

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Dušica Divac Brnić

**RAZNOLIKOST KONTROLNE REGIJE MITOHONDRIJSKE DNA I
KRANIOMETRIJSKE OSOBITOSTI DOBROG DUPINA (*Tursiops
truncatus*) IZ JADRANSKOG MORA**

Diplomski rad

Zagreb, 2012. godina

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

Zahvaljujem svojim mentoricama doc. dr. sc. Ani Galov i doc. dr. sc. Martini Đuras Gomerčić na strpljenju, potpori i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Velika zahvala doc. dr. sc. Tomislavu Gomerčiću i Gordani Žakman na susretljivosti i pomoći pri radu.

Hvala mojoj obitelji koja mi je omogućila studij i bila najveća podrška tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

RAZNOLIKOST KONTROLNE REGIJE MITOHONDRIJSKE DNA I KRANIOMETRIJSKE OSOBITOSTI DOBROG DUPINA (*Tursiops truncatus*) IZ JADRANSKOG MORA

DUŠICA DIVAC BRNIĆ

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Dobri dupin - *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) jedini je stalni morski sisavac Jadranskog mora te se pretpostavlja da u hrvatskom dijelu živi između 220 do 250 jedinki. Korišteni su uzorci dobrih dupina uginulih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora i dva uzorka iz talijanskog dijela Jadrana. Cilj je utvrditi kraniometrijske značajke i raznolikost sljedova dijela kontrolne regije mtDNA dobrog dupina iz Jadranskog mora. Unutar 108 jedinki postoji 11 različitih haplotipova. Najučestaliji je haplotip DD01. Genska raznolikost iznosi 0,6108, a nukleotidna 0,010452. Haplotip DD07 je jedinstven. U 96 lubanja odraslih jedinki nađeno je da se mužjaci i ženke jadranske populacije razlikuju u 19 kraniometrijskih mjera, u mužjaka je lubanja robusnija. Lubanje dupina izraelskih, crnomorskih, kineskih te istočno floridskih populacija su kraće, a u populacija iz istočnog Atlantika, Sjevernog mora, mora oko Mauritanije, mora oko Južnoafričke Republike i iz mora oko Australije znatno su dulje su od lubanja jadranskih dobrih dupina.

(stranica 51, slika 10, tablica 10, literaturni navod 34, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: dobri dupin, mitohondrijska DNA, kraniometrija, morfotipovi, genetička raznolikost, Jadransko more

Mentor: Doc. dr. sc. Ana Galov PMF Sveučilišta u Zagrebu

Doc. dr. sc. Martina Đuras Gomerčić Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Ana Galov PMF Sveučilišta u Zagrebu

Doc. dr. sc. Martina Đuras Gomerčić Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Doc. dr. sc. Petar Kružić PMF Sveučilišta u Zagrebu

Rad je prihvaćen: 02. veljače 2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION VARIABILITY AND SKULL MEASUREMENTS OF BOTTLENOSE DOLPHIN (*Tursiops truncatus*) IN THE ADRIATIC SEA

DUŠICA DIVAC BRNIĆ

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Bottlenose dolphin - *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) is the only resident marine mammal in the Adriatic Sea, and it is assumed that in the Croatian part live between 220-250 individuals. Carcasses of bottlenose dolphins from the Croatian part and two samples from the Italian part of the Adriatic were used. The goal is to determine craniometrical features and diversity of the mtDNA control region of bottlenose dolphins from the Adriatic Sea. Among 108 individuals, there are 11 different haplotypes. The most common haplotype is DD01. Genetic diversity was 0.6108, and nucleotide 0.010452. Haplotype DD07 is unique. Males and females of Adriatic population differ in 19 skull variables, in males the skull is more robust. Skulls of Israeli, Black Sea, Chinese and Eastern Florida populations are shorter, while skulls of populations from the Eastern Atlantic, North Sea, the seas around Mauritania, South Africa and Australia are considerably longer than the skulls of Adriatic bottlenose dolphins.

(51 pages, 10 figures, 10 tables, 34 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library.

Key words: bottlenose dolphin, mitochondrial DNA, craniometry, morphotypes, genetic diversity, the Adriatic Sea

Supervisor: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof. Faculty of science University of Zagreb

Dr. Martina Đuras Gomerčić, Assoc. Prof. Faculty of veterinary medicine
University of Zagreb

Reviewers: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof. Faculty of science University of Zagreb

Dr. Martina Đuras Gomerčić, Assoc. Prof. Faculty of veterinary medicine
University of Zagreb

Dr. Petar Kružić, Assoc. Prof. Faculty of science University of Zagreb

Thesis accepted: 02th February 2012

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. 1. Dobri dupin, <i>Tursiops truncatus</i> (Montagu, 1821)	1
1. 2. Lubanja dobrog dupina, <i>Tursiops truncatus</i>	4
1. 3. Mitohondrijska DNA	7
1. 4. Istraživanja dobrog dupina u Crnom, Sredozemnom moru i sjeveroistočnom Atlantskom oceanu.....	8
2. MATERIJALI I METODE	10
2. 1. Uzorci dobrog dupina	10
2. 2. Kranimetrija	16
2. 3. Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA	20
2.3.1. Izolacija DNA iz tkiva	20
2.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	20
2.3.3. Elektroforeza na agaroznom gelu	21
2.3.4. Pročišćavanje PCR proizvoda	22
2.3.5. Sekvenciranje PCR proizvoda i analiza sljedova	22
3. REZULTATI	24
3. 1. Rezultati kranimetrijskih mjerenja.....	24
3. 2. Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA	33
3.2.1. Uspješnost umnažanja dijela kontrolne regije mtDNA	34
3. 2. 2.Uspješnost sekvenciranja dijela kontrolne regije mtDNA	35
3. 2. 3. Analiza sljedova	36
4. RASPRAVA	41
4. 1. Kranimetrijski opis populacije dobrog dupina iz Jadrana.....	41
4. 2. Usporedba kranimetrijskih podataka dobrog dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora s dobrim dupinima iz svjetskih mora.....	43
4. 3. Usporedba genske raznolikosti jadranske populacije s populacijama iz drugih svjetskih mora	45
5. ZAKLJUČAK	47
6. LITERATURA	49

1. UVOD

1. 1. Dobri dupin, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821)

Dobri dupin - *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) vrsta je morskih sisavca iz reda Cetacea – kitova kojima pripadaju na život u moru najprilagođeniji sisavci. Unutar reda kitova dobri dupin pripada podredu Odontoceti – kitovi zubani, porodici Delphinidae – šiljastozubi dupini (Wells i Scott 2002; Barnes 2002).



Slika 1. Dobri dupin, *Tursiops truncatus* iz šibenskog akvatorija, 2010. Izvor slike: Udruga za zaštitu prirode, Val.

Dobri dupin kozmopolitska je vrsta koja obitava u tropskim i umjerenim morima obaju hemisfera. Nastanjuju obalna područja i dublje vode mora i oceana, a mogu se prilagoditi i životu uz estuarije, te neki uplivavaju i u rijeke (Wells i Scott 2002). Najsjevernije u Tihom oceanu zabilježeni su od Ohotskog mora, Kurilskih otoka, Havaja do Montereyjskog zaljeva kod srednje Kalifornije, pa južno do Australije i Novog Zelanda. U sjevernom Atlantiku zabilježeni su uz obalu Nova Scotia tijekom ljetnih mjeseci, a obitavaju i Norveško more, otočja Lotofen, te Baltičko more i Finski zaljev zatim Sredozemlje i Crno more, te ih nalazimo sve do Južnoafričke Republike i Ognjene zemlje (Wells i Scott 2002, Rice 1998). Dobri dupin je jedina vrsta morskih sisavaca koja stalno nastanjuje Jadransko more, te se pretpostavlja da u hrvatskom dijelu Jadrana živi između 220 do 250 jedinki (Gomerčić 2004) (slika 1.).

U nekim hladnijim područjima grupe sezonski migriraju, primjerice populacije uz Atlantsku obalu SAD – a. S obzirom na sve veći utjecaj klimatskih promjena zabilježene su i migracije kao na primjer kod populacije dobrih dupina uz obalu Argentine tijekom El Nino - a. U brojnim dijelovima svijeta imaju stalno područje nastanjivanja (engl. home range) dok se na nekom području opetovano pojavljuju tijekom godina (Wells i Scott 2002).

Prema veličini tijela, obojenju kože, morfologije lubanje i genetske raznolikosti u dobrog dupina ustanovljeno je da postoji razlika između pelagičkog i obalnog tipa, ali razlike postoje i unutar obalnih populacija (Hoelzel i sur. 1998). Neke obalne populacije toliko se morfološki i genetički razlikuju da su pojedini tipovi izdignuti na razinu zasebne vrste, primjerice *Tursiops aduncus* (Wang i sur. 1999). Prema dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da u hrvatskom dijelu Jadranskog mora postoji samo jedan morfotip dobrog dupina (Đuras Gomerčić 2006).

S obzirom na geografsku lokaciju odrasle jedinke postižu duljinu od nešto manje od 2 m do 3,8 m, te se čini da veličina tijela ovisi o temperaturi mora u kojem obitavaju. Mladunčad se rađa pri duljini od oko 84 – 140 cm (Wells i Scott 2002).

Dorzalno i lateralno dobri dupini su svjetlo sivi do crne boje dok su s ventralne strane bijeli ili svijetlo ružičasti (Wells i Scott 2002).

Nadeni su u grupama od po 2 do 15 jedinki, međutim zabilježene su grupe i od po 1 000 jedinki, a unatoč formiranju zajednica utvrđeno je da jedinke često migriraju iz jedne grupe u drugu što utječe na protok gena i gensku strukturu (Wells i Scott 2002, Fernández i sur. 2011).

Većinom se hrane pelagičkim vrstama plave ribe ali i bentičkim ribama i raznim vrstama glavonožaca. Pronađeno je da postoje varijacije u prehrani ovisno je li riječ o pelagičnom ili obalno tipu. Također unutar nekih populacija pojedine jedinke se hrane na različitim područjima, ovisno o spolu i veličini. Tako se ženke s mladuncima hrane uz obalu, adolescenti se hrane nešto dalje od obale, ženke bez mladunčadi i odrasli mužjaci još dalje od obale (Wells i Scott 2002).

Brojanjem godišnjih zona prirasta u dentinu utvrđeno je da ženke dobrog dupina žive do 50 a mužjaci između 40 – 45 godina starosti (Wells i Scott 2002). Ženke postaju spolno zrele prije mužjaka i to između 5 do 13 godine, a mužjaci postaju spolno zreli oko 9 do 14 godine starosti. Zabilježeno je da se ženke mogu razmnožavati do 48 godine života (Wells i Scott 2002).

Najveći predatori dobrih dupina su razne vrste morskih pasa, tako u nekim područjima oko polovica jedinki kaudalno i ventralno na tijelu ima ugrize morskih pasa. Sljedeći prirodni neprijatelj im je kit ubojica (*Orcinus orca*) (Wells i Scott 2002).

Vjerojatno najveći neprijatelj dobrog dupina je čovjek koji sustavnim uništavanjem i zagađivanjem staništa, prekomjernim izlovom ribe ili direktnim ubijanjem životinja radi trofeja i smanjenja kompeticije s ribarima, a u prošlosti i radi prehrane ljudi u nekim područjima, dovodi neke lokalne populacije do izumiranja (Simmonds i Nunny 2002, Bearzi i sur. 2008).

U Hrvatskoj su od 1994. sve vrste kitova zaštićene Zakonom o zaštiti prirode (NN 30/94., 162/03.), Zakonom o zaštiti životinja (NN 52/91), Pravilnikom o zaštiti pojedinih vrsta sisavaca (Mammalia) (NN 31/95.), Pravilnikom o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 99/09) a i međunarodnim ugovorima tj. Konvencijom o zaštiti migratornih vrst divljih životinja (CMS) (NN-MU 06/00), Sporazumom o zaštiti kitova (Cetacea) u Crnom moru, Sredozemnom moru i susjednom Atlantskom području (ACCOBAMS) (NN-MU 06/00) kao i Međunarodnom konvencijom za regulaciju kitolova i Protokol (IWC) (NN-MU 6/06).

1. 2. Lubanja dobrog dupina, *Tursiops truncatus*

Lubanja je dio osovinskog skeleta koju čine brojne kosti a od kojih je većina parna i međusobno su povezane šavovima, a služi kao zaštita mozgu te brojnim osjetnim organima. Ujedno, okružuje početni dio dišnog i probavnog sustava. Tako su kosti glave jadranskih dobrih dupina potpuno srasle u jedinki starijih od pet godina, iznimka su nosne kosti koje u nekih životinja ne srastu niti do dobi od 20 godina (Đuras Gomerčić 2006). Tijekom evolucije kitova došlo je do produljivanja oralnog dijela sjekutične kosti, gornje čeljusti i rala u "rostrum" ili "kljun". To je dovelo do promjene položaja, veličine i oblika mnogih kostiju lubanje, te je ona kod kitova bilateralno asimetrična. Primjerice nosni otvori su vrlo asimetrični i njihova veličina i oblik je izrazito varijabilna među jedinkama (Rommel 1990).



Slika 2. Dorzalna strana lubanje dobrog dupina, jedinka broj 28.

"Kljun" lubanje čine parne sjekutične kosti (*ossa incisiva*), gornje čeljusti (*maxillae*) i neparno ralo (*vomer*). Svaka sjekutična kost može nositi do 3 zuba, a gornja čeljust od 20 do 25 zuba u zubnicama. Medijalno na krovu lubanje nalaze se parne nosne kosti (*ossa nasalia*),

a između njih i sjekutičnih te gornjih čeljusti je nosni otvor. Krov lubanje još čine parne čeone kosti (*ossa frontale*), parne tjemene kosti (*ossa parietalia*) i neparna međutjemena kost (*os interparietale*) i supraokcipitalni dio zatiljne kosti (*os occipitale*). Iz ovog dijela zatiljne kosti odvajaju se parna zglobna izbočenja (*condyli occipitales*) između kojih je veliki otvor (*foramen magnum*) za prolaz kralježničke moždine (Rommel 1990) (slika 2.).

Ostale kosti koje čine krov lubanje jesu ralo (*vomer*), te ventrolateralno dijelovi klinaste kosti (*os sphenoidale*). Ventromedijalno jesu neparni bazisfenoid (*os basisphenoidale*) i presfenoid (*os presphenoidale*) te bazalni dio zatiljne kosti (*pars basilaris ossis occipitalis*) (Rommel 1990) (slika 3.).

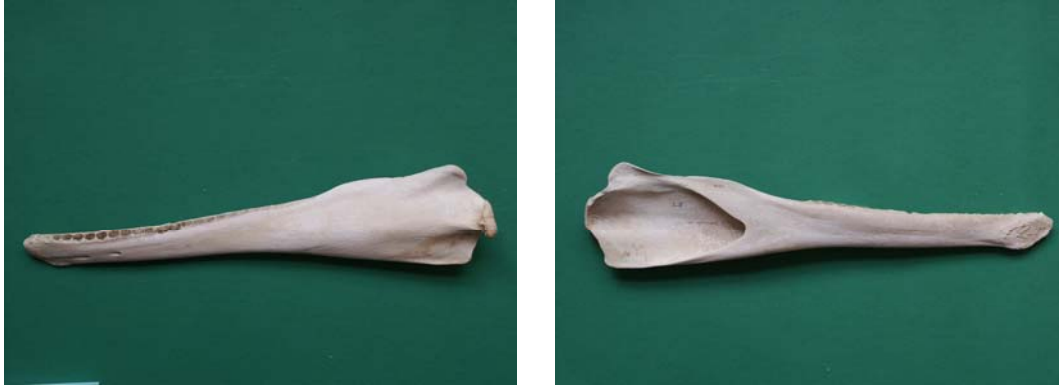


Slika 3. Ventralna strana lubanje dobrog dupina, jedinka broj 28.

