

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

DRAGANA KOS

**Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA
kune bjelice (*Martes foina*) iz središnje Hrvatske**

Zagreb, 2011.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biologiju, patologiju i uzgoj divljači, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Zdravstveni nadzor divljači (053-0532400-2398) voditelja prof. dr. sc. Alena Slavice. Rad je izrađen pod vodstvom Magde Sindičić dr. med. vet. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2010./2011.

Popis kratica

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

H – haplotipska raznolikost

IUCN – International Union for Conservation of Nature

MFH – *Martes foina* haplotip

mtDNA – mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina

NCBI – National Center for Biotechnology Information

PCR – (Polymerase Chain Reaction), lančana reakcija polimerazom

Π – nukleotidna raznolikost

Sadržaj

Uvod.....	1
Hipoteza.....	3
Materijal i metode	3
Rezultati.....	5
Rasprava.....	10
Zaključci.....	11
Zahvala.....	11
Popis literature.....	12
Sažetak.....	17
Summery.....	18

Uvod

Kuna bjelica (*Martes foina*) je sisavac iz reda zvijeri (*Carnivora*) i porodice kuna (*Mustelidae*). Naseljava veći dio Europe, s izuzetkom većine sredozemnih otoka te Velike Britanije i Irske, Bliski istok i Središnju Aziju (TIKHONOV i sur., 2011.). Sjeverna granica rasprostranjenosti u Europi je Danska (LACHAT, 1991.). Rasprostranjenost kune bjelice je od šezdesetih godina prošlog stoljeća porasla u mnogim europskim državama (PROULX i sur., 2000.; TIKHONOV i sur., 2011.). U Hrvatskoj je kuna bjelica autohtona vrsta i naseljava kontinentalni, središnji i južni dio zemlje, te je nalazimo u priobalju i na otocima. Brojna je u krškim staništima, dok se u brdskim i brdsko planinskim područjima nalazi tijekom ljeta, a početkom zime migrira u niže predjele (JANICKI i sur., 2007.). Iako je prilagođena toplijoj klimi i nedostaju joj morfološke prilagodbe koje bi joj omogućile preživljavanje u uvjetima oštih zima s mnogo snijega (npr. krzno je nešto rijede, a šape su bezdlačne), nalazimo je na područjima koja se prostiru od razine mora do 4200 m nadmorske razine (TIKHONOV i sur., 2011.). Naseljava različite tipove staništa - šume, kamenita područja, polja i pašnjake. Dobro je prilagođena suživotu s ljudima i kontinuirano širi svoje stanište na suburbana i urbana područja (PROULX i sur., 2000.).

IUCN kunu bjelicu kategorizira u najniži stupanj ugroženosti (engl. *least concern*), dok se prema Bernskoj konvenciji nalazi na Dodatku III (TIKHONOV i sur., 2011.). U većini zemalja u kojima je prisutna, kuna bjelica se legalno lovi i njezina je populacija stabilna ili u porastu (PROULX i sur., 2000.). Štoviše, ova se vrstu često smatra štetočinom zbog šteta koje može uzrokovati na ljudskim nastambama, vozilima i uzgojima peradi te se zbog toga izlovljava (WAECHTER, 1975.; LACHAT, 1991.; LUCHERINI i CREMA, 1993.). Lovi ju se i zbog krzna, te u pojedinim područjima zbog mesa.

Genska raznolikost predstavlja evolucijski potencijal vrste i važna je za sposobnost prilagodbe na promjene u okolišu. Osnovni alat za istraživanje genske raznolikosti su genetski markeri, pomoću kojih se određuje prisutnost alela u populaciji (CONNER i HARTL, 2004.) Genska raznolikost se danas uglavnom istražuje pomoću neutralnih markera, budući još nije razvijena tehnologija istraživanja kodirajućih, funkcionalno važnih lokusa (VALI i sur., 2008.). Jedan od takvih neutralnih markera je i kontrolana regija mitohondrijske DNA korištena u ovom istraživačkom radu. Mitohondrijska DNA (mtDNA) je kružna dvolančana DNA molekula koja se sastoji od 15 000 do 20 000 parova baza (pb), haploidna je, nema introna i nasljeđuje se samo od majke. Molekula se dijeli na dva osnovna dijela – kodirajući i ne-kodirajući dio. Kodirajući dio mtDNA sisavaca sadrži 37 gena, od čega 22 tRNA gena,

