov 2007) uz pomoć

programa ClustalW sam provela sravnjenje parova uzoraka i dobila slijed kontrolne regije veći za 88 nukleotida na njenoj 5' strani. Rezultat je bio slijed od 767 pb, koji sam koristila za daljnju analizu.



Slika 9: Kromatogram uzorka 111 dobrog dupina. Dobiveni slijed kontrolne regije mtDNA u reakciji sekvenciranja početnicom DUPr.

3.3.1. ANALIZA SLJEDOVA

Za analizu sljedova uspoređivala sam fragmente duljine 767 pb. Uočila sam da postoji pet različitih haplotipova. Na Slici 10 sam prikazala slijed najučestalijeg haplotipa (haplotip D1). Kod ostala četiri haplotipa sam prikazala samo polimorfna mjesta, dok su baze identične haplotipu D1 prikazane točkama (slika 10).

Uzorcima 87, 95, B1 i PA98, koji su u disertaciji Galov (2007) svrstani u upitni haplotip D3, ovdje su utvrđeni točni sljedovi, te su pridruženi pripadajućim haplotipovima (tablica 2).

S učestalošću od 70,8 % haplotip D1 spada u najučestaliji haplotip koji obuhvaća 17 uzoraka. Tri jedinke čine haplotip D2 s učestalošću od 12,5 %, dok je haplotip D5 zastupljen s dvije jedinke iz Izraela (8,3 %). Ostale dvije jedinke čine dva haplotipa D3 i D4. U Tablici 2 su prikazani haplotipovi s pripadajućim uzorcima dobrog dupina.

Ustanovljena je velika sličnost između haplotipova D3 i D5 koji se razlikuju samo u 2 polimorfna mjesta nastala tranzicijom (290. i 311. nukleotidno mjesto).

Najučestalijem haplotipu je najbliži hapl D4, dok su najveće razlike (čak u 17 polimorfni mjesta) prisutne između hapl D1 i haplotipova D3 i D5.

Tablica 2: Prikaz haplotipova s pripadajućim jedinkama dobrog dupina. Masnim slovima su označeni uzorci koji su pripadali upitnom haplotipu D3 u disertaciji Galov (2007).

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



Slika 10: Slijed dijela kontrolne regije mtDNA od 767 pb pet haplotipova nadenih u 24 jedinke vrste dobri dupin.

U sravnjenim sljedovima kontrolne regije, prvo polimorfno mjesto je posljedica insercije/delecije. Ostalim nepodudaranjima sljedova razlog su supstitucije baza. Tranzicija označava promjenu purinskih baza u purinske i pirimidinskih u pirimidinske baze tj. adenin u guanin, ili timin u citozin. Transverzija je rjeđa i predstavlja promjenu purinskih baza u pirimidinske.

Postoje 23 varijabilna mjesta što iznosi 2,99 % od ukupnog slijeda kontrolne regije. Samo 3 polimorfna mjesta nastaju kao posljedica transverzije (13,04 %) a ostalih 19 kao posljedica tranzicija (82,6 %). Na 400. polimorfnom mjestu se dogodila i tranzicija i transverzija, dok je na lokaciji 16. nukleotida vidljiv jedini primjer insercije/delecije (4,34 %). U Tablici 3 sam prikazala nukleotidne položaje polimorfnih mjesta.

Tablica 3: Prikaz varijabilnih nukleotidnih mjesta u dobivenom slijedu kontrolne regije dobrog dupina. Prazna polja su mjesta bez supstitucije gdje su baze jednake onima u hapl D1.

haplotip	16	106	157	213	253	272	273	277	286	287	290
hapl D1	–	T	C	C	T	T	A	C	C	T	C
hapl D2	A		T	T		C	C	A	T	C	
hapl D3	A		T	T		C	C	A	T	C	
hapl D4	A	C		T	C				T	C	
hapl D5	A		T	T		C	C	A	T	C	T

haplotip	302	311	365	378	399	400	486	509	549	564	612	721
hapl D1	T	G	T	T	C	C	T	G	T	T	G	C
hapl D2	C	A	C			T	C	A	C			T
hapl D3	C	A	C			T	C	A		C	A	T
hapl D4	C			C	T	A	C					
hapl D5	C		C			T	C	A		C	A	T