Medijalno s ventralne strane lubanje nalaze se parne nepčane kosti (*ossa palatina*), a kaudalno su smještene parne krilaste kosti (*ossa pterygoidea*). Ventralno između čeljusnih i sjekutičnih kosti proviruje ralo. Mediokaudalno od kaudalnih izdanaka krilaste kosti je bazalni dio zatiljne kosti (Rommel 1990) (slika 3.).

Ako lubanju promatramo s lateralne strane možemo uočiti da se lateralno na lubanji nalaze parne suzne kosti (*ossa lacrimalia*), parne čeone kosti (*ossa frontalia*) i ljuskavi dio sljepoočne kosti (*pars squamosa ossis temporale*). Između suznih kosti i ljuskavog dijela sljepoočne kosti smještene su parne jagodične kosti (*ossa zygomatica*) (Rommel 1990) (slika 3.).

Lijeva i desna donja čeljust sastoje se od tijela donje čeljusti (*corpus mandibulae*) s zubnicama i grane donje čeljusti (*ramus mandibulae*), a međusobno su rostralno nepokretno povezane mandibularnom simfizom (Rommel 1990) (slika 4.).



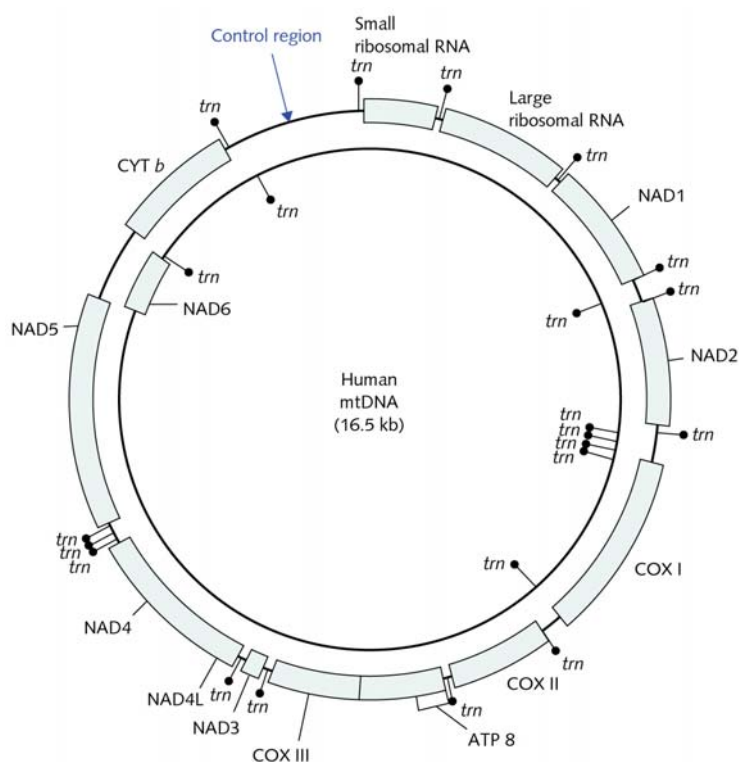
Slika 4. Lateralna (lijevo) i medijalna (desno) strana lijeve donje čeljusti dobrog dupina, jedinka broj 28.

Zubalo u dobrog dupina je homodontno s jednim otvorom zubne šupljine koji se smanjuje kako životinja stari. U jadranskih dupina zubi izbiju tijekom prve godine života, a najviši su u jedinki starijih od pet godina dok kod životinja starijih od 15 godina oni postupno otupe. U starijih jedinki zubi ispadaju, te se zubnice ispune koštanim tkivom (Đuras Gomerčić 2006).

Lubanje su najčešće čuvani ostaci morskih sisavaca u muzejima i zbirkama, te su pomoću kranimetrijskih mjera utvrđene razlike između populacija iz istog ili udaljenih mora (Walker 1981, Viaud – Martinez i sur. 2008).

1. 3. Mitohondrijska DNA

Mitohondrijska DNA je mali ekstra-nuklearni dio genoma koji se nalazi u velikom broju kopija u mitohondrijima, organelima u citoplazmi većine eukariotskih stanica. Mitohondrijski genomi svih životinja, uz par iznimaka, sadrže jednakih 37 gena, te nekodirajuću sekvencu, kontrolnu regiju ili D – petlju koja sadrži informacije prijeko potrebne za početak transkripcije i replikacije, a u kitova je ona dugačka oko 1000 parova baza (Hoelzel 1991, Beebee i Rowe 2004) (slika 5.).



Slika 5. Prikaz mitohondrijske DNA. Preuzeto iz Beebee i Rowe 2004.

MtDNA kodira za neke proteine oksidativne fosforilacije, te za rRNA i tRNA za sintezu vlastitih proteina. Životinjska mtDNA je kružna dvolančana molekula koja ovisno o vrsti varira u veličini (Beebee i Rowe 2004). Procjenjuje se da je ukupna brzina mutacija, odnosno brzina supstitucija nukleotida u mtDNA 5-10 puta veća od supstitucija u nuklearnoj DNA, a mutacije najbrže nakuplja kontrolna regija mtDNA. Ta činjenica zajedno s majčinskim nasljeđivanjem mitohondrija koje ima za posljedicu haploidno nasljeđivanje, čini mtDNA izvrsnim genetičkim biljekom za populacijska istraživanja (Beebee i Rowe 2004).

1. 4. Istraživanja dobrog dupina u Crnom, Sredozemnom moru i sjeveroistočnom Atlantskom oceanu

Fernández i sur. (2011) istraživali su dobre dupine naseljene duž obale sjeverozapadne Španjolske i južnog Portugala dugačke približno 500 km. Utvrdili su, da unatoč nepostojanju nikakve fizičke barijere na ovom malom prostoru, postoje dvije populacije sa slabim protokom gena te da neke jedinke migriraju iz jedne populacije u drugu.

Natoli i sur. (2005) molekularno su analizirali 99 uzoraka dobrih dupina iz škotske obale i zapadnog Atlantika, te Crnog i Sredozemnog mora. Pronašli su da fizička prepreka između škotske populacije i populacije iz sjevernog Atlantika dovodi do slabog protoka gena, te su utvrdili da ženke škotske populacije emigriraju u većem postotku nego što jedinke iz drugih populacija imigriraju u škotsku populaciju.

Druga barijera, za koju su Natoli i sur. (2005) pretpostavili da će utjecati na genetsku strukturu dupina, su Gibraltarska vrata koja odvajaju dupine iz sjeveroistočnog Atlantika od jedinki iz zapadnog Sredozemnog mora. Međutim istraživanja su pokazala postojanje visokog protoka gena.

Apeninski poluotok te Sicilija odvajaju zapadni i istočni dio Sredozemnog mora što utječe na slab protok gena, a najviše je izolirana populacija dobrog dupina iz Crnog mora (Natoli i sur. 2005).

Viaud – Martinez i sur. (2008) proveli su molekularna istraživanja na dijelu kontrolne regije mtDNA dugačkom 442 pb za 99 uzorka dobrog dupina iz istočnog Atlantika (Obala Francuske i Portugala), Sredozemnog mora (Ligursko, Tirensko more, talijanska obala Jadranskog mora, Egejsko more i obala Izraela) i Crnog mora. Utvrdili su da su 3 od 6 haplotipova specifični za Crno more kao i nisku haplotipsku raznolikost, te da postoji vrlo ograničen protok gena između crnomorskih i sredozemnih populacija.

Viaud – Martinez i sur. (2008) nisu utvrdili spolni dimorfizam kod jedinki iz Atlantika, Sredozemnog mora i Crnog mora. Pronašli su značajnu razliku u ukupnoj duljini tijela između ovih populacija, a dobri dupini iz Crnog mora bili su najmanji s 194 – 244 cm duljine, dok su sredozemni bili dugački 220 – 315 cm, a atlantski dupini najdulji s duljinom od 246 – 320 cm. Mjerali su 25 mjera na lubanji i za svaku mjeru crnomorska populacija pokazala je najmanje vrijednosti. Primjerice, srednja vrijednost kondilobazalne duljine

iznosila je u crnomorskih dupina 45,23 cm dok su u sredozemnih i atlantskih one bile 52,03 cm odnosno 53,74 cm.

Sharir i sur. (2011) analizirali su kondilobazalnu duljinu, ukupnu tjelesnu duljinu te omjer kondilobazalne i ukupne tjelesne duljine na 83 lubanja dobrih dupina iz mora oko Izraela, talijanske strane Jadranskog mora, Tirenskog mora, te združeno populacije iz Ligurskog mora, Balearsko more i Alboranskog mora. Utvrdili su da je izraelska populacija po svim mjerama značajno manja od populacija dupina iz zapadnog Sredozemnog mora.

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je opisati populaciju dobrog dupina iz Jadranskog mora prema kranimetrijskim značajkama i raznolikosti sljedova dijela kontrolne regije mtDNA, te istražiti u kojoj mjeri se jadranska populacija dobrog dupina razlikuje od ostalih svjetskih populacija.

2. MATERIJALI I METODE

2. 1. Uzorci dobrog dupina

Za potrebe ovog diplomskog rada koristila sam koštane ostatke prikupljene od travnja 2005. do listopada 2011., te uzorke mišića prikupljene od siječnja 2010. do rujna 2011. Prije statističkih analiza kranimetrijskih vrijednosti, svojim podacima pridružila sam mjere preuzete iz disertacije Đuras Gomerčić (2006). Uz uzorke mišića iz kojih sam izolirala i sekvencirala ciljno područje kontrolne regije mtDNA za daljnju analizu koristila sam i sljedove mtDNA iz disertacije Galov (2007). Međutim, neki uzorci za koje je ranije izolirana DNA (Galov 2007 i neobjavljeni podaci) nisu dali uspješne sekvence, te sam s tim uzorcima ponovila metodu lančane reakcije polimerazom, pročistila sam PCR proizvode i pročišćene PCR proizvode poslala na sekvenciranje. Uspješno dobivene sljedove dalje sam statistički obrađivala s uzorcima koje sam sama izolirala. Podatke o dobi, spolu i ukupnoj tjelesnoj duljini preuzela sam iz obrazaca za postmortalni pregled morskih sisavaca (tablica 1.) dok sam na karti (slika 6.) prikazala lokacije na kojima su pronađeni dobri dupin.

Svi koštani ostatci porijeklom su od dobrih dupina uginulih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. Uzorci potječu iz zbirke Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uzorci mišića skupljeni su tijekom razudbi, jedino su uzorci B1 i 161 koža i potkožje dobiveni biopsijom. Dupin 161 je bio uhvaćen i izvučen na brod kako bi ga se otpremilo na otvoreno more i spasilo od nasukavanja, te mu je tada uzet uzorak kože i potkožja za DNA analize, dok je od dupina B1 uzeta koža i potkožje pomoću strelice za biopsiju. Svi uzorci čuvaju se u epruvetama u 70%-tnom etilnom alkoholom na -20° C u Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dva uzorka mišića dupina, T95 i T101, dobiveni su iz Italije.



Slika 6. Karta Jadranskog mora s lokacijama na kojima su pronađene lešine i uzete biopsije dobrog dupina. Bijelom bojom označeni su uzorci s kojima su radene molekularne analize, tamno sivi su uzorci na kojima su radene i molekularne analize i kranimetrija, a svijetlosivi su uzorci na kojima su mjerene kranimetrijske mjere.

Tablica 1. Popis uzoraka dobrog dupina iz Jadranskog mora (njihova oznaka, datum nalaza, spol, dob (godine), tjelesna masa (kg) i ukupna tjelesna duljina (cm)). U lijevom stupcu Rezultata označila sam izvor podataka za pojedine dupine (“Đ – G“ označava preuzeto iz Đuras Gomerčić 2006, “G“ označava preuzeto iz Galov 2007, “H“ označava neobjavljene podatke). U desnom stupcu Rezultata oznakom “MOL+“ označila sam uzorke za koje sam ponovila molekularne analize, oznakom “MOL“ označila sam dupine kod kojih sam izolirala i analizirala mtDNA, oznakom “K“ označila sam dupine kojima sam mjerila kranimetrijske mjere.

Oznaka dupina	Datum nalaza	Spol	Dob (godine)	Masa (kg)	Ukupna duljina tijela (cm)	Rezultati	
1	16. 10. 1990.	ž	4	204	265	Đ – G	
3	18. 6. 1992.	m	7	240	263	Đ – G	
8	26. 5. 1994.	ž	6		265	Đ – G	
12	21. 12. 1995.	m	9	237	278	Đ – G	
13	19. 4. 1996.	ž	5		240	Đ – G	
15	2. 10. 1996.	m	12	279	290	Đ – G	
16	26. 4. 1997.	ž	7		275	Đ – G	
17	30. 7. 1997.	ž	13		274	Đ – G	
19	16. 8. 1997.	m	7		240	Đ – G	
20	8. 10. 1997.	ž	21	214	288	Đ – G; G	MOL+
22	17. 3. 1998.	m	3		234	G	
23	12. 1. 1999.	m	11		291	Đ – G	
25	27. 2. 1999.	ž	23	228	278	Đ – G	
28	9. 7. 1999.	m	16	249	312	Đ – G; G	
31	10. 10. 1999.	ž	12			Đ – G	
32	1. 11. 1999.	m	3	128	208	G	
35	24. 11. 1999.	ž	14	163	258	Đ – G	
36	1. 12. 1999.	m	13	156	282	Đ – G	
38	12. 1. 2000.	ž	21	261	286	Đ – G; G	
39	2. 3. 2000.	ž	26	192	276	Đ – G	
40	17. 3. 2000.	m	13	288	288	Đ – G	
41	27. 4. 2000.	ž	12	224	261	Đ – G; G	
46	3. 7. 2000.	ž	1	23,65	122	G	
51	15. 2. 2001.	ž	21		275	Đ – G; G	
54	18. 3. 2001.	ž	17	236	281	Đ – G	
55	23. 3. 2001.	ž	2	62	165	G	
57	11. 04. 2001.	ž	7	??		G	
62	19. 7. 2001.	m	14	155	290	Đ – G	
64	9. 10. 2001.	m	17	305	312	Đ – G; G	
66	6. 11. 2001.	ž	26	199	283	Đ – G	
76	20. 2. 2002.	m	12	177,5	272	Đ – G	
80	1. 3. 2002.	m	17	324	294	Đ – G; G	
83	25. 4. 2002.	ž	11	180	266	Đ – G	

87	16. 4. 2002.	ž	5	79	188	G	
88	18. 4. 2002.	m	11	135	249	Đ – G	
91	11. 7. 2002.	ž	13	246	280	Đ – G; G	
93	5. 8. 2002.	ž		65	154	G	
95	13. 8. 2002.	ž		40	136	G	MOL+
96	22. 8. 2002.	ž	12	169	268	Đ – G	
99	8. 10. 2002.	m	12	249	256	Đ – G	
100	23. 10. 2002.	m	12	215	270	Đ – G	
101	31. 10. 2002.	m	5	98	212	G	
102	24. 12. 2002.	ž	20	216	262	Đ – G; G	
104	17. 7. 2003.	m	20	210	277	Đ – G; G	
105	19. 8. 2003.	m			287	Đ – G	
108	6. 10. 2003.	ž	17	209	277	Đ – G; G	
111	30. 11. 2003.	ž	10	130	251	Đ – G; G	MOL+
112	20. 12. 2003.	m	20	268	303	Đ – G; H	
113	16. 1. 2004.	m	7	144	215	Đ – G; H	
114	16. 2. 2004.	ž	19		277	Đ – G; H	
117	24. 4. 2004.	ž	16		279	Đ – G; H	
118	10. 5. 2004.	ž			191	H	
120	28. 5. 2004.	ž	15	206	284	Đ – G; H	
122	7. 7. 2004.					Đ – G	
123	3. i 17.8.2004.					Đ – G	
124	1. 9. 2004.	m	17	205	301	Đ – G; H	
126	14. 10. 2004.	m	19	182	266	Đ – G; H	
127	20. 10.2004.	ž	7	130	231	Đ – G; H	
128	22. 9. 2004.	ž	4	60	190	H	
129	24. 9. 2004.	m	14	168	280	Đ – G; H	
131	14. 12.2004.	m	1	77	175	H	
133	21. 04. 2005.	m		110	249	H	K
134	18. 05. 2005.	m	3	128	223	H	
136	15. 06. 2005.	m	7	161	260	H	K
138	16. 07. 2005.	m	7	124	246	H	K
139	25. 07. 2005.	m	21	239	294	H	K
141	19. 10. 2005.	ž	18	197	282	H	K
142	22. 10. 2005.	m	23	270	307	H	K
143	25. 10. 2005.	ž	20	163,5	263	H	K
144	07. 11. 2005.	ž				H	K; MOL+
145	16. 11. 2005.	ž		11	92	H	MOL+
148	07. 02. 2006.						K
149	28. 04. 2006.	m	5	186	242	H	
150	17. 05. 2006.	ž	4	87	186	H	
151	01. 06. 2006.	ž		13	258	H	K
152	05. 07. 2006.	ž	21	171	262	H	K
159	10. 04. 2007.	ž	22	298	286	H	K
160	10. 04. 2007.	m	<1	14,5	120	H	

