

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Klara Marić

Raznolikost mitohondrijske DNK jelena lopatara
iz Nacionalnog parka Brijuni

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

ZAVOD ZA LOVSTVO I DIVLJE ŽIVOTINJE

Predstojnik: prof. dr. sc. Alen Slavica

Mentor: doc. dr. sc. Magda Sindičić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. Alen Slavica
2. prof.dr.sc. Zdravko Janicki
3. doc.dr.sc. Magda Sindičić
4. izv.prof.dr.sc. Tomislav Gomerčić (zamjena)

*Zahvaljujem se doc.dr.sc. Magdi Sindičić na stručnim savjetima, vodstvu i trudu
tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se kolegama i prijateljima koji su mi bili potpora
tijekom cijelog studiranja.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju, strpljenju i podršci
svih ovih godina.*

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Biologija i ekologija jelena lopatara	2
1.2. Jelen lopatar u Nacionalnom parku Brijuni	3
1.3. Mitohondrijska DNK	4
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	5
3. MATERIJALI I METODE.....	7
3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	7
3.2. Elektroforeza.....	8
3.3. Identifikacija polimorfnih nukleotidnih mjesta	8
3.4. Pokazatelji raznolikosti.....	8
4. REZULTATI	10
5. RASPRAVA.....	12
6. ZAKLJUČCI	15
7. LITERATURA	16
SAŽETAK.....	21
SUMMARY.....	22
ŽIVOTOPIS.....	23

1. UVOD

Jelen lopatar (*Dama dama*) pripada podredu Ruminantia, red Artiodactyla, porodici Cervidae koja broji 40 vrsta, te potporodici Cervinae koja uključuje 4 roda (GILBERT i sur., 2006.). Vrsta potječe iz Euroazije, a razlikujemo dvije podvrste – europski (*Dama dama dama*; Linnaeus, 1758) i mezopotamijski jelen lopatar (*Dama dama mesopotamica*; Brooke, 1875) (ARSLANGÜNDOĞDU i sur., 2010.). Istraživanja molekularne DNK potvrdila su da su ove dvije podvrste dosta različite (MASSETI i sur., 2006., 2008.), jer unatoč obitavanju na susjednim teritorijima razdvajaju ih geografske barijere. Mezopotamijski lopatar je obitavao na području od Irana preko Iraka do Sirije, Palestine i do dijelova juga i jugoistoka Turske, dok je današnji europski jelen lopatar najvjerojatnije obitavao na sjeveru i zapadu Turske što i objašnjava njihovu međusobnu gensku razliku (HEIDEMANN, 1987., MASSETI i MERTZANIDOU, 2008.).

Općenito se smatra da današnje populacije lopatara u Europi potječu s istočnog Mediterana, odnosno s područja Turske i Irana, odakle je vrsta posredstvom čovjeka proširena na srednjeeuropske i sjevernoeuropske države (LUDWIG i sur., 2012.). Zahvaljujući ponajprije čovjeku, te ponegdje i nedostatku hrane, danas jelena lopatara možemo naći u Europi, na Bliskom Istoku, u Sjevernoj i Južnoj Americi, u Sjevernoj i Južnoj Africi, Australiji i na Novom Zelandu (CHAKANAYA i sur., 2016., KJELLANDER i sur., 2012.). Za razliku od mezopotamijskog, europska podvrsta *Dama dama dama* se dobro aklimatizirala diljem svijeta što je i razlog porastu populacije (CHAKANAYA i sur., 2016.). Prema procjeni IUCN-ove Crvene liste ugroženih vrsta, jelen lopatar, *Dama dama* nije svrstan u ugrožene vrste (status *least concern*) (MASSETI i MERTZANIDOU, 2008.). I dok su populacije jelena u Europi pretežito stabilne, one izvorne u Turskoj nestaju. U izvornim područjima postoje tek manja žarišta lopatara, pogotovo na jugozapadu Turske, dok se iranska populacija klasificira kao izumiruća (LUDWIG i sur., 2012.). S druge strane, u ostalim dijelovima svijeta jelen lopatar je važna vrsta za lov i uzgoj (KJELLANDER i sur., 2012.). Procjenjuje se da u svijetu ima oko 5 milijuna lopatara u farmskom uzgoju, a na Novom Zelandu je koncentrirana čak polovica svjetskog uzgoja (DASZKIEWICZ i sur., 2015.). U Europi prevladava intenzivni uzgoj, ponajprije zbog važnosti jelena lopatara u mesnoj industriji (CHAKANAYA i sur., 2016.). Iako je lopatar ekonomski bitan, znanstvenici upozoravaju na njegov negativan utjecaj na vegetacijsku bioraznolikost (porast broja određenih vrsta drveća, erodiranje tla) zbog konkurencije ostaloj stoci na istom području (MARTIN i sur., 2011., RELVA i sur., 2010.).

1.1. Biologija i ekologija jelena lopatara

Osim na temelju genetike, europsku i mezopotamijsku podvrstu možemo razlikovati na temelju fenotipa - mezopotamijski je veći, ali ima manje rogove, bez grana (STACHOWICZ i sur., 2014., CHAKANAYA i sur., 2016.). Mužjaci teže 60 - 80kg, a ženke 35 - 50kg, no masa može dosta varirati ovisno o sezoni (prije/nakon razmnožavanja) i kondiciji životinje (TRBOJEVIĆ i sur., 2012.). Mužjaci imaju rogove, dok ženke nemaju. Europski jelen lopatar se može pronaći u četiri boje - smeđa, siva, crna i bijela (CHAKANAYA i sur., 2016.). Uobičajena boja podrazumijeva smeđu s bijelim mrljama koja zimi prelazi u sivosmeđu s manje izraženim svijetlijim područjima.