dva ribosomalna RNA gena i 13 gena koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u procesima transporta elektrona i oksidativne fosforilacije (JANKE i sur., 1994.). Ne-kodirajući dio se naziva kontrolna regija (BROWN, 1985.), te se tu očituje najveća raznolikost nukleotida i dužine sekvence u usporedbi s ostatkom mtDNA (HOELZEL i sur., 1994.). Kontrolna regija je mjesto u kojem započinje replikacija i transkripcija mitohondrijskog genoma (CLAYTON, 1991), sastoji se od oko 1 000 parova baza, te budući da ne kodira za sintezu proteina nije podložna prirodnoj selekciji, što ju čini vrlo dobrim genetskim markerom u rješavanju filogenetskih pitanja. Najčešće mutacije u kontrolnoj regiji su točkaste mutacije (KOCHER i sur., 1989.; AVISE, 1994.). Sama mitohondrijska DNA podložna je brzom evoluciji, tako da je kod sisavaca brzina evolucije mtDNA i do deset puta brža nego kod jezgrinih gena, a u mtDNA najbrže evoluira kontrolna regija i to četiri do pet puta brže od ostatka mtDNA (TABERLET, 1996.; PAGE i HOLMES, 1998.). Zbog toga je mtDNA dobar marker za razlučivanje promjena na nižim taksonomskim razinama, odnosno između vrsta i populacija (ZHANG i HEWITT, 1996.). Zbog velike brzine mutacije mtDNA varijabilna je unutar prirodnih populacija, zbog čega je vrlo korisna pri istraživanjima kraćih razdoblja povijesti populacija (GALTIER i sur., 2009.). Mutacije unutar kontrolne regije temelj su za razlikovanje haplotipova.

Do sada u znanstvenoj literaturi nisu objavljeni podaci o raznolikosti mtDNA kune bjelice, iako je to učinjeno za srodnu vrstu – kunu zlaticu (*Martes martes*). Objavljeno je nekoliko znanstvenih radova o genetskim metodama razlikovanja kune bjelice i kune zlatice - upotrebom mikrosatelita kao genetskih markera za razlikovanje tih dviju vrsta iz uzoraka izmeta (PILOT i sur., 2007.), razlikovanje pomoću polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata kontrolne regije mtDNA (RUIZ-GONZALEZ i sur., 2008.), te razlikovanje na temelju polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata citokroma b (LIVIA i sur., 2007.). FERNANDES i sur. (2008.) razvili su metodu razlikovanja 16 vrsta zvijeri Iberijskog poluotoka (uključujući kunu bjelicu) pomoću citokroma b mtDNA. U znanstvenom radu koji se bavi istraživanjem filogeografije i povijesti populacije kune zlatice u Europi pomoću kontrolne regije mtDNA, autori su istraživanjem za usporedbu obuhvatili i jedan uzorak kune bjelice (DAVISON i sur., 2001.).

Hipoteza

Cilj ovog znanstvenog istraživanja je utvrditi gensku raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA kune bjelice iz središnje Hrvatske. Pretpostavljam da kuna bjelica ima očuvanu gensku raznolikost i veliki broj haplotipova mitohondrijske DNA, jer nije zabilježen pad brojnosti ili fragmentacija staništa ove vrste u Hrvatskoj.

Materijal i metode

Istraživanje sam provela na 28 uzoraka jetre i bubrega kune bjelice (*Martes foina*). Uzorci su prikupljeni u sklopu redovitih aktivnosti Laboratorija za opću patologiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu i bili su pohranjeni u 86% etanolu. Podaci o zemljopisnom podrijetlu uzoraka navedeni su u Tablici 1.