161	14. 05. 2007.	ž			299	H	
162	28. 05. 2007	m	26	216	300	H	K
167	04. 08. 2007.	ž	10		261	H	K
168	05. 08. 2007.	m	3	89	199	H	
169	20. 08. 2007.	m	24	314	298	H	K
170	24. 08. 2007.	m	17	222	288	H	K
171	27. 08. 2007.	ž	22		290	H	K; MOL+
172	12. 09. 2007.	m	6	100	227	H	
173	21. 09. 2007.	ž	21	167	291	H	K;
174	30. 10. 2007.	ž		38	146	H	
175	05. 10. 2007.	ž	2	47	162	H	MOL+
177	06. 12. 2007.	m	19	234	322	H	K; MOL+
178	19. 12. 2007.	m	12	148	275		K
181	19. 04. 2008.	ž	4			H	MOL+
183	10. 05. 2008.	ž	14	218	267	H	K; MOL+
184	10. 05. 2008.	m		11,5	118	H	
186	17. 05. 2008.	ž	16	204	299	H	K; MOL+
190	29. 06. 2008.		16		200	H	K; MOL+
192	28. 07. 2008.	ž	<1	35	132	H	
193	04. 08. 2008.	m	3	79	210	H	
194	09. 08. 2008.	m	20	206	285	H	K
195	28. 10. 2008.	m	27	154	272	H	K
196	30. 10. 2008.	ž	26	166	280	H	K
197	31. 10. 2008.	m	1			H	
198	06. 11. 2008.	ž		117	226	H	MOL+
200	26. 11. 2008.	m	28	277	298	H	K
202	03. 08. 2008.	ž	<1			H	
203	24. 01. 2009.	ž	25	218	280	H	K
204	07. 04. 2009.	m	4	80	193	H	
205	07. 04. 2009.	m		72	171	H	
206	08. 05. 2009.	ž	5	119	210	H	K
207	17. 06. 2009.					H	K
209	24. 07. 2009.	ž	25	182	287	H	K
210	11. 10. 2009.	ž	1	33	154	H	
211	21. 10. 2009.	m	20	232	302	H	K
212	09. 01. 2010.	m	20	245	299		K; MOL
214	06. 04. 2010.	m		161	250		K; MOL
215	28. 04. 2010.	m	19	304	278		K; MOL
216	04. 06. 2010.	ž	3	53	176		MOL
217	29. 06. 2010.	ž	13	160	281		K; MOL
218	18. 07. 2010.	m					MOL
219	07. 08. 2010.	m	<1	50	148		MOL
220	22. 08. 2010.	ž		89	218		MOL
221	21. 08. 2010.	m	21	194	276		K; MOL
222	27. 08. 2010.	m		129			K; MOL
223	28. 08. 2010.	m	6	132	247		MOL

225	22. 09. 2010.	ž	11	163	264		K; MOL
227	28. 10. 2010.	m	4	90	212		MOL
228	22. 11. 2010.	m	27	194	274		K; MOL
231	29. 11. 2010.	m	8	137	223		MOL
232	04. 12. 2010.	ž	19	247	273		K; MOL
233	05. 12. 2010.	m					MOL
234	05. 12. 2010.	ž	20	187	284		K; MOL
235	09. 12. 2010.	ž	5	117	220		MOL
236	09. 12. 2010.	ž	25	135	272		K; MOL
237	13. 12. 2010.						MOL
239	05. 01. 2011.	m	99				MOL
241	14. 01. 2011.	m	22	314	288		K; MOL
245	10. 03. 2011.	m		65	181		MOL
247	19. 03. 2011.	m		105	202		MOL
248	09. 04. 2011.	ž		155	260		K; MOL
252	30. 05. 2011.	ž		150	277		K; MOL
255	15. 09. 2011.	m	1	46	158		MOL
B1	26. 06. 2003.	ž				G	MOL+

2. 2. Kranimetrija

Ukupno sam na 46 lubanja dobrog dupina izmjerila, ovisno o cjelovitosti lubanje, 59 kranimetrijskih mjera opisanih prema Perrin (1975), Walker (1981), Wang (2000) i Đuras Gomerčić (2006). (tablica 1., 2. i 3. i slika 7.). Mjerila sam pomoću pomične mjerke, metra i kutomjera, a svaku mjeru sam izmjerila s preciznošću od 0,5 – 0,2 cm, osim promjera šupljine zuba koju sam mjerila s točnošću od 0,01 cm.

Kako bi se isključio utjecaj rasta na razlike u kranimetrijskim vrijednostima mjerene su isključivo odrasle životinje, a kriterij za određivanje adultnosti lubanje bio je stupanj sraštenosti rostralnog dijela gornje čeljusti i sjekutične kosti (Turner 2003, Amaral 2009). Lubanje dupina starih 11 godina i mlađih iz disertacije Đuras Gomerčić (2006) sam pregledala kako bih prema kriteriju za određivanje adultnosti utvrdila da li se radi o juvenilnim ili odraslim. Vrijednosti mjera odraslih jedinki sam pridružila svojim mjerama za daljnje analize.

Dobivene kranimetrijske vrijednosti i mjere odraslih dupina preuzete iz disertacije Đuras Gomerčić (2006) statistički sam obradila u računalnom programu Statistika 7, StatSoft; metodama deskriptivne statistike da bih dobila srednje vrijednosti i standardne devijacije, te minimalne i maksimalne vrijednosti. U istom sam programu t – testom istražila razlike između mužjaka i ženki dobrog dupina u Jadranu, te koliko se jadranska populacija razlikuje od ostalih svjetskih populacija dobrog dupina. Podatke o dupinima iz drugih svjetskih mora preuzela sam iz literature (Ross 1977, Hersh i sur. 1990, Robineau i Vely 1997, Wang i sur. 2000, Viaud – Martineza i sur. 2008, Sharir i sur. 2011, Charlton – Robb i sur. 2011).

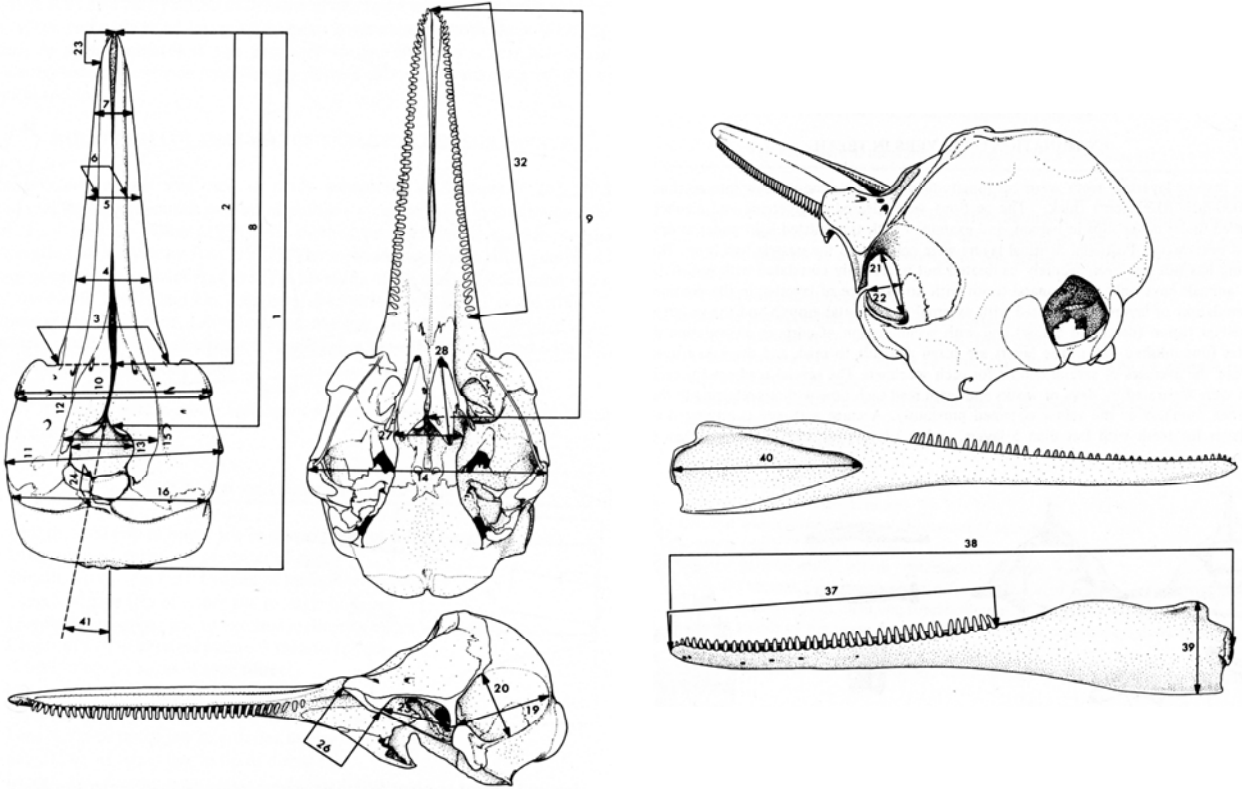
Tablica 2. Opis 59 kranimetrijskih mjera mjerenih na dobrim dupinima (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskoga mora

Mjera	Naziv mjere
1.	Kondilobazalna duljina mjerena od vrha "kljuna" do kaudalnog ruba kondila zatiljne kosti
2.	Duljina "kljuna" mjerena od vrha do linije koja spaja kaudalne rubove usjeka oralno uz očnicu
3.	Širina baze "kljuna" mjerena duž linije koja spaja kaudalne rubove usjeka oralno uz očnicu
4.	Širina "kljuna" 60 mm oralno od linije koja spaja kaudalne rubove usjeka oralno uz očnicu
5.	Širina "kljuna" na polovici njegove duljine
6.	Ukupna širina lijeve i desne sjekutične kosti na polovici duljine "kljuna"
7.	Širina "kljuna" na 3/4 duljine mjerene od baze "kljuna"
8.	Udaljenost od vrha "kljuna" do medijalnog kraja poprečnog kaudalnog ruba desne sjekutične kosti
9.	Udaljenost od vrha "kljuna" do hoana mjerena do ventromedijalnog kraja kaudalnog ruba desne krilaste kosti
10.	Najveća preorbitalna širina
11.	Najveća postorbitalna širina
12.	Najmanja supraorbitalna širina
13.	Najveća širina otvora između lijeve i desne sjekutične kosti
14.	Najveća širina između jagodičnih izdanaka sljepoočne kosti
15.	Najveća širina sjekutičnih kosti
16.	Najveća parijetalna širina unutar posttemporalne jame
17.	Vanjska okomita visina lubanjske šupljine mjerena od sredine trupa bazisfenoida do najdorzalnije točke zatiljne kosti ne uključujući supraokcipitalni greben
18.	Unutarnja duljina lubanjske šupljine mjerena medijano od kaudalnih rubova kondila zatiljne kosti do oralnog ruba lubanjske šupljine
19.	Najveća duljina lijeve posttemporalne jame mjerena do kaudalnog ruba šava
20.	Najveća širina lijeve posttemporalne jame mjerena pod pravim kutem prema njenoj najvećoj duljini
21.	Najveći promjer lijeve temporalne jame
22.	Najmanji promjer lijeve temporalne jame okomit na njen najveći promjer
23.	Projekcija sjekutičnih kostiju preko gornjih čeljusti mjerena gledajući s dorzalne strane od vrha "kljuna" do poprečne linije koja spaja najoralnije dijelove gornjih čeljusti
24.	Udaljenost od oralnog spoja nosnih kostiju do najkaudalnije točke supraokcipitalnog grebena
25.	Duljina lijeve očnice mjerena od vrha preorbitalnog izdanka čeone kosti do vrha postorbitalnog izdanka
26.	Duljina antorbitalnog izdanka lijeve suzne kosti
27.	Najveća širina hoana
28.	Najveća duljina lijevog kaudoverbalnog izdanka krilaste kosti
29.	Najveća širina oralne izbočine supraokcipitalnog grebena
30.	Najveća duljina bubnjišnog dijela sljepoočne kosti
31.	Najveća duljina pećinastog dijela sljepoočne kosti
32.	Duljina gornjeg lijevog niza zubnica mjerena od kaudalnog ruba zadnje zubnice do vrha "kljuna"
33.	Duljina od vrha "kljuna" do vrha izbočenosti sjekutičnih kostiju
34.	Širina kaudoverbalnog ruba rala
35.	Širina oralnog ruba bazalnog dijela zatiljne kosti u području šava s kaudalnim izdancima krilaste kosti
36.	Širina bazalnog dijela zatiljne kosti uz oralni rub izdanaka sljepoočne kosti sa zglobnom plohom za stilohoid

37.	Razmak između najlateralnijih točaka kaudoventralnih izdanaka krilastih kostiju
38.	Najveći promjer srednišnje zubnice lijeve gornje čeljusti
39.	Broj zubiju u gornjoj lijevoj čeljusti
40.	Broj zubiju u gornjoj desnoj čeljusti
41.	Broj zubiju u donjoj lijevoj čeljusti
42.	Broj zubiju u donjoj desnoj čeljusti
43.	Ukupni broj zubiju
44.	Broj zubnica gornje lijeve čeljusti
45.	Broj zubnica gornje desne čeljusti
46.	Broj zubnica donje lijeve čeljusti
47.	Broj zubnica donje desne čeljusti
48.	Ukupni broj zubnica
49.	Visina najvećeg zuba
50.	Najveći promjer najvećeg zuba
51.	Najveći promjer otvora zubne šupljine
52.	Duljina donjeg lijevog niza zubnica mjerena od kaudalnog ruba zadnje zubnice do vrha donje čeljusti
53.	Najveća duljina grane lijeve donje čeljusti
54.	Najveća visina grane lijeve donje čeljusti mjerena pod pravim kutem prema njenoj najvećoj duljini
55.	Najveća duljina lijevog mandibularnog otvora mjerena od oralnog ruba otvora do unutarnje površine kondila donje čeljusti
56.	Najveća visina kondila lijeve donje čeljusti
57.	Najveća širina kondila lijeve donje čeljusti
58.	Najveća duljina mandibularne simfize
59.	Asimetrija lubanje mjerena u stupnjevima

Tablica 3. Opis mjera koje sam preuzela iz radova drugih autora, te kako sam ih označila u ovom istraživanju

Mjere u ovom istraživanju	Đuras – Gomerčić (2006.)	Perrin (1975.)	Wang i sur. (2000.)	Walker (1981.)
1. – 32.		Table 2: 1.-32.		
33.			TPC	
34.			GWBS	
35.			WAS	
36.	58.			
37.			GWIN	
38.			ATW	
39. – 42.		Table 2: 33.-36.		
43. – 51.	65. – 73.			
52. – 55.		Table 2: 37.-40.		
56.	78.			
57.				120
58.	80.			
59.		Table 2: 41		



Slika 7. Prikaz nekih kranimetrijskih mjera. Preuzeto iz Perrin, 1975.

2. 3. Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA

2.3.1. Izolacija DNA iz tkiva

Ukupnu DNA izolirala sam prema prilagođenom protokolu za izolaciju DNA iz tkiva koristeći komplet Wizard Genomic DNA Purifikation Kit, Promega.