Jelen lopatar je biljojed, od ranog proljeća do početka ljeta hrani se pretežito na zelenim pašnjacima, a dolaskom ljetnih mjeseci travom, lišćem (uglavnom crnogoričnog drveća) te makijom. Tijekom jeseni jede razne bobice, žireve, plodove maslina, rogač, kukuruz, sijeno. Zapaženo je da mužjaci u vrijeme parenja jedu veliku količinu različitih plodova, naravno ukoliko su im oni dostupni. Zimi se lopatari hrane travom, lišćem hrastovog drveća i žirevima (ARSLANGÜNDOĞDU i sur., 2010.). Prilikom ispaše lopatari u divljini formiraju velike grupe na otvorenim prostorima, a to je posebno izraženo navečer kod „tihe“ paše (MATTIELLO i sur., 1997.). Također, u područjima hranjenja gdje ima više drveća formiraju manje grupe jer im se lakše skriti od predatora (SCHAAL, 1982., MATTIELLO i sur., 1997.). Grupe pretežito formiraju ženke s mladima, a mužjake možemo naći u takvim skupinama u slučaju velike gustoće naseljenosti (MATTIELLO i sur., 1997.).

Lopatari imaju poligamni sustav razmnožavanja (MASTERS i MURRAY, 2015.). U Europi se pare od 9. do 11. mjeseca (CHAKANAYA i sur., 2016.), ali to ovisi o lokaciji pa se tako u Africi pare od 3. do 6. mjeseca (LINDSEY i sur., 2007.). U sezoni parenja i dok se tjeraju, mužjaci dolaze na teritorij ženki (PUTMAN i FLUECK, 2011.) i tada žive u krdu, a ostatak godine žive solitarno. Područja parenja su udaljena jedna od drugih, u svakom se nalazi jedan mužjak koji brani teritorij od ostalih mužjaka. Mužjaci se glasaju samo tijekom sezone parenja kako bi privukli ženke (MASTERS I MURRAY, 2015.). Zabilježen je i haremski sustav razmnožavanja gdje skupinu ženki „čuva“ jedan mužjak koji brani skupinu, a ne teritorij (LANGBEIN i THIRGOOD, 1989.); te teritorijalni tip koji se odnosi na skupinu mužjaka (20-30) (PUTMAN i FLUECK, 2011.) na manjem području (eng. *lek*), a kojima ženke prilaze samo u svrhu parenja (THIRGOOD i sur., 1999.). U nekim populacijama mužjaci uopće ne pokazuju teritorijalnost niti je prisutan haremski sustav, već su mužjaci i ženke pomiješani u velikom krdu te se jednostavna borba za dominaciju vodi unutar krda.

Konačno, postoje i mužjaci koji izbjegavaju međusobno natjecanje – lutaju i povremeno prolaze kroz teritorije ženki te se po prilici pare s ženkama u estrusu (PUTMAN, 1993., PUTMAN i FLUECK, 2011.).

Ponašanje svih vrsta jelena, pa tako i jelena lopatara, ipak se mijenja ovisno o okolišu u kojem se nađu. To je posebno izraženo kod lopatara koji više nego druge vrste pokazuje separaciju među spolovima (mužjaci prostorno udaljeni od ženki i mladunčadi). Naime, ako je stanište otvoreno, a mužjaka je malo, oni se u većini slučajeva neće odvajati (PUTMAN i FLUECK, 2011.).

1.2. Jelen lopatar u Nacionalnom parku Brijuni

Kao rezultat upoznavanja Feničana, Romana, Normana i drugih naroda s jelenom lopatarom, isti je rasprostranjen i naseljen diljem Europe (ARSLANGÜNDOĞDU i sur., 2010.), uključujući Hrvatsku i Nacionalni park Brijuni. Temeljem Zakona o lovstvu lopatar je u Hrvatskoj divljač, a prisutan je prvenstveno u gaterskim uzgojima, dok je slabije zastupljen u otvorenim lovištima i farmskom uzgoju.

Za procvat Brijuna odgovoran je austrijski industrijski magnat Paul Kuppelwieser (1843. – 1919.) koji je kupio Brijune 1893. godine i tada pusto, nenaseljeno i malarijom pogođeno područje pretvorio u elitno odmaralište (UROŠEVIĆ, 2014.). Godine 1978. na sjevernom dijelu otoka otvoren je safari park, a 1983. godine Brijuni su proglašeni Nacionalnim parkom (FATOVIĆ – FERENČIĆ, 2006.).

Nacionalni park Brijuni obuhvaća 14 otoka od kojih je najveći Veliki Brijun, a koji je pored autohtonih životinja obogaćen i mnogobrojnim unesenim vrstama koje nisu svojstvene ovom staništu, ali su se dobro aklimatizirale. Jelen lopatar je, uz aksisa i muflona, unesen na Veliki Brijun oko 1900. godine (FATOVIĆ – FERENČIĆ, 2006., TRBOJEVIĆ i sur., 2012.). Lopatar na Brijunima obitava u specifičnim uvjetima s obzirom da tamo nema prirodnog neprijatelja, a hranu mu uglavnom osigurava čovjek (ROBIĆ i sur., 2016.). Kada se uzme u obzir ovakva otočna izoliranost populacije lopatara, lako se dovodi u pitanje i njihova genska raznolikost.