4. RASPRAVA

Početnica DUPr, dizajnirana u ovom diplomskom radu, pokazala se uspješnom i korisnom u provođenju PCR reakcija, pogotovo kod uzoraka koji su dali dvojbene rezultate kod sekvenciranja s MTCRf početnicom PCR proizvoda dobivenih upotrebom MTCRf i MTCRr početnicama. Naime, pokazalo se da uzorcima dupina 87, 95, B1 i PA98 koje je u svojoj disertaciji Galov (2007) svrstala u haplotip D3, nije bio točno određen slijed, te su time bili i pogrešno svrstani u jedan haplotip. Sekvenciranje tih uzoraka u ovom istraživanju pokazalo je da uzorci 87, 95 i B1 zapravo pripadaju haplotipu D1, dok je slijed uzorka iz Izraela, PA98 identičan onom kod uzorka DO98, također iz Izraela, odn. da se radi o jedinstvenom haplotipu D5. Tako zapravo haplotip D3 iz Galov (2007) ne postoji, a umjesto njega sam haplotipom D3 nazvala slijed uzorka 104. Naime, produljenjem slijeda s 470 pb, koliko su bili dugački sljedovi iz Galov (2007), uočava se da se uzorak 104 odvaja od ostalih sljedova haplotipa D2 na polimorfnim mjestima 549., 564. i 612. (Tablica 3), te time tvori novi haplotip, nazvan D3.

Uporaba početnice DUPr pokazala se korisnom i za sekvenciranje ostalih dostupnih uzoraka dobrih dupina. Naime sekvenciranjem s uzvodnom MTCRf početnicom PCR proizvoda nastalih umnažanjem s početnicama MTCRf i MTCRr (Hoelzel i Green 1998, Natoli i sur. 2005) dobiveni su relativno kratki sljedovi, dugački tek 470 pb. Umnažanjem PCR reakcijom pomoću uzvodne početnice MTCRf i nizvodne, novo-dizajnirane DUPr, te daljnjim sekvenciranjem s nizvodnom početnicom DUPr, dobiju se sljedovi dugački 679 pb. Uz to, sravnjenjem odgovarajućih sljedova od 470 pb i onih od 679 pb, koji se preklapaju u 382 pb, konačno se dobiju sljedovi od 767 pb, koji su značajno dulji od onih prvobitnih 470 pb. Produljenjem dijelova kontrolne regije mtDNA koji se koriste za analizu, povećava se i razlučivanje haplotipova, čime će se moći dobiti i točnija filogenetska slika u daljnjim analizama.

U daljnjim istraživanjima će se koristiti početnica dizajnirana u ovom diplomskom radu (DUPr), zajedno s početnicom MTCRf, da se dobiju dulji sljedovi dijela kontrolne regije mtDNA većeg broja uzoraka dobrih dupina. Ti rezultati, zajedno s rezultatima iz ovog diplomskog rada će se koristiti za usporedbu haplotipova dobrog dupina iz Jadrana s objavljenim haplotipovima dobrih dupina iz ostalih dijelova Sredozemnog mora. Tada će se moći donijeti zaključci o genetičkoj strukturi jadranskih dobrih dupina u odnosu na one iz Sredozemlja.

5. ZAKLJUČAK

1. Uspješno je dizajnirana nizvodna unutrašnja početnica nazvana „DUPr“, čiji je slijed slijedeći: 5'-GGTGAATATCAAAGCAGAGG-3'.
2. Uporabom MTCRf i novo-dizajnirane DUPr početnice, PCR reakcijom nastaje fragment kraći od fragmenta koji se dobije korištenjem MTCRf i MTCRr početnica, čime se povećava uspješnost sekvenciranja za problematične uzorke.
3. Sekvenciranjem pomoću DUPr početnice nastaje slijed od 679 pb kontrolne regije mtDNA, a sravnjenjem s odgovarajućim slijedovima dobivenim sekvenciranjem s MTCRf početnicom nastaje slijed dugačak 767 pb.
4. - Analizom slijedova od 767 pb utvrđeno je postojanje pet jedinstvenih haplotipova s 23 varijabilna mjesta.
- Slijedovi za koje je navedeno da pripadaju haplotipu D3 nisu točno određeni u doktorskoj disertaciji Galov (2007), te su ovdje upotrebom početnice DUPr njihovi slijedovi ispravljani i svrstani u pripadajuće haplotipove.

6. LITERATURA

Aquadro C.F., Greenberg B.D. (1983): Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*. **103**: 287–312.

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., Janke A. (2002): Mitogenomic analyses of eutherian relationships. *Cytogenet Genome Res*. **96**: 20-32.

Avise J.C. (1994): Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall. New York, London.

Baird W.R., Walters E.L., Stacey P.J. (1993): Status of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, with special reference to Canada. *The Canadian Field-Naturalist*. **107**: 466-107.

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

Bearzi G., Notarbartolo di Sciara G. (1995): A comparison of the present occurrence of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, and common dolphins, *Delphinus delphis*, in the Kvarnerić (Northern Adriatic Sea). *Annales, series historia naturalis 2*. **7**: 61-68.

Brown W.M., George M. Jr., Wilson A.C. (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **76**: 1967–1971.