Macerirala sam 5 – 10 mg tkiva i prebacila ih u 1,5 ml tubice u koje sam prije toga dodala 300 µl Nuclei Lysis Solution i 4 – 5 sekundi vorteksirala. Potom sam uzorcima dodala 1,5 µl proteinaze K i ostavila da se preko noći inkubiraju na 55°C.

Uzorke sam ostavila da se ohlade na sobnoj temperaturi i dodala 100 µl Protein Precipitation Solution, te ih nakon 20 sekundi snažnog vorteksiranja stavila 5 minuta na led. Zatim sam ih 3 minute centrifugirala na 13 000 pri čemu je došlo do taloženja proteina dok je u supernatantu ostala DNA.

U nove 1,5 ml tubice odpipetirala sam 300 µl 100% etanola i dodala supernatant iz prethodnog koraka. Pažljivim okretanjem tubice promiješala sam ove dvije komponente i centrifugirala na 13 000 1 minutu kako bi se DNA istaložila. Supernatant sam dekantirala. Dodala sam 300 µl 70% etanola i pažljivo promiješala okretanjem tubice. Ponovno sam 1 minutu centrifugirala uzorke na 13 000 i odstranila supernatant. Nakon toga sam preokrenula tubice na čisti filter papir i ostavila ih par sati da se potpuno osuše na zraku. Dodala sam 100 µl DNA Rehydration Solution i inkubirala preko noći na 4°C. Izoliranu ukupnu DNA čuvala sam u hladnjaku na 4°C.

2.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Pomoću uzvodne početnice MTCRf (Hoelzel i Green, 1998) i nizvodne početnice DUPr (Pauk, 2007) metodom lančane reakcije polimerazom umnožila sam ciljno područje kontrolne regije mtDNA dugačko oko 900 pb iz izolirane ukupne DNA.

Pripremila sam reakcijsku smjesu za lančanu reakciju polimerazom:

15 µl	2x Multiplex PCR Master Mix
3 µl	10x smjese početnica Primer Mix
9 µl	deionizirane vode

U svaku PCR tubicu odpipetirala sam 27 μ l reakcijske smjese i po 3 μ l odgovarajuće ukupne DNA, odnosno 3 μ l destilirane vode za negativnu kontrolu, te je tako ukupni volumen po uzorku iznosio 30 μ l.

Temperatura i trajanje svakog koraka, te broj ciklusa pri izvođenju PCR reakcije bili su:

95° C, 15 minuta – početni aktivacijski korak: aktivacija Taq polimeraze

36 ciklusa: 94° C, 30 sekundi – denaturacija: razdvajanja lanaca DNA

62° C, 90 sekundi – prijanjanje: vezanje početnica na lance kalupa

72° C, 90 sekundi – produženje: sinteza novih lanaca

72° C, 20 minuta – završna ekstenzija: završno produljivanje lanaca

Po završetku reakcije uzorke sam ostavila peko noći u hladnjaku na 4° C.

2.3.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Kako bih provjerila uspješnost PCR reakcija provela sam elektroforezu na 1% agaroznom gelu. Gel sam pripremila tako što sam u 50 ml 0,5 x TBE pufera dodala 0,5 g agara i zagrijavala do vrenja uz povremeno miješanje dok se sav agar nije otopio. Potom sam otopini dodala 5 μ l Syber Safe boje i ponovno promiješala te izlila u kadicu za elektroforezu. U kadicu sam stavila češalj za jažice. Nakon 30 minuta gel se polimerizirao te sam ga, nakon pažljivog vađenja češlja, zajedno s kadicom stavila u uređaj za elektroforezu koji je bio ispunjen 0,5 x TBE puferom. S obzirom da je DNA negativno nabijena, kadicu s gelom položila sam tako da jažice budu bliže katodi pa će tako tijekom elektroforeze DNA putovati prema anodi.

Na parafilmu sam pomiješala 4 μ l pojedinog PCR proizvoda s 3 μ l pufera za nanošenje uzorka (engl. loading buffer). Ovih 7 μ l smjese nanijela sam u jažicu, zadnja jažica sadržavala je negativnu kontrolu ili 100 bp DNA Ladder. Uređaj za elektroforezu sam podesila tako da se proces odvija 60 minuta pod naponom od 90 V i jakosti struje od 400 mA.

Po završetku elektroforeze gel sam izvadila iz kadice te ga promatrala po UV svjetlom i zatim ga fotografirala.

2.3.4. Pročišćavanje PCR proizvoda

Uspješno umnožene PCR proizvode pročistila sam koristeći Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System, Promega, prema prilagođenom protokolu za purifikaciju.

PCR proizvodu dodala sam jednaki volumen, tj. 26 μ l Membrane Binding Solution te sam čitav volumen iz PCR tubice prebacila u kolonicu iz kompleta u koju sam prethodno stavila tubicu. Smjesu sam inkubirala 1 minutu na sobnoj temperaturi i centrifugirala 1 minutu na 14 000 rpm. Kolonicu sam maknula kako bih prolila tekućinu, zatim sam vratila kolonicu nazad u tubu. Ovim koracima postigla sam vezanje PCR proizvoda (umnožene ciljane DNA) na membranu kolonice.

Da na membrani kolonice dobijem čisti PCR proizvod provela sam pranje na membrani tako što sam u kolonicu dodala 700 μ l Membrane Wash Solution i 1 minutu centrifugirala na 14 000 rpm. Prolila sam tekućinu iz tube i vratila kolonicu u tubu. Potom sam dodala 500 μ l Membrane Wash Solution i centrifugirala na 14 000 rpm kroz 5 minuta. Nakon što sam prolila tekućinu iz tube i vratila kolonicu nazad u tubu, ponovno sam centrifugirala na 14 000 rpm 1 minutu.

Da bi došlo do eluciju PCR proizvoda s membrane prvo sam prebacila kolonice u čiste tube volumena 1,5 ml. U kolonice sam dodala 35 μ l Nuclease – Free Water i inkubirala 1 minutu na sobnoj temperaturi. Zatim sam 1 minutu centrifugirala na 14 000 rpm. Bacila sam kolonicu dok je u tubi ostalo pročišćeni PCR proizvod.

2.3.5. Sekvenciranje PCR proizvoda i analiza sljedova

Pročišćene PCR proizvode i uzvodnu početnicu poslala sam u servis MacroGen na sekvenciranje.

Sravnjivanje dobivenih sekvenci provela sam u programskim paketima BioEdit (Hall 1999), a programom Arlequin (Excoffier 2005) identificirala sam polimorfna nukleotidna mjesta, procijenila sam učestalosti haplotipova, genetičke udaljenosti između sljedova kontrolne regije mtDNA i osnovne indekse raznolikosti (genska ili haplotipska raznolikost i nukleotidna raznolikost) unutar populacije Jadranskog dupina.

Haplotipovi jadranskih dupina uspoređeni su pomoću programa Arlequin (Excoffier, 2005) s haplotipovima dostupnim u GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Polimorfna ili varijabilna nukleotidna mjesta jesu mjesta u slijedu mtDNA koja su podložna mutaciji. Prema polimorfnim mjestima razlikujemo haplotipove.

Genetička udaljenost između parova haplotipova jest broj različitih nukleotida između svih parova haplotipova unutar istraživanog uzorka.

Genska raznolikost ili haplotipska raznolikost (engl. gene diversity, haplotype diversity), H predstavlja vjerojatnost da su dva iz uzorka nasumično odabrana haplotipa različita. Genska raznolikost je ekvivalentna očekivanoj heterozigotnosti za diploidne podatke (Nei 1987).

Nukleotidna raznolikost (engl. nucleotide diversity), Π definirana je kao srednji broj nukleotidnih razlika po nukleotidnom mjestu između dva nasumično odabrana homologna slijeda. Odnosno, nukleotidna raznolikost predstavlja vjerojatnost da su dva nasumično odabrana homologna nukleotida različita, te je ekvivalentna genskoj raznolikosti, a razlika je u tome što se nukleotidna raznolikost odnosi na pojedine nukleotide, a ne na cijele sljedove.

3. REZULTATI

3. 1. Rezultati kranimetrijskih mjerenja

Prema Đuras Gomerčić (2006) kosti glave potpuno su srasle u jedinki jadranskih dobrih dupina starijih od pet godina, izuzev nosnih kostiju koje u nekih jedinki ne srastu niti do 20 godine.

Izmjerila sam 46 lubanja odraslih životinja i svojim podacima pridodala kranimetrijske vrijednosti odraslih dupina preuzetih iz dizertacije Đuras Gomerčić (2006), te sam ukupno 96 lubanja obradila u računalnom programu Statistika 7.

Odredila sam srednju vrijednost i standardnu devijaciju, maksimalnu i minimalnu vrijednost, te broj obrađenih životinja za svaku mjeru (tjelesna masa, starost, ukupna duljina tijela i kranimetrijske mjere). Rezultate sam prikazala odvojeno po spolovima i ukupno za sve životinje. Eventualne razlika za pojedine mjere između mužjaka i ženki izračunala sam pomoću t-testa i Bonferronijeva korekcija, te sam ih izrazila u postocima (tablica 4.).

T – testom sam usporedila jadransku populaciju dobrog dupina s populacijama dobrog dupina iz Sredozemnog mora, Crnog mora, istočnog Atlantika, Sjevernog mora, mora oko sjeverozapadne Afrike, oko Južnoafričke Republike, oko Floride te mora oko Kine i Australije (tablica 5., 6. i 7.).

Tablica 4. Prikaz opisa jadranske populacije dobrog dupina. Vrijednosti tjelesne mase (kg), dobi (godine), ukupna duljina tijela (UDT, cm), omjer kondilobazalne duljine i UDT (1./UDT) i kranimetrijske mjere (cm) prikazane su odvojeno po spolovima i ukupno. Za svaku mjeru prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrijednost, te broj jedinki. Prikazana razlika između spolova p (* p < 0,05; ** p < 0,01), prema Bonferronijevoj korekciji (B*) i u postotku (%), predznak "-" označava da je srednja vrijednost mjere veća kod ženki).

Mjera	Ukupno	Mušjaci	Ženke	p	Bonferronijeva korekcija	Razlika (%)
Tjelesna masa	204,56 ± 52,39 (110,0 – 324,0); 75	215,86 ± 59,32 (110,0 – 324,0); 40	191,64 ± 40,19 (119,0 – 298,0); 35	0,0450*		11,8
Dob	16,58 ± 5,95 (5,0 – 28,0); 84	16,62 ± 6,07 (6,0 – 28,0); 39	16,57 ± 5,97 (5,0 – 26,0); 44	0,9716		0,3
UDT	274,82 ± 21,19 (200,0 – 322,0); 88	280,40 ± 22,07 (215,0 – 322,0); 42	271,27 ± 16,25 (210,0 – 299,0); 45	0,0298*		3,3
1./UDT	0,1867 ± 0,0246	0,1865 ± 0,0136 (0,164 – 0,219); 38	0,1901 ± 0,0103 (0,176-0,223); 42	0,0919		-1,9
1.	51,54 ± 2,04 (45,3 – 56,0); 84	51,90 ± 2,09 (45,7 – 55,2); 39	51,35 ± 1,86 (45,3 – 56,0); 42	0,2120		1,1
2.	29,00 ± 1,48 (24,1 – 31,8); 86	29,11 ± 1,65 (24,1 – 31,8); 40	29,03 ± 1,21 (25,5 – 31,5); 43	0,8072		0,3
3.	13,13 ± 0,82 (10,5 – 15,2); 94	13,29 ± 0,75 (11,4 – 14,5); 43	13,07 ± 0,80 (10,5 – 15,2); 46	0,1916		1,6
4.	10,13 ± 0,68 (8,0 – 11,7); 91	10,42 ± 0,62 (8,6 – 11,7); 41	9,94 ± 0,51 (8,2 – 10,8); 45	0,0002**	B*	4,8
5.	8,62 ± 0,62 (7,1-10,9); 84	8,84 ± 0,58 (7,6 – 10,9); 40	8,45 ± 0,57 (7,1 – 9,6); 41	0,0037**	B*	4,5
6.	4,77 ± 0,41 (3,9 – 5,6); 86	4,91 ± 0,40 (3,9 – 5,6); 40	4,64 ± 0,35 (4,0 – 5,5); 43	0,0016**	B*	5,7
7.	6,75 ± 0,56 (5,5 – 8,0); 83	6,94 ± 0,47 (5,8 – 7,9); 40	6,58 ± 0,60 (5,5 – 8,0); 41	0,0039**	B*	5,3
8.	34,47 ± 1,68 (29,2 – 37,5); 86	34,56 ± 1,87 (29,2 – 37,5); 40	34,51 ± 1,36 (30,5 – 37,0); 43	0,8874		0,1
9.	34,94 ± 1,65 (29,5 – 38,0); 78	35,09 ± 1,75 (29,5 – 37,7); 39	34,94 ± 1,40 (31,2 – 38,0); 36	0,6892		0,4
10.	22,91 ± 1,16 (19,0 – 25,4); 93	23,44 ± 1,09 (20,4 – 25,4); 43	22,50 ± 0,92 (19,0 – 25,0); 45	0,0000**	B*	4,1
11.	25,75 ± 1,24 (21,4 – 28,7); 92	26,27 ± 1,14 (22,8 – 28,7); 43	25,37 ± 1,02 (21,4 – 28,0); 44	0,0002**	B*	3,5

12.	22,99 ± 1,14 (19,2 – 25,5); 94	23,47 ± 1,05 (20,3 – 25,5); 43	22,68 ± 0,92 (19,3 – 25,0); 46	0,0003**	B*	3,4
13.	5,74 ± 0,29 (5,0 – 6,4); 94	5,77 ± 0,30 (5,0 – 6,4); 43	5,73 ± 0,28 (5,2 – 6,4); 46	0,4790		0,8
14.	25,57 ± 1,42 (20,7 – 28,8); 89	26,07 ± 1,35 (23,0 – 28,8); 43	25,25 ± 1,15 (20,7 – 27,0); 41	0,0037**	B*	3,2
15.	9,63 ± 0,53 (8,6 – 11,0); 94	9,77 ± 0,57 (8,6 – 11,0); 43	9,53 ± 0,44 (8,6 – 10,6); 46	0,0243*		2,6
16.	21,00 ± 1,00 (18,8 – 25,0); 92	21,13 ± 1,04 (19,6 – 25,0); 43	20,90 ± 0,99 (18,8 – 24,0); 44	0,2770		1,1
17.	15,04 ± 0,71 (13,5 – 17,2); 91	15,25 ± 0,72 (13,8 – 17,2); 43	14,87 ± 0,62 (13,6 – 16,5); 43	0,0093**		2,6
18.	15,16 ± 0,89 (13,5 – 17,1); 88	15,44 ± 0,98 (13,9 – 17,1); 40	14,94 ± 0,76 (13,5 – 16,5); 43	0,0114*		3,3
19.	11,46 ± 0,79 (9,7 – 13,9); 91	11,67 ± 0,91 (10,2 – 13,9); 42	11,34 ± 0,60 (9,7 – 12,3); 44	0,0525		2,8
20.	8,52 ± 0,66 (7,1 – 10,0); 91	8,66 ± 0,66 (7,2 – 10,0); 42	8,44 ± 0,62 (7,2 – 9,7); 44	0,1042		2,6
21.	6,76 ± 0,56 (5,1 – 7,9); 92	6,86 ± 0,51 (5,8 – 7,9); 42	6,67 ± 0,55 (5,1 – 7,8); 45	0,0964		2,8
22.	5,23 ± 0,56 (3,5 – 6,5); 92	5,40 ± 0,48 (4,2 – 6,5); 42	5,11 ± 0,54 (3,5 – 6,2); 45	0,0083**		5,7
23.	1,60 ± 0,53 (0,2 – 2,8); 75	1,77 ± 0,43 (0,9 – 2,8); 37	1,44 ± 0,57 (0,2 – 2,6); 37	0,0060**		20,8
24.	4,98 ± 0,84 (3,4 – 7,9); 92	5,22 ± 0,81 (3,8 – 7,4); 43	4,69 ± 0,83 (3,4 – 7,9); 44	0,0033**	B*	10,7
25.	6,45 ± 0,30 (5,4 – 7,2); 92	6,50 ± 0,30 (5,8 – 7,2); 43	6,41 ± 0,31 (5,4 – 7,0); 44	0,2116		1,3
26.	5,33 ± 0,59 (3,2 – 6,3); 93	5,60 ± 0,42 (4,5 – 6,3); 43	5,16 ± 0,58 (3,7 – 6,2); 45	0,0001**	B*	8,2
27.	7,56 ± 0,52 (6,3 – 8,9); 93	7,63 ± 0,53 (6,4 – 8,9); 43	7,50 ± 0,48 (6,3 – 8,5); 45	0,2165		1,8
28.	7,60 ± 0,60 (6,4 – 9,1); 78	7,75 ± 0,65 (6,4 – 9,1); 41	7,46 ± 0,45 (6,7 – 8,4); 32	0,0342*		3,8
29.	2,55 ± 1,13 (0,6 – 5,0); 92	2,73 ± 1,13 (1,1 – 5,0); 43	2,30 ± 1,07 (0,6 – 4,7); 44	0,0723		16,8