1.3. Mitohondrijska DNK

Mitohondrijska DNK je kružna dvolančana DNK molekula koja se sastoji od 15 000 do 20 000 parova baza (pb). Haploidna je, nema introna, nasljeđuje se samo od majke te nema dokaza postojanja rekombinacije (LADOUKAKIS i ZOUROS, 2017.). Sve to čini je pogodnom za populacijska istraživanja.

Mitohondrijska DNK se sastoji od dva osnovna dijela – kodirajući i ne-kodirajući dio. Kodirajuća regija u većine životinja sadrži 13 gena koji kodiraju sintezu proteina, 22 ili 23 tRNK gena te 2 rRNK gena (za veliku i malu podjedinicu) (LADOUKAKIS i ZOUROS, 2017.). Ne-kodirajući dio se naziva kontrolna ili hipervarijabilna regija (BROWN, 1985.) i predstavlja mjesto s kojeg započinje replikacija i transkripcija mitohondrijskog genoma (CLAYTON, 1991.), te se tu očituje najveća raznolikost nukleotida i dužine sekvence u usporedbi s ostatkom mtDNK (LADOUKAKIS i ZOUROS, 2017.).

Kontrolna regija se sastoji od oko 1 000 parova baza (HOELZEL, 1993.), a kako ne kodira za sintezu proteina, nije podložna prirodnoj selekciji i to je čini vrlo dobrim genetskim markerom (KOCHER i sur., 1989.).

Mitohondrijska DNK podložna je brzom evoluciji – najbrže evoluirala kontrolna regija (četiri do pet puta brže od ostatka mtDNK), a i općenito je evolucija mtDNK i do deset puta brža od jezgrinih gena (BROWN i sur., 1979.). Ono što još mtDNK čini pogodnom za razlučivanje promjena na razini populacije je i to što sadrži više različitih sekvenci u usporedbi s jezgrenom DNK (olakšava identifikaciju srodnih vrsta) (BROWN i sur., 1993, VAWTER i BROWN, 1986.).

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Arheološki ostatci upućuju da je jelen lopatar bio rasprostranjen i autohton u sjevernoj i zapadnoj Europi prije posljednjeg ledenog doba, no da je tijekom ledenog doba izumro. Za sada nisu pronađeni dokazi o post-glacijalnoj rasprostranjenosti jelena lopatara u zapadnoj Europi, no razmatra se mogućnost da su područja Sicilije, jug balkanskog poluotoka i južna Anatolija bili glacijalna utočišta vrste (MASSETI, 1996.). Jedino za Anatoliju postoje dokazi glacijalnog utočišta lopatara i jedino je tamo preživjela autohtona populacija, dok za Siciliju i Balkan za sada ne postoje dokazi o glacijalnom utočištu i smatra se da je autohtona populacija tamo izumrla tijekom srednjeg vijeka (MASSETI, 1996.). Današnje populacije na Balkanu nastale su kao posljedica naseljavanja prije 50-ak godina.

Poznato je da su lopatari naseljeni na područje Grčke u Neolitiku. Stoga se današnja populacija na grčkom Rodosu smatra izuzetno važnom budući da je jedna od prvih koja je nastala naseljavanjem iz Anatolije (TRANTILADOU, 2002.) te su unutar nje očuvani izvorni haplotipovi (MASSETI, 2007.). Danas je proširena na 550 km², a veličina se procjenjuje na 400 – 500 jedinki (MASSETI i MERTZANIDOU, 2008.). U brončano doba lopatari su naseljeni diljem zapadnog Mediterana, dok su Rimljani lopatare naselili u središnju i zapadnu Europu, Portugal, Francusku, Švicarsku i Britaniju. Smatra se da je i u srednjem vijeku bio val naseljavanja, kada su između ostalog naseljeni na područje Alpi. U novije doba, odnosno tijekom 19. i 20. stoljeća, naseljeni su opet diljem Europe i izvan Europe – Bliski istok, Južna Amerika, Afrika, Australija i Novi Zeland. Zahvaljujući ljudskom utjecaju jelen lopatar je široko rasprostranjena vrsta u Europi i većina populacija u Europi danas se smatraju stabilnima (MASSETI i MERTZANIDOU, 2008.). Međutim, izvorna populacija u Turskoj izumire. Jedina izvorna populacija nalazi se u Nacionalnom parku Telmessos u Turskoj i broji tridesetak jedinki te se smatra genetski različitom od ostalih populacija *Dama dama* u svijetu (MASSETI, 2007.). Danas su u Turskoj prisutne svega tri populacije jelena lopatara koje broje ne više od 200 jedinki (BAKER i sur., 2017.).

LUDWIG i sur. (2012.) proveli su istraživanje mtDNK na 365 jelena lopatara s 22 lokacije u 9 njemačkih Saveznih država. Utvrdili su prisutnost ukupno 10 haplotipova na slijedu približne duljine 400 parova baza. Dobiveni podaci potvrdili su tursko podrijetlo jelena lopatara u Njemačkoj, a unutar Njemačke su identificirane tri različite skupine: (1) Schleswig-Holstein, (2) Brandenburg, Hesse, Rhineland, (3) Saxony, lower Saxony, Mecklenburg, Westphalia, Anhalt. Za posljednje dvije zabilježeno je i širenje populacije. Dakle, unatoč niskoj genskoj raznolikosti, u populacijama je bila prisutna relativno jaka genetska struktura.

Zaključeno je i da su najveći utjecaj na strukturu haplotipa njemačkog jelena lopatara imali ljudi (unos i lov) (LUDWIG i sur., 2012.).