DNA sam iz tkiva izolirala pomoću komercijalnog kita Invitrogen ChargeSwitch gDNA Tissue Kits, protokol izolacije je pratio uputu proizvođača.

Da bih dobila dovoljnu količinu molekula kontrolne regije mtDNA, izoliranu DNA umnožila sam lančanom reakcijom polimerazom (PCR). Kod provođenja PCR korištene su početnice L15997 (5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3') (WARD i sur., 1991.) i H16498 (5'-CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3') (MEYER i sur., 1990.), kojima nastaje produkt dužine 850 parova baza (pb).

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 koji sadrži dGTP, dATP, dTTP, dCTP.

PCR reakcija provedena u smjesi količine 50 μL koja je sadržavala 4 μl DNA, 1 μl otopine početnica, 45 μl Platinum[®] PCR SuperMix, Invitrogen. Reakcija se provodila koristeći uređaj Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

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

1. 94° - 120 sec
2. 94° - 30 sec, 48° - 90 sec, 72° - 120 sec, 40 ciklusa
3. 72° - 10 min.

Prisutnost PCR proizvoda provjeravala sam elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem 0,75 g agaroze (Certified[™] PCR Agarose, Bio-Rad, SAD)

u 50 ml 1 X TBE pufera. U agarozu je dodan SYBR Safe Gel stain 5 μ l. Na parafilmu je izmiješano 5 μ l PCR proizvoda i 2 μ l pufera (LB pufer, engl. loading buffer), koji sadrži 0,25% bromfenol plavila, 0,25% ksilencijanol fluorofosfata i 15% fikola, te naneseo u jažice u gelu. U prvu jažicu naneseo je biljeg veličine DNA fragmenata koji se sastoji od 10 dvolančanih DNA molekula veličina 100 pb, 200 pb, 300 pb itd., do 1000 pb (100 bp Molecular Ruler, 100 μ g/ml, Bio-Rad, SAD). Elektroforezom je provjereno da li je došlo do umnažanja željenog slijeda ili nije, te da li su se pojavili dodatni, nespecifični fragmenti. Elektroforezu sam provodila na sobnoj temperaturi, pri naponu od 90 V, a trajala je 40 minuta. Gelovi su promatrani u transiluminatoru te fotografirani digitalnim fotoaparatom.

PCR proizvode poslala sam na sekvenciranje u servis "Invitrogen", Seul, Koreja koji koristi 96-kapilarni genski analizator "ABI3730x1 DNA Analyzer", Applied Biosystems. Usluga je također uključivala pročišćavanje PCR proizvoda. Rezultate sekvenciranja dobila sam u elektroničkom obliku i to kao PDF, AB1 i TXT datoteke.

Sljedove sam analizirala u BioEdit programu (HALL, 1999.). U BioEditu je implementiran ClustalW program (THOMPSON i sur., 1994.) kojim sam izvršila višestruko sravnjenje sljedova DNA i identificirala sva polimorfna nukleotidna mjesta.

Programski paket Arlequin, ver. 3.1 (EXCOFFIER i sur., 2005.) koristila sam za izračun frekvencija haplotipova i osnovnih indeksa raznolikosti unutar populacija. Gensku udaljenost između haplotipova prikazala sam kao srednji broj različitih nukleotida između svih parova haplotipova unutar istraživanog uzorka (π). Kao pokazatelje indeksa raznolikosti izračunala sam gensku (H) te nukleotidna raznolikost (Π).

GenBank, odnosno NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pretražila sam alatom BLAST-om (Basic Local Alignment Search Tool), u potrazi za pohranjenim sljedovima kontrolne regije kuna bjelica iz ostalih dijelova svijeta.

MEGA v.4 (TAMURA i sur., 2007.) koristila sam kod provedbe filogenetske analize haplotipova istraživanih životinja. Filogenetsko stablo rekonstruirano je „neighbor-joining“ (NJ) metodom.