30.	3,85 ± 0,14 (3,4 – 4,2); 90	3,88 ± 0,13 (3,6 – 4,1); 43	3,83 ± 0,15 (3,4 – 4,2); 43	0,0990		1,3
31.	3,43 ± 0,17 (2,9 – 3,9); 90	3,46 ± 0,20 (2,9 – 3,9); 43	3,41 ± 0,14 (3,2 – 3,7); 43	0,1739		1,5
32.	24,22 ± 1,33 (20,1 – 27,0); 86	24,32 ± 1,45 (20,1 – 26,8); 40	24,27 ± 1,11 (21,5 – 27,0); 43	0,8597		0,2
33.	16,69 ± 1,64 (12,8 – 22,0); 85	17,08 ± 1,72 (12,8 – 20,3); 39	16,47 ± 1,45 (13,3 – 22,0); 43	0,0841		3,7
34.	4,24 ± 0,70 (2,1 – 6,3); 92	4,25 ± 0,74 (2,1 – 6,3); 42	4,30 ± 0,64 (2,5 – 5,7); 45	0,7485		-1,1
35.	8,04 ± 0,59 (6,5 – 9,6); 92	8,16 ± 0,57 (6,9 – 9,4); 42	8,00 ± 0,53 (6,7 – 9,6); 45	0,1695		2,0
36.	12,78 ± 0,66 (10,4 – 14,4); 92	12,85 ± 0,62 (11,5 – 14,4); 42	12,79 ± 0,62 (11,0 – 14,1); 45	0,6588		0,5
37.	6,03 ± 0,52 (4,2 – 7,3); 64	6,08 ± 0,58 (4,2 – 7,3); 35	6,00 ± 0,41 (5,1 – 6,6); 25	0,5485		1,3
38.	1,13 ± 0,14 (0,8 – 1,7); 92	1,18 ± 0,15 (0,9 – 1,7); 42	1,09 ± 0,12 (0,8 – 1,4); 45	0,0035**	B*	7,7
39.	20,71 ± 2,80 (5,0 – 25,0); 82	20,95 ± 2,51 (12,0 – 24,0); 40	20,44 ± 3,09 (5,0 – 25,0); 41	0,4172		2,5
40.	20,29 ± 3,30 (2,0 – 25,0); 83	20,50 ± 3,17 (8,0 – 25,0); 40	20,12 ± 3,49 (2,0 – 23,0); 42	0,6067		1,9
41.	20,18 ± 2,80 (4,0 – 25,0); 80	20,29 ± 2,57 (8,0 – 24,0); 38	20,07 ± 3,06 (4,0 – 25,0); 41	0,7356		1,1
42.	20,40 ± 1,68 (13,0 – 24,0); 80	20,63 ± 1,42 (17,0 – 24,0); 38	20,20 ± 1,90 (13,0 – 24,0); 41	0,2543		2,1
43.	80,00 ± 14,10 (2,0 – 94,0); 85	80,33 ± 13,67 (20,0 – 94,0); 40	79,68 ± 14,78 (2,0 – 92,0); 44	0,8370		0,8
44.	22,55 ± 1,38 (17,0 – 26,0); 83	22,55 ± 1,55 (17,0 – 26,0); 38	22,56 ± 1,22 (19,0 – 25,0); 43	0,9858		0,0
45.	22,65 ± 1,29 (20,0 – 25,0); 81	22,66 ± 1,30 (20,0 – 25,0); 38	22,61 ± 1,26 (20,0 – 25,0); 41	0,8679		0,2
46.	22,05 ± 1,42 (19,0 – 26,0); 84	22,15 ± 1,53 (19,0 – 26,0); 39	21,98 ± 1,34 (19,0 – 25,0); 44	0,5765		0,8
47.	22,02 ± 1,54 (18,0 – 27,0); 84	22,18 ± 1,71 (18,0 – 27,0); 39	21,91 ± 1,38 (19,0 – 25,0); 44	0,4285		1,2

48.	84,90 ± 15,73 (18,0 – 100,0); 86	82,07 ± 20,73 (18,0 – 100,0); 42	87,51 ± 8,09 (47,0 – 98,0); 43	0,1133		-6,4
49.	3,35 ± 0,33 (2,3 – 4,1); 83	3,43 ± 0,28 (2,8 – 4,1); 38	3,28 ± 0,35 (2,3 – 3,8); 44	0,0405*		4,5
50.	0,82 ± 0,08 (0,6 – 1,1); 83	0,83 ± 0,07 (0,6 – 0,9); 38	0,82 ± 0,09 (0,7 – 1,1); 44	0,7179		0,8
51.	0,20 ± 0,15 (0,1 – 0,7); 83	0,21 ± 0,13 (0,1 – 0,6); 38	0,18 ± 0,16 (0,1 – 0,7); 44	0,3156		16,4
52.	24,29 ± 1,40 (18,7 – 27,2); 88	24,56 ± 1,31 (20,6 – 27,2); 40	24,28 ± 1,13 (21,8 – 26,7); 45	0,2921		1,2
53.	44,36 ± 1,89 (37,0 – 48,0); 88	44,70 ± 1,82 (39,9 – 48,0); 40	44,34 ± 1,43 (40,0 – 47,0); 45	0,3138		0,8
54.	9,78 ± 0,45 (8,5 – 10,9); 85	9,86 ± 0,42 (8,6 – 10,8); 40	9,68 ± 0,44 (8,5 – 10,5); 42	0,0671		1,8
55.	14,67 ± 0,83 (12,5 – 17,0); 89	14,71 ± 0,85 (12,5 – 17,0); 41	14,70 ± 0,82 (13,0 – 16,7); 45	0,9479		0,1
56.	4,12 ± 3,44 (2,9 – 36,0); 89	3,85 ± 0,34 (3,2 – 4,8); 40	4,41 ± 4,83 (3,1 – 36,0); 45	0,4656		-13,6
57.	2,87 ± 0,33 (2,0 – 3,7); 89	3,00 ± 0,31 (2,5 – 3,7); 40	2,78 ± 0,28 (2,2 – 3,4); 45	0,0013**	B*	7,5
58.	6,57 ± 0,90 (3,4 – 8,0); 87	6,64 ± 0,79 (4,1 – 8,0); 39	6,69 ± 0,74 (4,6 – 7,9); 45	0,7645		-0,8
59.	4,62 ± 1,60 (2,0 – 9,0); 93	4,79 ± 1,69 (2,0 – 9,0); 42	4,42 ± 1,50 (2,0 – 8,0); 46	0,2900		7,8

Tablica 5. Prikaz kranimetrijskih mjera populacija iz svjetskih mora. Za ukupnu duljinu tijela i kranimetrijske mjere (cm) prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrijednost, te broj jedinki. Mjere kod kojih je utvrđena statistički značajna razlika s ekvivalentnom mjerom u dobrim dupina iz Jadrana označene su oznakom * za $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$. LIG + BAL + ALBOR. MORE skraćenice su od Ligursko, Balearsko i Alboransko more.

MJERE (cm)	Sharir (2011) MORE OKO IZRAELA	Sharir (2011) JADRAN, ITALIJA	Sharir (2011) TIRENSKO MORE	Sharir (2011) LIG+BAL+ALBOR. MORE	Sharir (2011) ZAPADNI MEDITERAN ZAJEDNO
1.	49,7 ± 1,88 (46,8 - 54,0); 40 **	52,1 ± 1,37 (50,5 - 55,4); 19	52,1 ± 1,57 (50,1 - 55,5); 12	52,5 ± 1,39 (50,6 - 55,0); 9	52,18 ± 1,47
1./UDT	0,195 ± 0,015; 14				0,192 ± 0,017

Tablica 6. Prikaz kranimetrijskih mjera populacija iz svjetskih mora. Za ukupnu duljinu tijela i kranimetrijske mjere (cm) prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrijednost, te broj jedinki. Mjere kod kojih je utvrđena statistički značajna razlika s ekvivalentnom mjerom u dobrim dupina iz Jadrana označene su oznakom * za $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$. Skraćenica JAR označava Južnoafrička Republika.

MJERE (cm)	Viaud - Martineza (2008) CRNO MORE	Viaud - Martineza (2008) ZAPADNI MEDITERAN	Viaud - Martineza (2008) ISTOČNI ATLANTIK	Charlton - Robb (2011) AUSTRALIJA	Wang (2000) KINESKE VODE	Ross (1977) JAR
1.	45,23 (max 50,3); 27 **	52,03; 18 *	53,74; 18 **	52,79 (50,55 - 54,7); 13 **	50,62 ± 3,34 (39,44 - 56,11); 50*	54,58 ± 2,62 (50,40 - 57,80); 9 **
1./UDT	0,206 **	0,192	0,178 **			
2.				30,37 (29,15 - 32,6); 13 **	28,38 ± 2,35 (20,35 - 31,96); 49	30,91 ± 1,80 (28,31 - 33,46); 9 **
3.				14,31 (13,63 - 15,89); 13 **	13,45 ± 1,12 (9,81 - 15,41); 49	14,28 ± 1,08 (12,70 - 15,78); 9 **
4.				10,61 (9,79 - 11,76); 13 **		
5.				8,89 (7,93 - 10,08); 13 **	8,4 ± 0,89 (4,5 - 10,15); 46	8,86 ± 1,05 (7,31 - 10,58); 9
6.				5,02 (4,24 - 5,83); 13 **		
7.				7,09 (5,77 - 8,27); 13 **	6,43 ± 0,78 (4,47 - 8,04); 47 **	6,69 ± 0,97 (5,59 - 8,50); 9

8.				35,32 (33,7 – 37,55); 13 **	33,52 ± 2,67 (24,35 – 37,52); 49 *	36,45 ± 1,82 (33,72 – 38,69); 9 **
9.				36,06 (33,9 – 37,5); 13 **		
10.				23,76 (22,4 – 25,1); 13 **	23,18 ± 1,86 (17,15 – 26,25); 49	25,34 ± 1,55 (22,98 – 27,69); 9 **
11.				26,86 (25,3 – 28,65); 13 **	25,46 ± 1,95 (18,72 – 28,66); 50	27,73 ± 1,71 (25,39 – 30,11); 9 **
12.					22,45 ± 1,82 (16,32 – 25,41); 50 *	25,04 ± 1,67 (22,88 – 26,98); 6 **
13.				5,89 (5,42 – 6,41); 13 **	5,77 ± 0,38 (4,95 – 6,76); 50	6,22 ± 0,49 (5,49 – 6,82); 6 **
14.				26,33 (24,6 – 27,8); 13 **	25,73 ± 2,05 (18,86 – 29,00); 50	28,23 ± 1,95 (25,70 – 31,30); 9 **
15.				9,79 (8,91 – 11,06); 13 **	9,35 ± 0,69 (7,65 – 10,74); 50 **	10,12 ± 0,58 (8,82 – 10,81); 9 **
16.				19,02 (18,16–19,63); 13 **		
21.				11,59 (10,88–12,56); 13 **		
22.				8,43 (7,69 – 8,99); 13 **		
25.				6,91 (6,10 – 7,72); 13 **		
26.				6,22 (5,42 – 7,0); 13 **	6,00 ± 0,64 (4,08 – 7,19); 49 **	6,37 ± 0,64 (5,29 – 7,10); 8 **
28.				7,59 (6,72 – 8,23); 13		
30.				3,74 (3,49 – 3,89); 8 **		
32.				25,31 (24,0 – 26,7); 13 **	24,36 ± 2,05 (17,20 – 27,77); 49	24,24 ± 4,58 (15,40 – 27,69); 6
33.				17,68 (14,71–20,68); 12 **		
34.				4,99 (3,58 – 6,35); 13 **		

35.				8,55 (7,93 – 9,76); 13 **		
37.				7,67 (7,05 – 8,48); 13 **		
39.				23,36 (20 - 26); 11 **	23,9 ± 1,39 (21 - 27); 54 **	24,2 ± 0,67 (23 - 25); 9 **
40.				23,37 (20 - 26); 11 **	23,8 ± 1,42 (20 - 27); 54 **	23,8 ± 0,83 (22 - 25); 9 **
41.				22,09 (20 - 24); 11 **	23,1 ± 1,54 (19 - 27); 54 **	22,6 ± 0,73 (22 - 24); 9 *
42.				22,18 (20 - 25); 11 **	23,0 ± 1,54 (20 - 27); 54 **	22,6 ± 1,01 (21 - 24); 9 **
43.					93,9 ± 5,09 (80 - 106); 54 **	93,1 ± 2,37 (88 - 96); 9 **
52.				24,78 (22,95 – 26,4); 13 **	24,34 ± 1,82 (18,77 – 27,87); 51	24,98 ± 1,21 (23,79 – 26,92); 5
53.				45,75 (43,3 – 47,4); 13 **	43,43 ± 2,96 (34,08 – 48,08); 51 *	46,61 ± 2,67 (42,59 – 49,82); 9 **
54.				9,75 (8,92 – 10,51); 13	9,14 ± 0,78 (6,10 – 10,44); 51 **	10,01 ± 0,64 (9,01 – 10,98); 9
55.				14,96 (13,22–16,39); 13**		
58.				7,30 (5,11- 8,78); 13 **		

Tablica 7. Prikaz kranimetrijskih mjera populacija iz svjetskih mora. Za ukupnu duljinu tijela i kranimetrijske mjere (cm) prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrijednost, te broj jedinki. Mjere kod kojih je utvrđena statistički značajna razlika s ekvivalentnom mjerom u dobrim dupina iz Jadrana označene su oznakom * za $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$