BAKER i sur. (2017.) su u istraživanju nastojali ispitati utjecaj okoliša, tj. prirode i čovjeka na evoluciju i gensku raznolikost *Dama dama* u različitim zemljama Europe te Kanadi. Istražili su mtDNK te 10 mikrosatelitskih lokusa. Uzorci su prikupljeni od 364 jelena lopatara iz 10 europskih zemalja i Kanade. To je uključivalo i pet populacija s Pirenejskog poluotoka (Portugal i Španjolska), tri iz Italije i jednu iz Anatolije (Turska). Za analizu mtDNK korištena su 203 uzorka te je sekvencirano 683 pb. Većina populacija pokazala je malu raznolikost mitohondrijske DNK – najmanju je imala turska populacija, s iznimkom talijanske populacije koja je pokazala visoku haplotipsku i gensku raznolikost. Uočena je poveznica populacije iz Italije s onima s Pirenejskog poluotoka ili introgresija portugalsko-španjolske linije u talijansku populaciju lopatara. Dok kod ovih populacija ima različitih haplotipova, sjeverne populacije grupirale su se u jednu skupinu. U prilog tome da sjeverne populacije potječu od lopatara iz Turske, ide činjenica da kod ovih populacija nedostaje 21 pb mtDNK koji je prisutan u 88% jedinki u Španjolskoj i Italiji. Iako je populacija jelena lopatara u Italiji pokazala višu raznolikost mtDNK od ostalih lopatara, zaključeno je da je ona i dalje niska u odnosu na gensku raznolikost u drugih vrsta jelena (npr. *Cervus elaphus*). Također, potvrđena je i jedinstvena mtDNK *Dama dama* s Rodosa (BAKER i sur., 2017.).

KUSZA i sur. (2018.) proveli su istraživanje mitohondrijske DNK jelena lopatara iz Mađarske, na uzorcima 41 životinje. Analizirano je 450 pb kontrolne regije mtDNK. Utvrđena su tri haplotipa, od kojih su dva bila do tada nezabilježena. Rezultati temeljeni na filogenetskim stablima i mreži 218 slijedova iz GenBank baze podataka pokazali su prisutnost pet različitih skupina jelena lopatara podrijetlom iz (1) Italije i Njemačke, (2) Španjolske i Portugala, (3) Rhodosa i Italije, (4) Kanade, Afrike, Bliskog Istoka, Europe uključujući Mađarsku i (5) pojedinačni primjerci iz Anatolije (Turska) koji su pokazali slabiju mitohondrijsku raznolikost u odnosu na druge skupine. BAPS programom predloženo je osam klastera (skupina), a analiza sekvenci jelena lopatara iz sjeveroistočne Mađarske pokazala je da sve one pripadaju u jedan klaster. Neutralizacijski test indicirao je da je kod populacija koje pripadaju klasteru1 (jelen lopatar iz Italije i Njemačke) došlo do širenja populacije te je vidljivo da je genska raznolikost pretežito pod utjecajem antropoloških faktora (KUSZA i sur., 2018.).

Do sada nisu objavljena istraživanja genske raznolikosti jelena lopatara iz Hrvatske, te je ovo prvo takvo istraživanje.

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na ukupno 22 uzorka mišića jelena lopatara (*Dama dama*) iz Nacionalnog parka Brijuni. Uzorci su potjecali od odstrijeljenih životinja te su nakon dopreme na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu bili pohranjeni u 96% etanolu na -20°C. Za izolaciju DNK iz uzoraka mišića korišten je komercijalni kit -Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, a sama izolacija DNK rađena je prema protokolu proizvođača.

3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za pripremu PCR smjese korišten je Platinum® PCR SuperMix, Invitrogen koji sadrži Taq DNA polimerazu s Platinum® Taq antitijelima, 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl₂, te 220 µM dNTP Mix. PCR reakcija je provedena u smjesi količine 50 µL - sadržavala je 5 µl DNK, 1 µl otopine početnica i 44 µl Platinum® PCR SuperMix, Invitrogen. Korištene su početnice DamaCtr1F (5'-ATTAATATAGCTCCATAAAAATCA) i DamaCtr1R (5'-AGGAAAGAACCAGATGTCTGATAA) (MASSETI i sur., 2008.). Reakcija je izvedena u uređaju Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Optimizirani uvjeti izvođenja PCR reakcije (temperatura i trajanje svakog koraka) prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Reakcijski uvjeti lančane reakcije polimerazom

	Temperatura (°C)	Vrijeme
Aktivacija polimeraze	92	2 min
Denaturacija kalupa	94	30 sek
Prianjanje početnica	56	30 sek
Produženje lanca	72	2 min
Završno produženje	72	10 min

3.2. Elektroforeza

Prisutnost PCR proizvoda provjerena je elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem 0,75 g agaroze (Certified™ PCR Agarose, Bio-Rad) u 50 ml 1 X TBE pufera. U agarozu je dodan SYBR Safe Gel stain (Invitrogen) 5µl. Na parafilmu je izmiješano 5 µl PCR proizvoda i 2 µl pufera (LB pufer, engl. loading buffer), koji sadrži 0,25% bromfenol plavila, 0,25% ksilencijanol fluorofosfata i 15% fikola, te su naneseni u jažice u gelu. U prvu jažicu nanesen je biljeg veličine DNK fragmenata koji se sastoji od 10 dvolančanih DNK molekula veličina 100 pb, 200 pb, 300 pb itd., do 1000 pb (100 bp Molecular Ruler, 100 µg/ml, Bio-Rad). Elektroforezom je provjereno je li došlo do umnažanja željenog slijeda, te jesu li se pojavili dodatni, nespecifični fragmenti. Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi, pri naponu od 90 V u trajanju od 40 minuta. Gelovi su promatrani u transiluminatoru te fotografirani digitalnim fotoaparatom.