Cann R.L., Brown W.M., Wilson A.C. (1984): Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*. **106**: 479–499.

Dalebout M.L., Mead J.G., Baker C.S., Baker A.N., Van Helden A.L. (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.

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

Fish F.E. (2002): Streamling. U: Perrin W. F., Wursig B., Thevissen J.G,M. (ur.): *Enciklopedia of Marine Mammals*. Academic Press, Inc., San Diego, California. str. 1197-1201.

Galov A. (2007): Genetička raznolikost populacije dobrog dupina *Tursiops truncatus* s osvrtom na druge vrste kitova (Cetacea) Jadranskog mora. Disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

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. (2002): 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.

Gomerčić T., Đuras Gomerčić M., Gomerčić H., Škrtić D., Ćurković S., Lucić H., Galov A., Vuković S., Huber Đ. (2004a): 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, str. 16.

Gomerčić H. (2004b): Uginuća dupina u južnom Jadranu nisu alarmantna. *Vjesnik*, 29. travnja, str.28.

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

Hoelzel A.R., Hancock J.M., Dover G.A. (1991): Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology and Evolution*. **8**: 475-493.

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

Hoelzel A.R. (1998a): Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry and mixed assemblages: implications for conservation policy. J. Hered. **89**: 451–458.

Innis M.A., Gelfand D.H. (1990): Optimization of PCRs. U: Innis, Gelfand, Sninsky, White (ur.): PCR Protocols. Academic Press, New York, str. 3-12.

Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villablanca F.X., Wilson A.C. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **86**: 6196-6200.

Lansman R.A., Shade R.O., Shapira J.F., Avise J.C. (1981): The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. III Techniques and potential applications. J.Molec.Evol. **17**: 214-226.

Mead J.G., Potter C.W. (1995): Recognizing two populations of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) off the Atlantic coast of North America: Morphologic and ecology considerations. IBI Rep. **5**: 31–44.

Natoli A., Birkun A., Aguilar A., Lopez A., Hoelzel A.R. (2005): Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). Proc.R.Soc.B. **272**: 1217–1226.

Nikolić N. (2006): Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA plavobijelog dupina, *Stenella coeruleoalba* (Meyen,1833), u Jadranskom moru. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Nishiwaki M. (1972): General biology. U: Ridgway S.H. (ur.): Mammals of the Sea. Biology and Medicine, C.C. Thomas Publisher, Springfield, USA, str. 6–136.

Notarbartolo di Sciara G., Demma M. (1994): Guida dei mammiferi marini del Mediterraneo, 2.izd., Padova.

Pichler F.B., Robineau D., Goodall R.N.P., Meyers M.A., Olivarría C., Baker C.S. (2001): Origin and radiation of Southern Hemisphere coastal dolphins (genus *Cephalorhynchus*). *Molecular Ecology*. **10**: 2215-2223.

Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (16.1.2006), Zagreb, Narodne novine, broj 7 (NN 7/2006).

Pravilnik o visini naknade štete prouzročene nedopuštenom radnjom na zaštićenim životinjskim vrstama (9.10.1996), Zagreb, Narodne novine, broj 84 (NN 84/1996).

Reeves R.R., Stewart B.S., Clapham P.J., Powell J.A. (2002): Guide to marine mammals of the world. AA Knopf, New York.

Rice D.W. (1998): Marine mammals of the world: systematics and distribution. U: Wartzok, D. (ur.) Special publication number 4. The Society for Marine Mammalogy, Lawrence, Kansas, SAD.

Rosel P.E., Dizon A.E., Heyning J.E. (1994): Genetic analysis of sympatric morphotypes of common dolphins (genus *Delphinus*). *Marine Biology*. **119**: 159-167.

Ross G.J.B., Cockcroft V.C. (1990): Comments on the Australian bottlenose dolphins and the taxonomy status of *Tursiops aduncus* (Ehrenberg, 1832). U: Leatherwood S., Reeves R.R.(ur.): The Bottlenose Dolphin. Academic Press, New York, str. 110-128.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (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.

Walker W.A. (1981): Geographic variation in morphology and biology of bottlenose dolphins (*Tursiops*) in the eastern North Pacific. NOAA/NMFS Administrative Report no. LJ-81-0003c, 21 pp.

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

Wells R.S., Scott M.D. (2002): Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus* and *T. aduncus*). U: Perrin W.F., Wusig B., Thewissen J.G.M.(ur.): *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, San Diego, CA, str.122-128.

Wood C.J. (1998): Movement of bottlenose dolphins around the south-west coast of Britain. *J. Zool.* **246**: 155–163.

Zakon o zaštiti prirode (8.6.2005), Zagreb, Narodne novine, broj 70 (NN 70/2005).

Zhang D.X., Hewitt G.M. (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution.* **11**: 247-251.