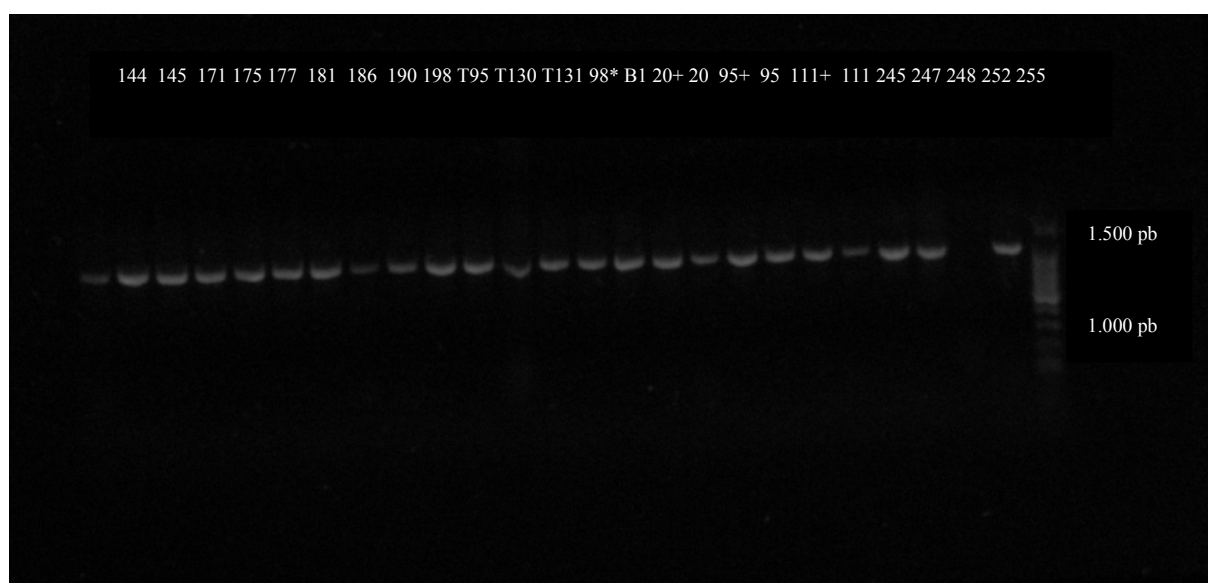
MJERE (cm)	Robineau (1997) NW AFRIKA	Robineau (1997) SJEVERNO MORE	Hersh (1990) INDIAN I BANANA RIVER, E FLORIDA, Ž	Hersh (1990) INDIAN I BANANA RIVER, E FLORIDA, M
UDT			239,1 ± 20,0; 50 **	237,9 ± 27,5; 55 **
1.	56,9 ± 1,71 (54,0 – 61,0); 53 **	55,4 ± 0,95 (54,0 – 57,3); 34 **	45,16 ± 2,13; 33 **	44,71 ± 1,73; 36 **
2.	33,2 ± 1,25 (30,8 – 36,2); 53 **	30,9 ± 0,79 (29,7 – 32,4); 34 **	24,75 ± 1,34; 33 **	24,51 ± 1,16; 36 **
3.	13,7 ± 0,70 (12,4 – 15,4); 52 **	15,5 ± 0,58 (14,0 – 16,5); 34 **	10,81 ± 0,67; 33 **	10,70 ± 0,83; 36 **
4.			8,50 ± 0,51; 33 **	8,56 ± 0,63; 35 **
5.			7,22 ± 0,45; 31 **	7,31 ± 0,53; 35 **
6.			3,76 ± 0,27; 33	3,83 ± 0,36; 36 **
8.			29,82 ± 1,57; 33 **	29,53 ± 1,33; 36 **
9.			29,70 ± 1,62; 32 **	29,24 ± 1,40; 36 **
10.			19,69 ± 1,10; 33 **	19,68 ± 1,19; 36 **
11.			22,85 ± 1,39; 33 **	22,86 ± 1,45; 36 **
12.			19,56 ± 1,10; 33 **	19,48 ± 1,36; 36 **
13.			5,49 ± 0,33; 33 **	5,41 ± 0,22; 35 **
14.			22,83 ± 1,39; 33 **	22,83 ± 1,44; 36 **
15.			8,62 ± 0,42; 33 **	8,60 ± 0,39; 35 **
16.	19,00 ± 0,83 (17,3 – 20,8); 52 **	22,0 ± 0,79 (20,4 – 23,7); 34 **	17,77 ± 0,59; 33 **	18,05 ± 0,58; 35 **
19.			10,14 ± 0,75; 33 **	10,10 ± 0,64; 36 **
20.			7,69 ± 0,60; 33 **	7,89 ± 0,60; 36 **

25.			6,16 ± 0,27; 33 **	6,24 ± 0,20; 35 **
26.			4,67 ± 0,42; 32 **	4,73 ± 0,46; 35 **
27.			6,42 ± 0,62; 33 **	6,38 ± 0,38; 36 **
28.			6,63 ± 0,54; 28 **	6,46 ± 0,44; 33 **
30.			3,73 ± 0,10; 30 **	3,74 ± 0,11; 30 **
31.			3,22 ± 0,16; 31 **	3,15 ± 0,10; 28 **
32.			21,54 ± 1,21; 33 **	21,33 ± 1,05; 36 **
39.	23,0 ± 1,2 (20 – 27); 52 **	24,0 ± 1,6 (19 – 28); 50 **	23,8 ± 1,0; 33 **	24,7 ± 1,1; 32 **
40.	22,9 ± 1,3 (20 – 26); 53 **	24,0 ± 1,3 (21 – 27); 52 **	23,7 ± 1,1; 30 **	24,6 ± 1,0; 33 **
41.	22,3 ± 1,5 (20 – 25); 26 **	23,6 ± 1,3 (21 – 27); 52 **	23,3 ± 1,5; 33 **	24,1 ± 1,0; 34 **
42.	22,4 ± 1,5 (20 – 26); 25 **	23,6 ± 1,3 (21 – 27); 50 **	23,4 ± 1,3; 33 **	24,3 ± 1,1; 35 **
52.			21,78 ± 1,15; 32 **	21,75 ± 1,04; 33 **
53.			38,02 ± 2,00; 32 **	37,75 ± 1,75; 33 **
54.			8,30 ± 0,42; 26 **	8,45 ± 0,43; 29 **
55.			12,38 ± 0,77; 33 **	12,20 ± 0,64; 34 **

3. 2. Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA

3.2.1. Uspješnost umnažanja dijela kontrolne regije mtDNA

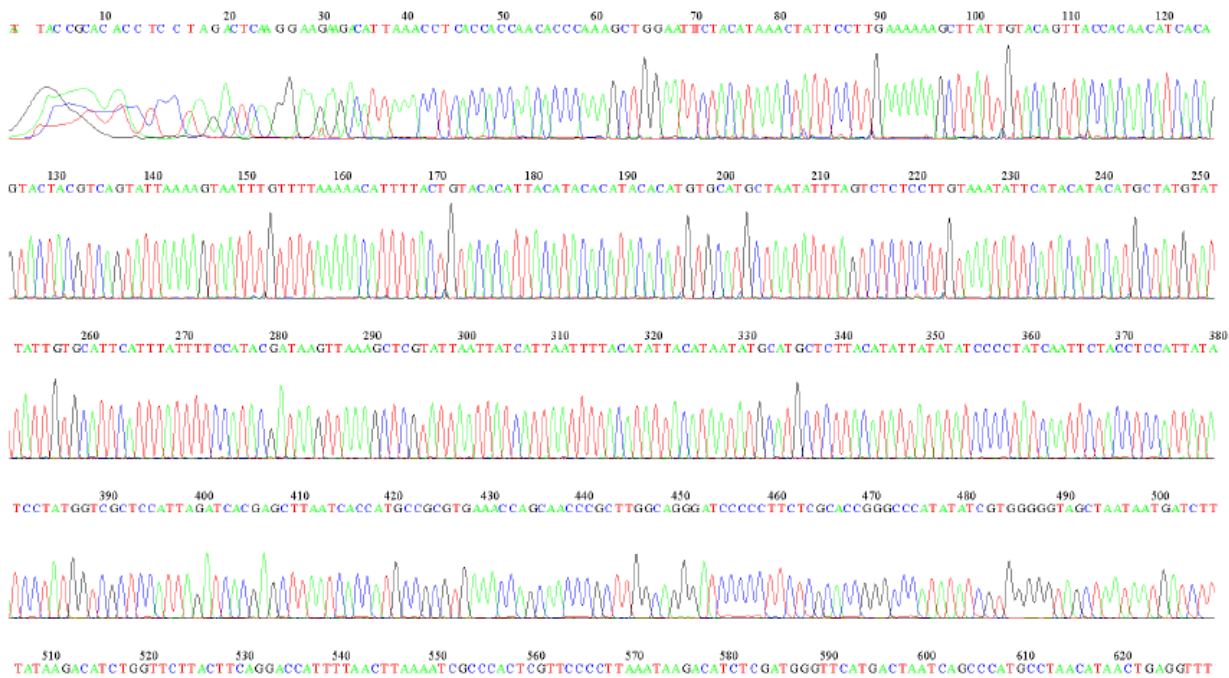
Elektroforezom na 1% agaroznom gelu provjerila sam uspješnost umnažanja željenog dijela kontrolne regije mtDNA metodom lančane reakcije polimerazom (slika 8.). Od ukupno 42 PCR proizvoda uzorci 218, 220, 239 i 252 nisu uspješno umnoženi, te ove uzorke nisam uključila u daljnje analize.



Slika 8. Fotografija gela nakon elektroforeze PCR proizvoda: 25 uzoraka od kojih uzorak 252 nije uspio i marker 100 bp DNA Ladder

3. 2. 2. Uspješnost sekvenciranja dijela kontrolne regije mtDNA

Korištenjem početnice MTCRf u reakciji sekvenciranja ciljnog područja kontrolne regije mtDNA dobiveni su sljedovi duljine oko 900 pb (slika 9.). Sljedovi uzoraka 144 i 236 bili su loše kvalitete odnosno uspješno je sekvencirano 36 od 38 uzoraka (uspješnost sekvenciranja iznosi 94, 7%).



Slika 9.: Kromatogram, dio slijeda kontrolne regije uzorka 255 dobiven reakcijom sekvenciranja početnicom MTCRf

3. 2. 3. Analiza sljedova

Početni i krajnji dio svih sljedova bili su loše kvalitete. Odabrala sam dio slijeda bliži 5' kraju, duljine 739 pb, koji je bio nedvosmislen u svih jedinki.

Sravnane sljedove kontrolne regije mt DNA dobrog dupina dobivene u ovom istraživanju analizirala sam zajedno sa sljedovima preuzetim iz Galov (2007) i neobjavljenim sljedovima, što je ukupno činilo 108 sljedova dobrog dupina iz Jadranskog mora.

Utvrđila sam da unutar 108 jedinki postoji 11 različitih haplotipova s 26 polimorfni mjesta što čini 3,5% od ukupnog slijeda (slika 10.).

Tablica 8. prikazuje raspodjelu jedinki po haplotipovima i učestalost pojedinog haplotipa. Od 11 haplotipa njih šest (DD06, DD07, DD08, DD09, DD10 i DD11) su zastupljeni samo jednom jedinkom. Najučestaliji haplotip je DD01 kojeg je dijelilo 65 jedinki (zastupljenost 60,2%). Talijanski uzorak T101, nađen pored Ravenne, dijeli haplotip s jedinkama iz hrvatskog dijela Jadrana (DD01), dok se drugi talijanski uzorak T95, nađen u Veneciji, odvojio u vlastiti haplotip DD11.

Tablica 8. Prikaz raspodjele jedinki dobrog dupina po pojedinim haplotipovima i učestalost tih haplotipova

Haplotip	Uzorak	Broj jedinki	Učestalost (%)
DD01	22, 32, 38, 41, 46, 51, 55, 57, 80, 87,91, 93, 95, 101, 102, 108, 113, 118, 120, 124, 126, 127, 129, 134, 136, 138, 139, 142, 161, 162, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 175, 186, 195, 196, 197, 200, 202, 204, 206, 207, 209, 211, 212, 215, 216, 219, 221, 222, 225, 227, 228, 231, 232, 234, 235, 245, B1, T101	65	60,2
DD02	28, 104, 117, 141, 143, 151, 152, 177, 183, 184, 193, 214, 241	13	12
DD03	111, 114, 131, 145, 149, 159, 160, 205, 247, 248, 255	11	10,2
DD04	112, 174, 181, 190, 198, 203, 233	7	6,48
DD05	20, 64, 128, 192, 217, 237	6	5,56
DD06	133	1	0,926
DD07	150	1	0,926
DD08	194	1	0,926
DD09	210	1	0,926
DD10	223	1	0,926
DD11	T95	1	0,926

Udaljenost haplotipova, koja se temelji na broju različitih nukleotida između parova haplotipova, prikazala sam u tablici 9. Najveća udaljenost je između haplotipova DD01 i DD09 te haplotipova DD07 i DD09, koji se međusobno razlikuju u 19 nukleotida. Najmanje

su međusobno udaljeni ovih pet parova haplotipova: DD01 i DD06, DD01 i DD07, DD02 i DD08, DD03 i DD11, te DD05 i DD10. Najviše parova razlikuje se u 16 nukleotida (9 parova) a po jedan par se razlikuju u 8 odnosno 9 nukleotida.

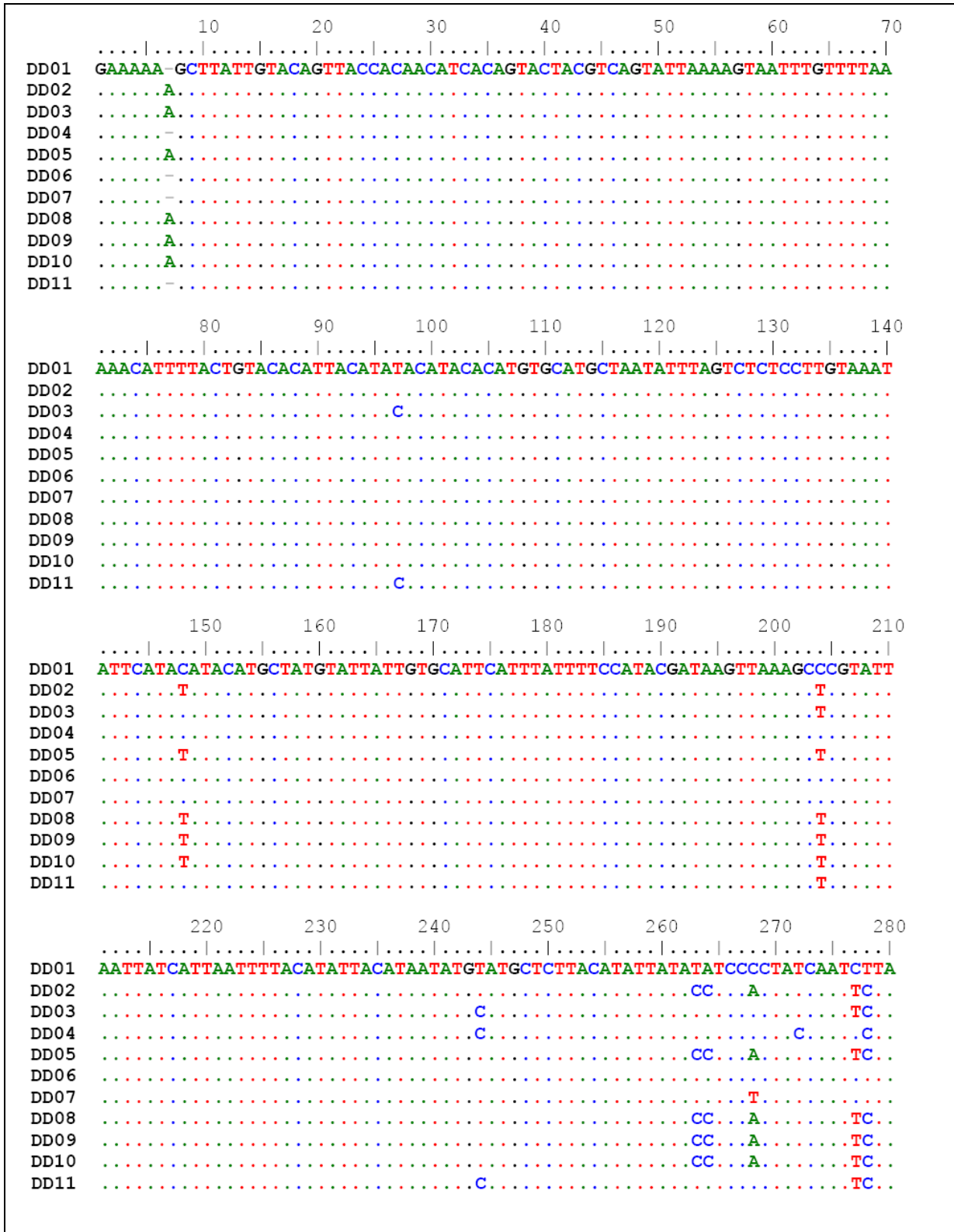
Genska ili haplotipska raznolikost (H) iznosi $0,6108 \pm 0,0494$, a nukleotidna raznolikost iznosi $0,010452 \pm 0,005435$.