3.3. Identifikacija polimorfnih nukleotidnih mjesta

PCR proizvodi pročišćeni su pomoću komercijalnog kita Invitrogen ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit i poslani na sekvenciranje u servis Macrogen Europe u Amsterdam, Nizozemska, gdje koriste 3730XL Automatic DNA sequencer. Rezultati sekvencioniranja (elektroferogram i nukleotidne slijedove) dobiveni su u ab1 i PDF formatu.

Sljedovi kontrolne regije analizirani su u BioEdit programu (HALL, 1999.). U BioEditu je implementiran ClustalW program (THOMPSON i sur., 1994.) kojim je izvršeno višestruko sravnjenje sljedova DNK i identificirana su sva polimorfna nukleotidna mjesta.

3.4. Pokazatelji raznolikosti

Programski paket Arlequin, v. 3.1 (EXCOFFIER i sur., 2005.) korišten je za izračun učestalosti pojedinih haplotipova i osnovnih pokazatelja raznolikosti unutar populacije. Kao pokazatelji raznolikosti navedeni su haplotipska (H) te nukleotidna raznolikost (II). Haplotipsku raznolikost (H) definiramo kao vjerojatnost da se dva slučajno odabrana haplotipa razlikuju unutar jednog uzorka (TORO i CABALLERO, 2005.). Nukleotidna raznolikost (II) opisuje vjerojatnost da su dva slučajno odabrana homologna nukleotida

različita, odnosno predstavlja srednji broj nukleotidnih razlika po nukleotidnom mjestu između dva nasumično odabrana homologna slijeda.

GenBank, odnosno NCBI - National Center for Biotechnology Information je pretraživan alatom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), kako bi se pronašli pohranjeni sljedovi kontrolne regije jelena lopatara iz ostalih dijelova svijeta.

4. REZULTATI

DNK je izolirana iz ukupno 22 uzorka tkiva jelena lopatara. Iz svih uzoraka uspješno je dobiven PCR proizvod te su svi uzorci uspješno sekvencionirani.

Analizirani su sljedovi kontrolne regije mtDNK ukupne dužine 405 parova baza (pb). Kada se analizirani slijed poravna sa sekvencom cijele mtDNK jelena lopatara koja je preuzeta iz GenBank baze (JN632629) (HASSANIN i sur., 2012.), slijed odgovara lokacijama 15,486 – 15,890.

Na analiziranom slijedu utvrđena je prisutnost jednog polimorfnog mjesta koje daje dva jedinstvena haplotipa, s oznakama: DDH1 i DDH2 (*Dama dama* Hrvatska). Učestaliji haplotip DDH1 bio je prisutan kod 14 uzoraka (63,6%), dok je haplotip DDH2 prisutan kod 8 uzoraka (36,4%) (Tablica 2). Haplotipska raznolikost (H) jelena lopatara s područja otoka Veliki Brijun iznosi 0,485, dok je nukleotidna raznolikost (Π) 0,0012.

Tablica 2. Pregled pripadnosti istraženih uzoraka pojedinom haplotipu te učestalost haplotipova

Haplotip	Oznaka uzorka	Broj uzoraka	Učestalost pojedinog haplotipa (%)
DDH1	307	14	63,6
	316		
	223		
	229		
	297		
	294		
	231		
	304		
	303		
	296		
	314		
	232		
	225		
	295		
DDH2	315	8	36,4
	226		
	227		
	298		
	299		
	230		
	293		
228			

Da bi se procijenio filogenetski status populacije s Brijuna u odnosu na ostale europske populacije jelena lopatara, uspoređeni su dobiveni sljedovi kontrolne regije mitohondrijske DNK s 37 sljedova pohranjenih u GenBanku. Sljedovi su uspoređeni u dužini od 329 pb te haplotip DDH1 odgovara sekvenci JN632629 (HASSANIN i sur., 2012.) i JF505624 iz Njemačke (LUDWIG i sur., 2012.), dok haplotip DDH2 odgovara sekvenci JF505623 također iz Njemačke (LUDWIG i sur., 2012.). Taj haplotip je najučestaliji haplotip u Njemačkoj (LUDWIG i sur., 2012), a prisutan je i u Mađarskoj i Italiji (MASSETI i sur., 2008).

5. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja ukazuju na nisku raznolikost mtDNK jelena lopatara iz europskih populacija (osim talijanske), te visoku razinu strukturiranja unutar Europe, uz odvajanje populacija sa sjevera od onih s juga (potencijalnog glacijalnog utočišta) (BAKER i sur., 2017.). Ovo podupire saznanja da su populacije u Europi nastale naseljavanjem malog broja jedinki te su pod utjecajem genetičkog drifta. Na temelju rezultata istraživanja BAKER i sur., 2017. može se potvrditi da su populacije na sjeveru Europe nastale naseljavanjem iz Turske, dok za područja Iberije, Sicilije i Anatolije potvrđuju ulogu glacijalnih utočišta. No, zbog nedostatka podataka o autohtonju populaciji, zbog mnogih naseljavanja iz Turske u Europu, a zatim unutar Europe iz jedne zemlje u drugu, zbog uzgoja u zatvorenim populacijama i značajnog utjecaja čovjeka vrlo je otežano tumačiti rezultate genske raznolikosti i strukture.