Rezultati

DNA sam izolirala iz ukupno 28 uzoraka tkiva kune bjelice, od čega sam kod 25 uzoraka (89,3%) dobila PCR proizvod. Upotrebljive rezultate sekvenciranja sam dobila za 22 uzorka (78,65% početnog broja uzoraka) (Tablica 1).

Tablica 1. Pregled zemljopisnog podrijetla, uspješnosti PCR reakcije, uspješnosti sekvenciranja te pripadnosti pojedinom haplotipu istraženih uzoraka.

R. br.	Oznaka uzorka	Lokacija	PCR proizvod	Uspješnost sekvenciranja	Haplotip
1	14K	Varaždin	DA	DA	MFH4
2	15K	Varaždin	DA	DA	MFH4
3	16K	Ivanec	DA	DA	MFH1
4	17K	Varaždin	DA	DA	MFH4
5	19K	Ivanec	DA	DA	MFH4
6	20K	Ivanec	DA	NE	-
7	23K	Ivanec	NE	-	-
8	26K	Ivanec	DA	DA	MFH7
9	28K	Zagreb	DA	DA	MFH4
10	29K	Zagreb	DA	DA	MFH2
11	30K	Varaždin	DA	DA	MFH6
12	32K	Varaždin	DA	NE	-
13	33K	Varaždin	DA	DA	MFH1
14	34K	Varaždin	DA	DA	MFH1
15	38K	Ivanec	DA	DA	MFH4
16	39K	Ivanec	DA	DA	MFH5
17	42K	Varaždin	DA	NE	-
18	48K	Ivanec	NE	-	-
19	53K	Varaždin	DA	DA	MFH1
20	54K	Ivanec	DA	DA	MFH6
21	57K	Ivanec	DA	DA	MFH4
22	137K	Varaždin	DA	DA	MFH8
23	138K	Sisak	DA	DA	MFH3
24	159K	Ivanec	DA	DA	MFH4
25	160K	Ivanec	NE	-	-
26	172K	Varaždin	DA	DA	MFH1
27	173K	Ivanec	DA	DA	MFH3
28	174K	Zagreb	DA	DA	MFH4

Analizirala sam sljedove ukupne dužine 302 pb i utvrdila prisutnost 28 polimorfnih mjesta, koja čine 9,3% dužine analiziranog slijeda. Utvrđena polimorfna mjesta daju osam jedinstvenih haplotipova, označenih s MFH1 do MFH8. Pripadnost pojedinih uzoraka određenom haplotipu prikazana je u Tablici 1. Dva polimorfna mjesta proizlaze iz insercije/delecije, dok svih ostalih 26 polimorfni mjesta proizlazi iz baznih supstitucija (Tablica 2.).

U Tablici 2. prikazana su polimorfna mjesta za svaki od osam haplotipova mitohondrijske DNA kune bjelice. Najviše polimorfni mjesta, čak 26 (8,6% istraživane sekvence od 302 pb), imaju haplotipovi MFH6, MFH7 i MFH8. Slijedi haplotip MFH5 s 23 polimorfna mjesta (7,6%), zatim MFH4 s tri polimorfna mjesta (1,0%) te haplotipovi MFH2 i MFH3 s po dva polimorfna mjesta (0,7%). S obzirom na broj različitih nukleotida među njima, najviše se međusobno razlikuju haplotip MFH1 i haplotipovi MFH2 i MFH3 s 26 različitih nukleotida.

Tablica 2. Polimorfna mjesta 8 haplotipova mtDNA kune bjelice iz središnje Hrvatske. Polimorfna mjesta su označena brojevima koji odgovaraju redosljedu na analiziranom slijedu dužine 302 pb. Točke označavaju identitet s haplotipom MFH1, a crtice označavaju deleciju nukleotida.