Uspoređeno je 11 haplotipova iz Jadranskog mora utvrđenih u ovom diplomskom radu s haplotipovima pohranjenim u GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), te su svi svedeni na duljinu od 493 pb. Koristili smo 39 haplotipova od Natoli i sur. (2005), i to šest iz Crnog mora, 11 iz istočnog Sredozemlja i 12 iz zapadnog Sredozemlja, te 16 haplotipova od Mirimin i sur. (2011) iz populacije dobrog dupina Atlantskog oceana kod Irske.

Utvrđeno je da se jadranski haplotip DD01 podudara s haplotipovima AATt2 iz zapadnog Sredozemlja, Tt27497 iz istočnog Sredozemlja i s haplotipom BS1 iz Crnog mora (Natoli i sur. 2005), te s irskim haplotipom Ire5 (Mirimin i sur. 2011). Jadranski haplotip DD03 podudara se s haplotipom TUR2 iz istočnog Sredozemlja (Natoli i sur. 2005). Haplotip DD04 podudara se s istočnomediteranskim haplotipom Tt2/97 (Natoli i sur. 2005). Haplotip jadranske populacije DD06 podudara se s haplotipom iz istočnog Sredozemlja TtFil (Natoli i sur. 2005). Haplotip DD07 nije se podudarao niti s jednim haplotipom dostupnim u GenBank bazi, te je ovaj novopronađeni haplotip jedinstven. S haplotipom iz zapadnog Sredozemlja AATt25 podudara se jadranski haplotip DD09, a haplotip LIDO iz zapadnog Sredozemlja podudara se s jadranskim DD11 (Natoli 2005). Skraćivanjem sekvenci značajno se smanjila razlučivost haplotipova, pa su tako haplotipovi DD02, DD05, DD08 i DD10 spojeni u jedan te se podudaraju s haplotipovima CL529 i TtG20 iz istočnog Sredozemlja (Natoli 2005).

Tablica 9. Udaljenost između parova haplotipova prikazana je brojem različitih nukleotida između parova haplotipova u svih jedinki dobrog dupina

	DD01	DD02	DD04	DD03	DD05	DD06	DD07	DD08	DD09	DD11	DD10
DD01											
DD02	17										
DD04	7	16									
DD03	11	15	10								
DD05	16	3	15	14							
DD06	1	16	6	10	15						
DD07	1	17	8	12	16	2					
DD08	18	1	17	16	4	17	18				
DD09	19	2	18	17	5	18	19	3			
DD11	10	16	9	1	15	9	11	17	18		
DD10	17	2	16	15	1	16	17	3	4	16	



```

      290      300      310      320      330      340      350
DD01 CCTCCATTATATTCTATGGTCGCTCCATTAGATCACGAGCTTAATCACCATGCCGCGTGAAACCAGCAAC
DD02 .....C.....A.....
DD03 .....C.....
DD04 .....C.....A.....
DD05 .....C.....A.....
DD06 .....C.....
DD07 .....C.....
DD08 .....C.....A.....
DD09 T.....C.....A.....
DD10 .....C.....A.....
DD11 .....C.....

```

```

      360      370      380      390      400      410      420
DD01 CCGCTTGGCAGGGATCCCTCTTCTCGCACCGGGCCCATACCTCGTGGGGGTAGCTAATAATGATCTTTAT
DD02 .....C.....T.....
DD03 .....C.....TA.....
DD04 .....C.....T.....
DD05 .....C.....T.....
DD06 .....C.....
DD07 .....C.....
DD08 .....C.....T.....
DD09 .....C.....T.....
DD10 .....C.....T.....
DD11 .....C.....TA.....

```

```

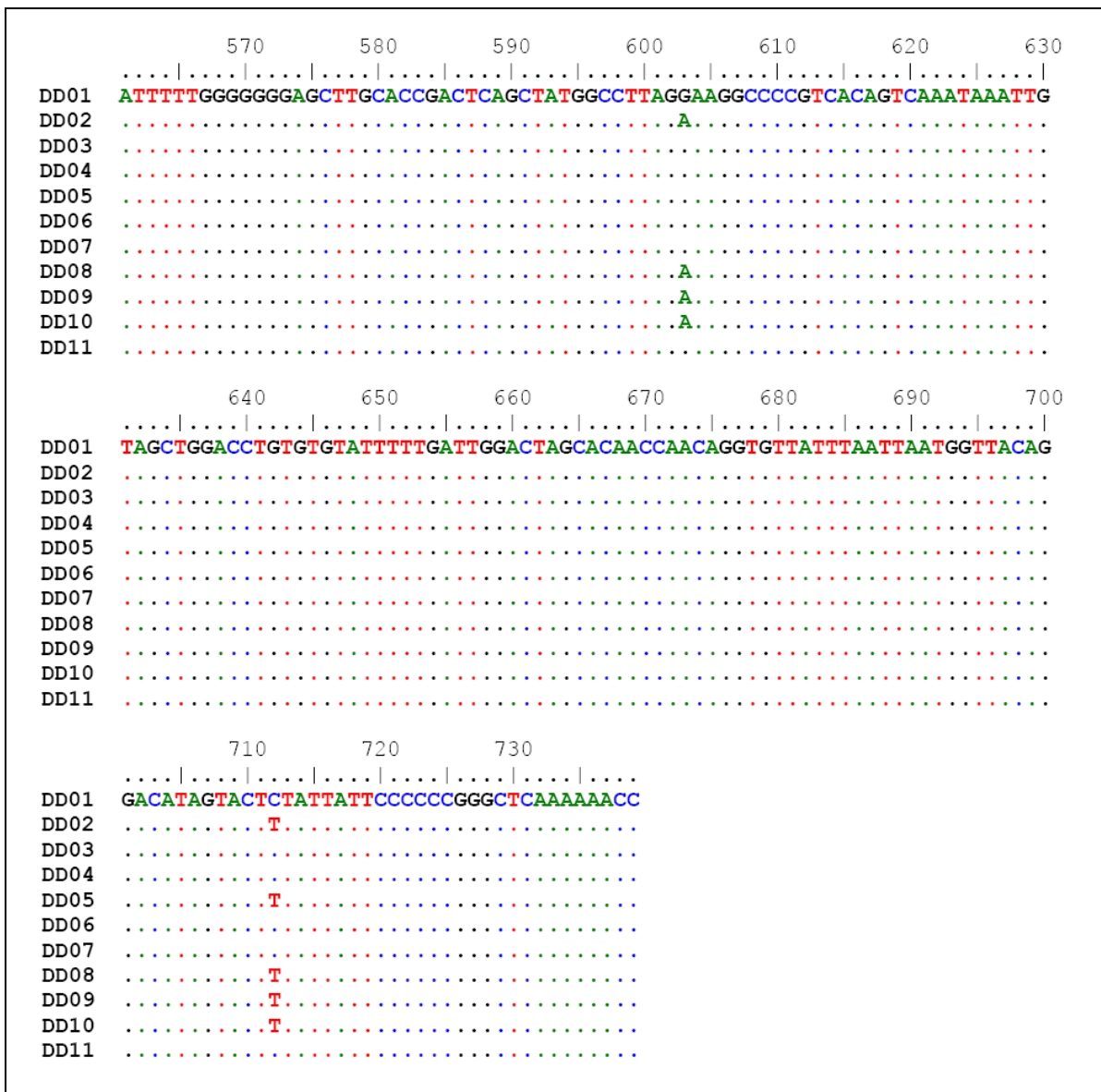
      430      440      450      460      470      480      490
DD01 AAGACATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATTTAACTTAAAATCGCCCACTCGTTCCCTTAAATAAGACA
DD02 .....C.....
DD03 .....C.....
DD04 .....C.....
DD05 .....C.....
DD06 .....C.....
DD07 .....C.....
DD08 .....C.....
DD09 .....C.....
DD10 .....C.....
DD11 .....C.....

```

```

      500      510      520      530      540      550      560
DD01 TCTCGATGGGTTTCATGACTAATCAGCCCATGCCTAACATAACTGAGGTTTCATACATTTGGTATTTTTTA
DD02 .....A.....C.....
DD03 .....C.....
DD04 .....C.....
DD05 .....A.....C.....
DD06 .....C.....
DD07 .....C.....
DD08 .....AC.....C.....
DD09 .....A.G.....C.....
DD10 .....A.....C.....
DD11 .....C.....

```



Slika 10. Prikaz sljedova svih 11 haplotipova duljine 739 pb i 26 polimorfnih mjesta. Točke prikazuju poklapanje s haplotipom DD01.

4. RASPRAVA

4. 1. Kranimetrijski opis populacije dobrog dupina iz Jadrana

Od 59 kranimetrijskih mjera utvrdila sam t – testom da se mužjaci i ženke dobrog dupina iz Jadrana razlikuju u 19 mjera, što je za 11 mjera više nego što je utvrđeno u disertaciji Đuras Gomerčić (2006) (tablica 4.).

Mužjaci imaju znatno širi “kljun“ od ženki (mjera 4, 5 i 7), a šire su im i sjekutične kosti (mjera 6 i mjera 15). Lubanja im je također šira neposredno ispred (mjera 10) i iza očnica (mjera 11), te u supraorbitalnoj širini (mjera 12) i s ventralne strane lubanje u području jagodičnih izdanaka sljepoočne kosti (mjera 14). Mužjacima imaju višu i dulju lubanjsku šupljinu (mjera 17 i mjera 18). Promjer temporalne jame je u mužjaka širi za 5,7% (mjera 22). U mužjaka se sjekutična kost projicira preko gornjih čeljusti za 20,8% dulje nego u ženki. Ženke imaju znatno manje nosne kosti od mužjaka (mjera 24) i kraće antorbitalne izdanke suzne kosti (mjera 26). U mužjaka je dulji i kaudoventralni izdanak krilaste kosti (mjera 28). Mužjaci imaju 7,7 % šire zubnice (mjera 38) i za 4,5 % više najveće zube (mjera 49). Utvrdila sam da imaju i znatno šire kondile na donjim čeljustima (mjera 57).

Utvrdila sam da mužjaci imaju aboralni dio “kljuna“ (mjera 4) znatno širi od ženki. Konstatirala sam da je i lubanja mužjaka šira neposredno iza očnica (mjera 11) i u području jagodičnih izdanaka sljepoočne kosti (mjera 14). Utvrdila sam da postoji značajna razlika u promjeru temporalne jame (mjera 22). U disertaciji Đuras Gomerčić (2006) ustanovljeno da je promjer temporalne jame u mužjaka šira za 9,5%, dok se mojim istraživanjem, tj. povećanjem broja uzoraka, ta razlika smanjila na 5,7%. Svojim istraživanjem nisam pronašla značajnu razliku u širini oralnog ruba bazalnog dijela zatiljne kosti (mjera 35), koja je prema Đuras Gomerčić (2006) bila šira u mužjaka za 5,3%. Isto tako nisam utvrdila razliku u broju zubnica donje desne čeljusti (mjera 47), a prema Đuras Gomerčić (2006) bila je za 5,6% veći u mužjaka. Znatno se smanjila i razlika u promjeru zubnice koja je iznosila 9% (Đuras Gomerčić 2006), a povećanjem uzoraka u mojem istraživanju, smanjila se na 7,7%.

Utvrdila sam, međutim da su neki dijelovi lubanje veći u ženki dobrog dupina iz Hrvatskog dijela Jadrana. Tako je kaudoventralni rub rala (mjera 34) u ženki dobrog dupina širi za 1,1 % nego što je u mužjaka. Istraživanjem Đuras Gomerčić (2006) razlika je iznosila 3,2%. Ženke imaju i veći ukupni broj zubnica (mjera 48), a razlika je u 5 zubnica. Povećanjem uzorka nisam potvrdila prije ustanovljenu razliku u promjeru najvećeg zuba (mjera 50) i promjeru otvora zubne šupljine (mjera 51) koja je prema Đuras Gomerčić (2006)

bila za čak 3,9 % veća u ženki. Na donjoj čeljusti u ženki je znatno viši kondil donje čeljusti (mjera 56) te imaju dulju simfizu (mjera 58) ali nisam utvrdila prije pronađenu razliku u duljini mandibularnog otvora (mjera 55). Nisam utvrdila da ženke imaju širi “kljun“ u području svoje baze (mjera 3), niti razliku u asimetriji lubanje koja je u manjem uzorku bila za 24,6 % veća u ženki (Đuras Gomerčić 2006).

T – testom utvrdila sam da ne postoji značajna razlika u dobi mužjaka i ženki, te su uzorkovani mužjaci i ženke, odnosno odrasli pronađeni mrtvi dupini, prosječno stari oko 16,5 godina. Mužjaci su međutim veće tjelesne mase za 24,22 kg (11,8%) i dulji za 9,14 cm (3,3%) od ženki dok je omjer kondilobazalne duljine i ukupne tjelesne duljine veći u ženki (tablica 4.).

4. 2. Usporedba kranimetrijskih podataka dobrog dupina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora s dobrim dupinima iz svjetskih mora

Kranimetrijske mjere odraslih dobrih dupina iz hrvatskoga dijela Jadranskog mora usporedila sam s istim mjerama u dobrim dupina, ovisno o dostupnosti podataka, iz drugih svjetskih mora. Ustanovljene značajne razlike za pojedine mjere između jadranske i svjetskih populacija u tablici 4. označila sam oznakom “***” (* za $p < 0,05$; ** za $p < 0,01$) (tablica 5., 6. i 7.).

Sharir i sur. (2011) su u svom radu obradili populacije dobrog dupina iz mora oko Izraela, talijanske strane Jadranskog mora, Tirenskog mora, te združeno populacije iz Ligurskog mora, Balearsko more i Alboranskog mora. Usporedbom njihovih podataka s hrvatskima ustanovila sam da postoji znatna razlika jedino između dupina iz Sredozemnog mora oko Izraela i to u kondilobazalnoj duljini (mjera 1), no nema značajne razlike u omjeru kondilobazalne duljine i ukupne tjelesne duljine (mjera 1 /UDT). Tako su lubanje dupina iz mora oko Izraela znatno kraće od lubanja Jadranskog dupina (tablica 5.).

Populacija dobrog dupina iz Crnog mora (Viaud – Martineza i sur. 2008) također se značajno razlikuje od hrvatske populacije u kondilobazalnoj duljini (mjera 1), ali i po omjeru kondilobazalne duljine i ukupne duljine tijela (mjera 1/UDT), te su lubanje u tih dupina znatno kraće (tablica 6).

Iz istog rada Viaud – Martineza i sur. (2008) preuzela sam podatke za populaciju zapadnog Sredozemnog mora (združena populacija iz Tirenskog i Ligurskog mora) koji se od jadranske populacije razlikuju samo po kondilobazalnoj duljini (mjera 1). Međutim, mjere za zapadno Sredozemno more dobivene su od svega 18 jedinki, te su rezultati prikazani bez standardne devijacije, a dobivena kondilobazalna duljina iznosi 52,03 cm dok je u jadranskih dupina ona $51,54 \pm 2,04$ cm. Nisam utvrdila statistički značajnu razliku između ove dvije populacije u omjeru kondilobazalne duljine i ukupne duljine tijela (mjera 1/UDT) (tablica 6.)

Prema podacima iz Viaud – Martineza i sur. (2008) populacija iz istočnog Atlantskog oceana znatno se razlikuje od jadranske u kondilobazalnoj duljini (mjera 1) te u omjeru kondilobazalne duljine i ukupne duljine tijela (mjera 1/UDT). Lubanje dupina iz ovog dijela Atlantika dulje su od lubanja jadranskih dobrih dupina (tablica 6).

Populacija dobrih dupina iz Sjevernog mora (Robineau i Vely 1997) ima veću kondilobazalna duljina (mjera 1), te dulji i širi “kljun” (mjera 2 i mjera 3) a veći je i broj zuba u pojedinim čeljustima (mjere od 39 do 42) u odnosu na jadransku populaciju. Kod dupina iz Sjevernog mora značajno je veća i parijetalna širina (mjera 16) (tablica 7.).