Smatra se da je naseljavanjem u Europu uneseno ukupno 15 haplotipova mitohondrijske DNK jelena lopatara (LUDWIG i sur., 2012), dok smo u sklopu našeg istraživanja jelena lopatara naseljenih na otok Veliki Brijun utvrdili prisutnost dva haplotipa, koji se poklapaju s haplotipovima prethodno utvrđenim u Njemačkoj.

Iako je u naše istraživanje uključen relativno mali broj uzoraka, s obzirom na zatvorenu otočnu populaciju oni su reprezentativni za analizu raznolikosti mitohondrijske DNK. Naši rezultati u skladu su s onima ostalih istraživanja europskih populacija, te smo utvrdili nešto nižu haplotipsku raznolikost nego imaju veće kontinentalne populacije poput onih u Njemačkoj, Mađarskoj ili Portugalu, a slične haplotipskoj raznolikosti u Španjolskoj i Irskoj (Tablica 3). Najviše razine raznolikosti do sada su utvrđene među autohtonim populacijama u Turskoj, zatim na Rodosu – koji je jedna od prvih naseljenih populacija i čuva autohtonu raznolikost.

Tablica 3. Usporedba dosada objavljenih rezultata istraživanja raznolikosti mtDNK jelena lopatara. N - broj uzoraka, pb - duljina analiziranog slijeda mtDNK, N h - broj haplotipova, H - haplotipska raznolikost, Π - nukleotidna raznolikost

Autor	Podrijetlo uzoraka	N	Pb	N h	H	Π
Ovo istraživanje	Hrvatska, NP Brijuni	22	405	2	0,485	0,0012
MASETI i sur. (2007)	Turska	5	417	4	0,70	0,120
MASETI i sur. (2007)	Rodos, Grčka	13	417	8	0,86	0,057
MASETI i sur. (2007)	Italija, Mađarska, Grčka	19	417	11	0,89	0,099
LUDWIG i sur. (2012.)	Njemačka	365	329	10	/	0,095
BAKER i sur. (2017.)	Španjolska	19	683	4	0,456	0,00069
BAKER i sur. (2017.)	Portugal	17	683	3	0,647	0.00507
BAKER i sur. (2017.)	Italija	30	683	7	0,731	0.01029
BAKER i sur. (2017.)	Engleska	57	683	15	0,902	0.0031

BAKER i sur. (2017.)	Irska	16	683	4	0,442	0.00068
BAKER i sur. (2017.)	Mađarska	13	683	3	0,513	0.0008
BAKER i sur. (2017.)	Turska	20	683	2	0,1	0.00028
BAKER i sur. (2017.)	Bugarska	11	683	1	0	0
KUSZA i sur. (2018.)	Mađarska	41	450	3	0,678	0,003

6. ZAKLJUČCI

1. Analizirani slijed kontrolne regije mitohondrijske DNK jelena lopatara iz Nacionalnog parka Brijuni odgovara pozicijama 15,486 – 15,890 kada se usporedi s čitavom sekvencom mtDNK *Dama dama* preuzete iz GenBank.
2. Utvrđena je prisutnost dva haplotipa (DDH1 i DDH2) mitohondrijske DNK jelena lopatara iz Nacionalnog parka Brijuni.
3. Najučestaliji haplotip je DDH1 prisutan kod 63,6% uzoraka.
4. Haplotip DDH1 odgovara sekvenci JN632629 (HASSANIN i sur., 2012) i JF505624 iz Njemačke (LUDWIG i sur., 2012), dok haplotip DDH2 odgovara sekvenci JF505623 također iz Njemačke (LUDWIG i sur., 2012).
5. Zbog izoliranosti otočne populacije, jelen lopatar s otoka Veliki Brijun pokazuje nešto manju raznolikost u odnosu na ostale istražene populacije u zapadnoj Europi.

7. LITERATURA

ARSLANGÜNDOĞDU Z., M. KASPAREK, H. SARIBAŞAK, M. S. KAÇAR, O. YÖNTEM, M. TUĞRUL ŞAHİN (2010): Development of the population of the European Fallow Deer, *Dama dama dama* (Linnaeus, 1758), in Turkey (Mammalia: Cervidae). Zool. Middle East 49, 3-12.

BAKER K.H., H.W.I. GRAY, V. RAMOVŠ, D. MERTZANIDOU, Ç. AKIN PEKŞEN, C.C. BILGIN, N. SYKES, A.R. HOELZEL (2017): Strong population structure in a species manipulated by humans since the Neolithic: the European fallow deer (*Dama dama dama*). Heredity 119, 16-26.

BROWN W.M., M. GEORGE JR., A.C. WILSON (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76 (4), 1967-1971.

BROWN, W.M. (1985): The mitochondrial genome of animals. U: Evolution of genes and proteins (MacIntyre, R. J., ur.). Plenum Press. New York. pp. 95-130.

BROWN, J.R., A.T. BECKENBACH, M.J. SMITH (1993): Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Mol. Biol. Evol. 10, 326-41.

CHAKANYA C., A.E.M. DOKORA, V. MUCHENJE, L. C. HOFFMAN (2016): The fallow deer (*Dama spp.*); endangered or not? Damhirsche (*Dama spp.*), bedroht oder unbedroht? Zool. Garten N.F. 85, 160–172.

CLAYTON, D.A. (1991): Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 7, 453–478.

DASZKIEWICZ, T., N. HNATYK, D. DĄBROWSKI, P. JANISZEWSKI, A. GUGOLEK, D. KUBIAK, K. ŚMIECIŃSKA, R. WINARSKI, M. KOBALCZYK (2015): A comparison of the quality of the *Longissimus luborum* muscle from wild and farm raised fallow deer (*Dama dama* L.). Small Ruminant Res. 129, 77-83.