Haplotip	15	17	18	20	44	51	69	73	76	78	89	101	134	135	139
MFH1	C	C	A	T	C	A	C	C	A	-	T	A	C	T	C
MFH2	-	.	G	.	.	.
MFH3	-
MFH4	-	.	.	T	.	.
MFH5	T	T	G	C	T	G	T	T	C	A	C	G	T	.	.
MFH6	T	T	G	C	T	G	T	-	C	A	C	G	T	C	T
MFH7	T	T	G	C	T	G	T	-	C	A	C	G	T	C	T
MFH8	T	T	G	C	T	G	T	-	C	A	T	G	T	C	T

Haplotip	142	145	148	160	165	170	180	188	214	215	218	247	265
MFH1	G	T	A	C	C	C	G	A	T	A	C	G	C
MFH2
MFH3	A	.
MFH4	.	.	.	T
MFH5	.	C	G	.	T	T	A	G	C	C	.	A	A
MFH6	A	C	G	.	T	T	A	G	C	C	T	A	A
MFH7	A	C	G	.	T	T	A	G	C	C	C	A	A
MFH8	A	C	G	.	T	T	A	G	C	C	T	A	A

Učestalost pojedinih haplotipova prikazana je u Tablici 3. Najučestaliji je haplotip MFH4 prisutan kod devet uzoraka odnosno kod 40,9% uspješno sekvenciranih uzoraka. Zatim po učestalosti slijedi haplotip MFH1 prisutan kod pet uzoraka (22,7%), haplotipovi MFH3 i MFH6 od kojih je svaki zastupljen s po dva uzorka (9,1%), te naposljetku haplotipovi MFH2, MFH5, MFH7 i MFH8 zastupljeni svaki s po jednim uzorkom (4,5%).

U Tablici 3. svakom je haplotipu pridružena lokacija s koje potječu uzorci tkiva koji pripadaju tom haplotipu. Vidljivo je da geografska distribucija haplotipova ne pokazuje značajnu pravilnost tj. pojedini haplotipovi nisu isključivo vezani uz određena područja. Međutim, takav zaključak treba donositi s oprezom, zbog male veličine istraživanog uzorka.

Tablica 3. Učestalosti svakog haplotipa.

Haplotip	BR uzoraka	Učestalost haplotipa	Lokacije
MFH1	5	0.227	Ivanec (n=1), Varaždin (n=4)
MFH2	1	0.0455	Zagreb
MFH3	2	0.0909	Ivanec (n=1), Sisak (n=1)
MFH4	9	0.409	Ivanec (n=4), Varaždin (n=3), Zagreb (n=2)
MFH5	1	0.0455	Ivanec
MFH6	2	0.0909	Ivanec (n=1), Varaždin (n=1)
MFH7	1	0.0455	Ivanec
MFH8	1	0.0455	Varaždin

Utvrđena haplotipska raznolikost (H) kune bjelice s područja središnje Hrvatske iznosi 0.792 +/- 0.0689, dok je nukleotidna raznolikost (Π) 0.034 +/- 0.0182 (Tablica 4).