Dobri dupini iz sjeverozapadnog dijela Afrike (more oko Mauritanije), opisani prema Robineau i Vely (1997), imaju znatno veću kondilobazalnu duljinu (mjera 1), te duljinu i širinu "kljuna" (mjera 2 i mjera 3), no njihova je lubanja uža (mjera 16). Ovi dupini imaju i veći broj zuba u pojedinim čeljustima (mjere 39, 40, 41 i 42) s obzirom na dobre dupine iz Jadranskoga mora (tablica 7).

U dupina iz mora oko Južnoafričke Republike (Ross 1977) utvrdila sam da imaju značajno veću kondilobazalnu duljinu (mjera 1), te duljinu i širinu "kljuna" (mjera 2, mjera 3 i mjera 8) a dulja im je i grana donje čeljusti (mjera 53). Lubanja im je znatno šira neposredno ispred (mjera 10), iza očnica (mjera 11), te u supraorbitalnoj širini (mjera 12) te s ventralne strane lubanje u području jagodičnih izdanaka sljepoočne kosti (mjera 14). Južnoafrička populacija ima veću širinu otvora između lijeve i desne sjekutične kosti (mjera 13) kao i širinu sjekutičnih kosti (mjera 15) od jadranske populacije. U južnoafričkih dupina znatno je veća i duljina antorbitalnog izdanka suzne kosti (mjera 26). S obzirom na jadranske dupine južnoafrički imaju značajno veći broj zuba u pojedinoj čeljusti kao i ukupni broj zuba (mjere od 39 do 43) (tablica 6.).

Od 22 kranimetrijske mjere dupina iz mora oko Tajvana te južne Kine (Wang i sur., 2000), jadranski dupini znatno se razlikuju u 13 mjera. Kineska i Tajvanska populacija ima značajno manju kondilobazalnu duljinu (mjera 1), duljinu "kljuna" (mjera 8) i širinu "kljuna" na $\frac{3}{4}$ njegove duljine mjerene od baze (mjera 7), te manju širinu sjekutičnih kosti (mjera 15). Imaju značajno manju duljinu i visinu grane donje čeljusti (mjera 53 i mjera 54), no broj zuba u pojedinim čeljustima te ukupni broj zuba (mjere od 39 do 43) je značajno veći u odnosu na jadransku populaciju. Sama lubanja znatno je uža u supraorbitalnom dijelu (mjera 12) dok je antorbitalni izdanak suzne kosti dulji (mjera 26) (tablica 6.).

Hersh i sur. (1990) pronašli su razliku između mužjaka i ženki dobrog dupina iz mora oko istočne Floride. Izmjerali su ukupno 33 mjera na lubanji koje sam usporedila s mjerama mužjaka odnosno ženki dobrih dupina iz hrvatskog dijela Jadrana. Oba spola floridskih dupina značajno su manja od jadranskih u svim mjerama osim po broju zuba u pojedinim čeljustima i ukupnom broju zuba (mjere od 39 do 43). Ženke floridske populacije imaju 3 do 4 zuba više od ženki jadranske populacije, a mužjaci imaju 4 do 5 zuba više od mužjaka iz Jadrana (tablica 7.).

U populacije dobrog dupina iz mora oko cijele Australije mjereno je 35 kranimetrijskih mjera (Charlton – Robb i sur. 2011) a od kojih je 31 mjera značajno većih od jadranskih dupina. Međutim, dupini iz mora oko Australije imaju za gotovo 1 cm značajno užu parijetalni

dio lubanje (mjera 16), te značajno kraći bubnjićni dio sljepoočne kosti (mjera 30.) (tablica 6.).

4. 3. Usporedba genske raznolikosti jadranske populacije s populacijama iz drugih svjetskih mora

Vrijednosti indeksa raznolikosti jadranske populacije usporedila sam s rezultatima za populacije iz drugih svjetskih mora, a koje sam preuzela iz literature (Natoli i sur. 2004, Viaud – Martineza i sur. 2008, Quérrouil i sur. 2007, Mirimin i sur. 2011)

Genska ili haplotipska raznolikost (H) jadranske populacije iznosi $0,6108 \pm 0,0494$, a nukleotidna raznolikost iznosi $0,010452 \pm 0,005435$.

Populacija dobrog dupina iz Sredozemnog mora ima znatno veće indekse raznolikosti, jednako kao i populacija iz portugalskog dijela Atlantskog oceana, makar su obje dobivene na relativno malom uzorku. Populacije iz Atlantika oko Irske imaju sličnu gensku, a pogotovo nukleotidnu raznolikost, jednako kao i egejska i crnomorska populacija. Izraelska populacija dobrog dupina ima znatno manju gensku i nukleotidnu raznolikost, međutim te procjene su dobivene na vrlo malom broju jedinki iz Izraela (tablica 10).

Tablica 10. Prikaz genske (H) i nukleotidne (II) raznolikosti populacija iz svjetskih mora s pripadajućim standardnim devijacijama, te brojnost proučavanog uzorka (n).

Populacija	H	II	n	Referenca
Sredozemna	$0,935 \pm 0,035$	$0,022 \pm 0,012$	18	Natoli i sur. (2004)
Egejska	0,65	0,016	11	Viaud – Martineza i sur. (2008)
Izraelska	0,42	0,002	9	Viaud – Martineza i sur. (2008)
Crno more	0,58	0,003	43	Viaud – Martineza i sur. (2008)
Portugalska	$0,857 \pm 0,137$	$0,014 \pm 0,008$	7	Quérrouil i sur. (2007)
Irska	$0,643 \pm 0,048$	$0,011 \pm 0,006$	82	Mirimin i sur. (2011)

Uspoređivanjem skraćenih sljedova 11 jadranskih haplotipova s haplotipovima iz drugi svjetskih mora utvrdila sam da se oni podudaraju s populacijama iz Crnog mora, istočnog i zapadnog Sredozemlja, te populacijama iz Atlantskog oceana uz irsku obalu. Međutim, skraćivanjem sljedova gubi se uvid u raznolikost koja se dobiva iz dugačkih sljedova, te je

upitna pouzdanost tako dobivenih rezultata usporedbe. Kao što se skraćivanjem slijeda jadranskih haplotipova DD02, DD05, DD08 i DD10 izgubila mogućnost prepoznavanja dodatnih polimorfni mjesta, te su navedeni haplotipovi prepoznati kao identičan slijed, za pretpostaviti je da bi se razlučivost povećala, a samim time bi i rezultati uspoređivanja bili precizniji, da su sljedovi iz drugih mora sekvencirani pomoću uzvodne početnice MTCRf (Hoelze i Green, 1998) i nizvodne početnice DUPr (Pauk, 2007), tj. da su strani haplotipovi bili jednako dugi kao i jadranski. Za sada se s sigurnošću može reći da je najmanje jedan haplotip, haplotip DD07, jedinstven za jadransku populaciju dobrih dupina.

5. ZAKLJUČAK

Unutar 108 jedinki dobrog dupina iz Jadranskog mora postoji 11 različitih haplotipova kontrolne regije mtDNA duljine 739 pb, s 26 polimorfni mjestima. Najučestaliji je haplotip DD01 kojeg je dijelilo 65 jedinki (zastupljenost 60,2%). Talijanski uzorak T101 dijeli haplotip s jedinkama iz hrvatskog dijela Jadrana (DD01), dok se drugi talijanski uzorak T95 odvojio u vlastiti haplotip DD11.

Najveća udaljenost je između haplotipova DD01 i DD09 i haplotipova DD07 i DD09, oni se međusobno razlikuju u 19 nukleotida. Najmanje su udaljeni sljedeći parovi haplotipova: DD01 i DD06, DD01 i DD07, DD02 i DD08, DD03 i DD11, te DD05 i DD10.

Genska ili haplotipska raznolikost (H) iznosi $0,6108 \pm 0,0494$, a nukleotidna raznolikost (II) iznosi $0,010452 \pm 0,005435$. Populacije iz Atlantika oko Irske, egejska i crnomorska populacija imaju sličnu gensku i nukleotidnu raznolikost.

Uspoređivanjem skraćenih sljedova 11 jadranskih haplotipova s haplotipovima iz drugi svjetskih mora utvrdila sam da se oni podudaraju s populacijama iz Crnog mora, istočnog i zapadnog Sredozemlja, te populacijama iz Atlantskog oceana uz irsku obalu. Minimalno jedan jadranski haplotip, DD07, je jedinstven.

U 96 lubanja odraslih jedinki utvrdila sam da se mužjaci i ženke dobrog dupina iz Jadrana razlikuju u 19 od 59 kranimetrijskih mjera. Općenito u mužjaka je lubanja robusnija, no ženke imaju širi kaudoventralni rub rala, veći ukupni broj zubnica, na donjoj čeljusti u ženki je znatno viši kondil donje čeljusti, te imaju dulju mandibularnu simfizu. Mužjaci imaju veću tjelesnu masu za 24,22 kg i dulji su za 9,14 cm od ženki, a omjer kondilobazalne duljine i ukupne tjelesne duljine je veći u ženki.

Uspoređivanjem kranimetrijske mjere odraslih dobrih dupina iz hrvatskoga dijela Jadranskog mora s istim mjerama u dobrih dupina, ovisno o dostupnosti podataka, iz drugih svjetskih mora, utvrdila sam da se jadranski dupini najviše razlikuju od crnomorske populacije, istočno atlantske populacije, populacije iz mora oko Mauritanije i Sjevernog mora, populacije iz mora oko Australije te populacije iz mora oko Južnoafričke Republike. Nisam pronašla značajne razlike u čak 9 mjera između jadranske populacije i dupina iz kineskih voda, s izraelskom populacijom jadranska se razlikuje u kondilobazalnoj duljini, a nisam utvrdila razliku između jadranske populacije i populacije iz zapadnog Sredozemlja.

Tako su lubanje dupina iz mora oko Izraela, iz Crnog mora dosta kraće od lubanja Jadranskog dupina. Lubanje populacija dobrih dupina iz Sjevernog mora, istočnog Atlantskog

oceana, iz sjeverozapadnog dijela Afrike, iz mora oko Južnoafričke Republike i iz mora oko Australije znatno su dulje su od lubanja jadranskih dobrih dupina. Kineska i Tajvanska populacija ima manju lubanju no neke mjere su u njih značajno veće, primjerice broj zuba u pojedinim čeljustima te ukupni broj zuba. Istu situaciju utvrdila sam i za populaciju iz mora oko istočne Floride, ona je značajno manja od jadranske u svim mjerama osim po broju zuba u pojedinim čeljustima i ukupnom broju zuba.

6. LITERATURA

- Amaral A. R., Coelho M. M., Marugán – Lobón J., Rohlf F. J. (2009): Cranial shape differentiation in three closely related delphinid cetacean species: Insights into evolutionary history. *Zoology* **112**: 38 – 47.
- Barnes L. G. (2002): Cetacea, overview. U: Perrin W. F., Würsing B., Thewissen J. G. M. (ur.) *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press, Inc., San Diego.
- Bearzi G., Fortuna C. M., Reeves R. R. (2008): Ecology and conservation of common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the Mediterranean Sea . Mammal Society. *Mammal Review* **39**: 92 – 123
- Beebe T. J. C., Rowe G. (2004): *An introduction to molecular ecology*. Oxford University Press, Oxford.
- Charlton – Robb K., Gershwin L., Thompson R., Austin J., Owen K., McKechnie S. (2011): A new dolphin species, the burrunan dolphin *Tursiops australis* sp. nov., endemic to Southern Australian coastal waters. *PLoS ONE* **6** (9): e24047: 1 – 17.
- Đuras Gomerčić M. (2006): Rast, spolni dimorfizam i morfometrijske značajke dobrog dupina (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) iz Jadranskoga 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.
- Fernández R., Begona Santos M., Pierce G. J., Llavona Á., López A., Silva M. A., Ferreira M., Carrillo M., Cermeno P., Lens S., Piertney S. B. (2011): Fine-scale genetic structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Atlantic coastal waters of the Iberian Peninsula. *Hydrobiologia* **670**: 111 – 125.
- 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.
- 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, 16.

- 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.
- Hersh S. L., Odell D. K., Asper E. D. (1990): Sexual dimorphism in bottlenose dolphins from the East coast of Florida. *Marine Mammal Science* **6**: 305 - 317.
- Hoelzel A. R., 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.
- Hoelzel A. R., Hancock J. M., Dover G. A. (1991): Evolution of the cetacean mitochondrial DLoop region. *Molecular Biology and Evolution* **8**: 475 - 493.
- Hoelzel A. R., Potter C. W., Best P. B. (1998): Genetic differentiation between parapatric “nearshore“ and “offshore“ populations of the bottlenose dolphin. *The Royal Society* **265**: 1177 – 1183.
- Mirimin L., Miller R., Dillane E., Berrow S. D., Ingram S., Cross T. F., Rogan E. (2011): Fine-scale population genetic structuring of bottlenose dolphins in Irish coastal waters. *Animal Conservation*: 1 – 12.
- Natoli A., Peddemors V. M., Hoelzel A. 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 A. R. (2005): Habitat structure and the dispersal of male and female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the Royal Society* **272**: 1217 – 1226.
- Nei M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY.
- Pauk M. (2007): Određivanje slijeda kontrolne regije mitohondrijske DNA dobrog dupina *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). Diplomski rad. Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Perrin W. (1975): Variation of spotted and spinner porpoise (genus *Stenella*) in the eastern tropical Pacific and Hawaii. University of California Press, San Diego.
- Quérrouil S., Silva M. A., Freitas L., Prieto R., Magalhaes S., Dinis A., Alves F., Matos J. A., Mendonça D., Hammond P. S., Santos R. S. (2007): High gene flow in oceanic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) of the North Atlantic. *Conservation Genetics* **8**: 1405 – 1419.

- 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.
- Robineau D., Vely M. (1997): Données préliminaires (taille corporelle, craniométrie) sur le grand dauphin (*Tursiops truncatus*) des côtes d'Afrique du nord-ouest (Mauritanie, Sénégal). *Mammalia* **61**: 443 - 448.
- Rommel S. (1990): Osteology of the Bottlenose Dolphin. U: Leatherwood S., Reeves R. R. (ur.) The bottlenose dolphin. Academic Press, Inc., San Diego.
- Ross, G. J. B. (1977): The taxonomy of bottlenosed dolphins *Tursiops* species in South African waters, with notes on their biology. *Annals of the Cape provincial museums (Natural history)* 11.
- Sharir Y., Kerem D., Gol'din P., Spanier E. (2011): Small size in the common bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* in the eastern Mediterranean: a possible case of Levantine nanism. *Marine Ecology Progress Series* **438**: 241 – 251.
- Simmonds M. Nunny L. (2002): Cetacean Habitat Loss and Degradation in the Mediterranean Sea. U: G. Notarbartolo di Sciara (ur.) Cetaceans of the Mediterranean and Black Seas: state of knowledge and conservation strategies. ACCOBAMS Section 7: 23
- Turner J. P., Worthy G. A. J. (2003) Skull morphometry of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of Mexico. *Journal of Mammalogy* **84**: 665 – 672.
- Viaud – Martineza K. A., Brownell R. L. Jr., Komnenouc A., Bohonak A. J. (2008): Genetic isolation and morphological divergence of Black Sea bottlenose dolphins. *Biological conservation* **141**: 1600 – 1 611.
- Walker W. A. (1981): Geographical variation in morphology and biology of bottlenose dolphins (*Tursiops*) in the Eastern North Pacific. Administrative report No. LJ-81-03C. National Marine Fisheries Service. Southwest Fisheries Center. La Jolla.
- Wang J. Y., Chou L. – S., White B. N. (1999): Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Molecular Ecology* **8**: 1603 – 1612.
- Wang J. Y., Chou L. – S., White B. N. (2000): Osteological differences between two sympatric forms of bottlenose dolphins (genus *Tursiops*) in Chinese waters. *Journal of Zoology, London* **252**: 147 – 162.
- Wells R. S., Scott M. D. (2002): Bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* and *T. aduncus*. U: Perrin W. F., Würsing B., Thewissen J. G. M. (ur.) Encyclopedia of marine mammals. Academic Press, Inc., San Diego.