EXCOFFIER, L., G. LAVAL, S. SCHNEIDER (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1, 47-50.

FATOVIĆ-FERENČIĆ, S. (2006): Brijuni Archipelago: Story of Kupelwieser, Koch, and Cultivation of 14 Islands. *Croat. Med. J.* 47, 369-371.

GILBERT, C., A. ROPIQUET, A. HASSANIN (2006): Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. *Mol. Phylogen. Evol.* 56, 101-117.

HALL, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nuc. Acid. Symp. Ser.* 41, 95-98.

HASSANIN, A., F. DELSUC, A. ROPIQUET, C. HAMMER, B. JANSEN van VUUREN, C. MATTHEE, M. RUIZ-GARCIA, F. CATZEFLIS, V. ARESKOUG, T.T. NGUYEN, A. COULOUX (2012): Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *C. R. Biol.* 335 (1), 32-50.

HEIDEMANN, G. (1987): Status of Turkish Fallow Deer (*Cervus dama dama*). Proceedings of the International Symposium on Wild Fauna in Turkey and in the Balkan Countries, 16-20 September, Istanbul, Turkey, pp. 48-60.

HOELZEL, A.R. (1993): Evolution by DNA turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3(6), 891–895.

KJELLANDER, P., I. SVARTHOLM, U. A. BERGVALL, A. JARNEMO (2012): Habitat use, bedside selection and mortality rate of neonate fallow deer *Dama dama*. *Wildl. Biol.* 18, 280–291.

KOCHER, T.D., W.K. THOMAS, A. MEYER, S.V. EDWARDS, S. PÄÄBO, F.X. VILLABLANCA, A.C. WILSON (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6196 - 6200.

KUSZA S., M.R. ASHRAFZADEH, B. TÓTH, A. JÁVOR (2018): Maternal genetic variation in the northeastern Hungarian fallow deer (*Dama dama*) population. *Mamm. Biol.* 93, 21-28.

LADOUKAKIS E.D., E.ZOUROS (2017): Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: rules and exceptions. *J. of Biol. Res. - Thessaloniki* 24, 2.

LANGBEIN J., S. J. THIRGOOD (1989): Variation in mating systems of fallow deer (*Dama dama*) in relation to ecology. *Ethology* 83, 195-214.

LINDSEY, P.A., P.A. ROULET, S.S. ROMANÑAN (2007): Economic and conservation significance of the trophy hunting industry in sub-Saharan Africa. *Bio.Consv.* 134, 455–469.

LUDWIG, A., C. VERNESI, D. LIECKFELDT, E.Z. LATTENKAMP, A. WIETHÖLTER, W. LUTZ (2012): Origin and patterns of genetic diversity of German fallow deer as inferred from mitochondrial DNA. *Eur. J. Wildl. Res.* 58, 495-501.

MARTIN, T. G., P. ARCESE, N. SCHEEDER (2011): Browsing down our natural heritage: Deer impacts on vegetation structure and songbird populations across an island archipelago. *Bio. Cons.* 144, 459-469.

MASSETI M. (1996): The postglacial diffusion of the genus *Dama Frisch*, 1775, in the Mediterranean region. *Suppl. alle Ricerche di Biol. della Selvag.* 25, 7-29.

MASSETI, M., A. CAVALLARO, E. PECCHIOLI, C. VERNESI (2006): Artificial occurrence of the Fallow Deer, *Dama dama dama* (L., 1758), on the Island of Rhodes (Greece): Insight from mtDNA analysis. *J. Hum. Evol.* 21, 167-175.

MASSETI, M. (2007): Island of deer. *Deer* 14 (3), 36-41.

MASSETI, M., D. MERTZANIDOU (2008): *Dama dama*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. Available at: <http://www.iucnredlist.org>. Accessed: August 28, 2018.

MASSETI, M., E. PECCHIOLI, C. VERNESI (2008): Phylogeography of the last surviving populations of Rhodian and Anatolian Fallow Deer (*Dama dama dama* L., 1758). *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 93, 835-844.

MASTERS, N.J., E.F. MURRAY (2015): Tragulidae, Moschidae and Cervidae. U: *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* (Miller R.E., M. E. Fowler, ur.), Elsevier Inc. 8, 611-625.

MATTIELLO S., V. MATTIANGELI, L. BIANCHI, C. CARENZI (1997): Feeding and social behavior of fallow deer (*Dama dama* L.) under intensive pasture confinement. *J. Anim. Sci.* 75, 339-347.

PUTMAN, R. (1993): Flexibility of social organisation and reproductive strategy in deer. *Deer* 9, 23 – 28.

PUTMAN, R., W.T. FLUECK (2011): Intraspecific variation in biology and ecology of deer: magnitude and causation. *Anim. Prod. Sci.* 51, 277-291.

RELVA, M.A., M.A. NUÑEZ, D. SIMBERLOFF (2010). Introduced deer reduce native plant cover and facilitate invasion of non-native tree species: evidence for in vasional melt down. *Biol. Invasions* 12, 303-311.

ROBIĆ, M., A. BECK, M. BELIĆ, R. TURK, B. ARTUKOVIĆ (2016): Histopathological changes in the abomasa of fallow deer from the Brijuni islands in Croatia – short communication. *Vet. arhiv* 86, 265-271.

SCHAAL, A. (1982): Influence de l'environnement sur les composantes du group social chez le daim *Cervus (Dama) dama* L., *Rev. Ecol. Terre Vie* 36, 161.