Tablica 4. Indeksi genske raznolikosti kune bjelice iz središnje Hrvatske

N	H	π	Π
22	0.792 +/- 0.069	10.364 +/- 4.916	0.034 +/- 0.0182

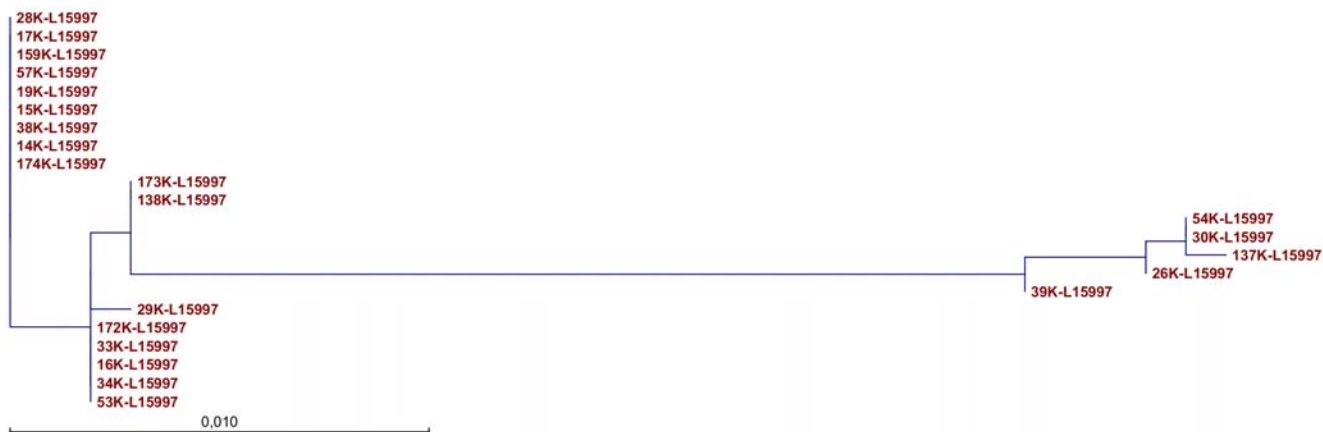
N – broj istraživanih jedinki

H – genska raznolikost (haplotipska raznolikost)

π – srednji broj različitih nukleotida između sljedova

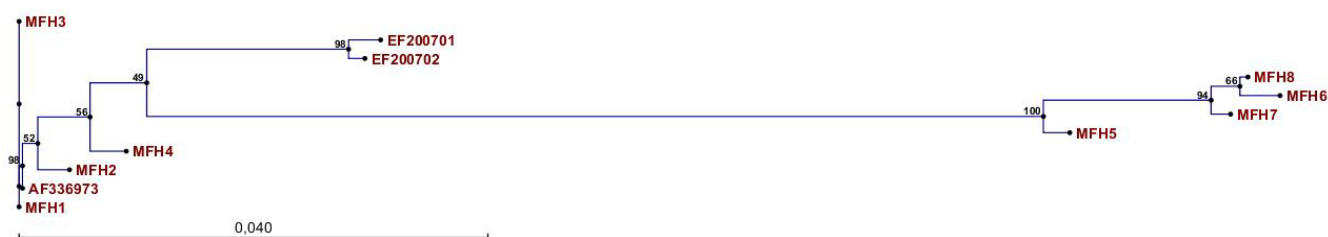
Π - nukleotidna raznolikost

Filogenetsko stablo na Slici 1. grupira 22 analizirana sljedova kontrolne regije mtDNA u haplotipove i prikazuje njihovu međusobnu filogenetsku povezanost. Na filogenetskom stablu vidljivo je da su haplotipovi MFH1, MFH2, MFH3 i MFH4 prikazani kao skupina udaljena od skupine haplotipova MFH5, MFH6, MFH7 i MFH8, što upućuje na filogenetsku sličnost haplotipova unutar pojedine skupine, te na značajnu različitost između dviju odvojenih skupina.



Slika 1. Filogenetsko stablo 22 uzorka kuna bjelica iz središnje Hrvatske.

Pretraživanjem računalne baze podataka NCBI – GenBank pronašla sam tri slijeda kontrolne regije mitohondrijske DNA kune bjelice iz ostalih dijelova svijeta. Uzorci pohranjeni u bazi pod oznakom EF200701 i EF200702 potječu s Iberijskog poluotoka, dok za uzorak AF336973 znamo da je iz Europe, no nije navedena zemlja podrijetla. Usporedila sam sljedove haplotipova dobivene u ovom istraživanju s tri haplotipa pohranjena u GenBanku u dužini od 245 pb i utvrdila da se ne poklapaju. Na Slici 2. prikazano je filogenetsko stablo osam haplotipova dobivenih u ovom istraživanju i haplotipova iz GenBank baze. Vidljivo je da se haplotip AF336973 grupira s haplotipom MFH1, dok se EF200701 i EF200702 odvajaju u zasebnu skupinu.



Slika 2. Filogenetsko stablo 8 haplotipova kune bjelice iz središnje Hrvatske (MFH1-MFH8) i 3 haplotipa iz GenBank baze podataka (EF200701, EF200702, AF336973).