STACHOWICZ, J.B., E. VANNONI, B.J. PITCHER, E.F. BREIFER, E. GEFFEN, F.G. McELIGOTT (2014): Acoustic divergence in the rut vocalisations of Persian and European fallow deer. *J. Zoo.* 292, 1-9.

THIRGOOD, S., J. LANGBEIN, R.J. PUTMAN (1999): Intraspecific variation in ungulate mating strategies: the case of the flexible fallow deer. *Adv. Study Behav.* 28, 333-361.

THOMPSON, J.D., D.G. HIGGINS, T.J. GIBSON (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

TORO, M.A., CABALLERO, A. (2005): Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 360 (1459), 1367-1378.

TRANTALIDOU K. (2002): The Rhodian fallow deer: game and trophy since prehistoric times. In: *Masetti M, ed. Island of deer natural history of the fallow deer of rhodes and of the vertebrates of the Dodecanese (Greece).* City of Rhodes: Environment Organization, 159-164.

TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, T., I. ALIĆ, A. SLAVICA, M. POLETTO, S. KUŽIR (2012): Preliminary osteometrical analysis of metapodium and acropodium bones of fallow deer (*Dama dama* L.) from the Brijuni Islands (Croatia). *Vet. arhiv* 82, 75-88.

UROŠEVIĆ, N. (2014): The Brijuni Islands – recreating paradise: media representations of an élite Mediterranean resort in the first tourist magazines. *Journal of Tourism History* 6 (2-3), 122-138.

VAWTER, L., W.M. BROWN (1986): Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* 234, 194-196.

SAŽETAK

Raznolikost mitohondrijske DNK jelena lopatara iz Nacionalnog parka Brijuni

KLARA MARIĆ

Zavod za lovstvo i divlje životinje

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Marić, K. (2018): Raznolikost mitohondrijske DNK jelena lopatara iz Nacionalnog parka Brijuni

Jelen lopatar (*Dama dama*) jedna je od najvažnijih vrsta divljači u Europi, a u Hrvatskoj je prisutan prvenstveno u gaterskim uzgojima, dok je slabije zastupljen u otvorenim lovištima i farmskom uzgoju. Smatra se autohtonom vrstom koja je izumrla tijekom posljednjeg ledenog doba, a dokazi upućuju da su područja Iberije, Sicilije, Balkana i Anatolije bili glacijalna utočišta vrste. Danas je u Turskoj jedina preostala autohtona populacija, dok su ostale populacije u Europi nastale kao posljedica ljudskog djelovanja. U svrhu analize genske raznolikosti jelena lopatara iz Nacionalnog parka Brijuni, izolirana je DNK iz 22 uzorka tkiva. Analizirani su sljedovi kontrolne regije mitohondrijske DNK ukupne dužine 405 parova baza te su utvrđena dva haplotipa. Dobiveni sljedovi kontrolne regije mtDNK uspoređeni su s ostalim sljedovima pohranjenim u GenBank i pronađene su podudarnosti sa sekvencama iz Njemačke kod oba haplotipa, a jedan se pojavljuje i u lopatara u Mađarskoj i Italiji. S obzirom na otočnu izoliranost, raznolikost mtDNK iz NP Brijuni je veća nego očekivana te je u skladu s raznolikošću europskih kontinentalnih populacija lopatara.

Ključne riječi: genska raznolikost, mitohondrijska DNK, kontrolna regija, jelen lopatar

SUMMARY

Diversity of mitochondrial DNA in fallow deer from National park Brijuni

KLARA MARIĆ

Department of game and wildlife

Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

Marić, K. (2018): Diversity of mitochondrial DNA in fallow deer from National park Brijuni

Fallow deer (*Dama dama*) is one of the most important game species in Europe. In Croatia the species is mostly kept in enclosures, while breeding in open hunting grounds or farms is rare. It is considered that fallow deer is autochthonous in Europe, but went extinct during the last ice age. Research suggest that Iberia, Sicilia, Balkan and Anatolia were glacial refugia of the species, but today the only autochthonous population survived in Turkey, while all other European populations appear to be result of reintroduction. The goal of our research was to analyze genetic diversity in fallow deer from National park Brijuni, Croatia. DNA was isolated from 22 tissue samples. A total of 405 base pairs of mitochondrial DNA control region were sequenced and two haplotypes were detected. Control region sequences were compared with ones from Genbank database and matches with sequences from Germany were found in both haplotypes, while one of the haplotypes was also present in fallow deer in Hungary and Italy. Considering island isolation, diversity of mtDNA of *Dama dama* from National park Brijuni was higher than expected and in accordance with diversity of European continental populations of fallow deer.

Key words: genetic diversity, mitochondrial DNA, control region, fallow deer

ŽIVOTOPIS

Klara Marić rođena je 04. rujna 1993. godine u Zadru, Hrvatska. Završila je opću gimnaziju Jurja Barakovića i srednju Glazbenu školu Blagoje Bersa u Zadru te stekla zvanje glazbenika teoretičara. Godine 2012. upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje na raznim seminarima i kongresima, a 2017. godine dobiva Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad pod nazivom „Biomarkeri periodontalnih bolesti izdvojeni iz sline pasa“ koji potpisuje s kolegicom Petrom Šoštarić. Nagrađeni rad je objavljen u znanstveno – stručnom časopisu studenata veterinarske medicine „Veterinar“. Dobitnica je stipendije Sveučilišta u Zagrebu i stipendije grada Zadra. Od osnovne škole se bavi atletikom, a 2015. godine ostvarila je kategorizaciju Hrvatskog olimpijskog odbora kao vrstan sportaš. Kroz cijelokupno školovanje stekla je znanje engleskog, talijanskog, španjolskog i ruskog jezika.