Rasprava

Ovim istraživanjem dobiveni su prvi podaci o raznolikosti kontrolne regije mitohondrijske DNA kune bjelice (*Martes foina*) u Hrvatskoj, ali i u svijetu. Na 22 uzorka kune bjelice iz središnje Hrvatske analizirala sam slijed kontrolne regije mitohondrijske DNA dužine 302 para baza. Pronašla sam ukupno 28 polimorfni mjesta, što čini osam jedinstvenih haplotipova. Utvrđena haplotipska raznolikost (H) iznosila je 0.792 ± 0.0689 , dok je nukleotidna raznolikost (II) bila 0.034 ± 0.0182 , čime sam potvrdila vrlo visoku raznolikost mtDNA. U usporedbi s podacima o nukleotidnoj raznolikosti kune zlatice (*Martes martes*) (DAVISON i sur., 2001.) vidljivo je da kuna bjelica očituje veću raznolikost od kune zlatice. Naime, DAVISON i sur. (2001.) istražili su 325 pb kontrolne regije na 139 uzoraka kune zlatice iz 14 europskih zemalja, te su dobili vrijednost nukleotidne raznolikosti 0.021. PERTOLDI i sur. (2006.) utvrdili su da tvor (*Mustela putorius*) na razini Europe ima reduciranu raznolikost kontrolne regije, budući da je nukleotidna raznolikost (II) iznosila 0.00274 ± 0.00038 , te haplotipska raznolika (H) 0.876 ± 0.028 . Vidrica ili europski mink (*Mustela lutreola*) ugrožena je vrsta koja također ima značajno nižu haplotipsku raznolikost (0.469 ± 0.939) (MICHAUX i sur., 2005.) od one dobivene za kunu bjelicu u ovom istraživanju. Nukleotidna (0.0031 ± 0.0002) i haplotipska raznolikost (0.97 ± 0.01) velike lasice (*Mustela erminea*) u kontinentalnom dijelu Europe je visoka (MARTÍNKOVÁ i sur., 2007.), i može se usporediti s raznolikošću dobivenom za kunu bjelicu u ovom istraživanju.

Većina dosadašnjih podataka o raznolikosti sljedova mtDNA kune bjelice potječe iz istraživanja molekularne evolucije, filogenije i filogeografije (HOSODA i sur., 2000.; STONE i COOK, 2002.; MARMI i sur., 2004.; KOEPFLI i sur., 2008.) te istraživanja vrsno specifičnih početnica za identifikaciju i razlikovanje mustelida i to uglavnom na temelju raznolikosti citokroma b (PILOT i sur., 2007.; LUCENTINI i sur., 2007.; FERNANDES i sur. 2008.; RUIZ-GONZALEZ i sur., 2008.). Na uzorcima iz Njemačke i Kine HOSODA i sur. (2000.) utvrdili su da se haplotipovi citokroma b kune bjelice značajno razlikuju između te dvije zemlje. Usporedbom osam haplotipova pronađenih u ovom istraživanju s tri slijeda kontrolne regije pohranjena u bazi GenBank (dva s Iberijskog poluotoka i jedan iz nedefinirane europske zemlje) nije utvrđena sličnost između haplotipova. S obzirom na lokacije u središnjoj Hrvatskoj na kojima su prikupljeni uzorci, nisam utvrdila značajan geografski obrazac u distribuciji haplotipova.

Radi stjecanja opsežnijih i točnijih spoznaja o genskoj raznolikosti kune bjelice, ovo istraživanje trebalo bi proširiti na cijelu Hrvatsku, ali i na ostatak Europe. Takva saznanja

imala bi veliku važnost u inventarizaciji i upravljanju populacijama, izradi studija utjecaja na okoliš te bi povećala opći fond znanstvenih podataka o našoj prirodi, a što je najvažnije s gledišta očuvanja prirode, dala bi osnovne podatke temeljem kojih možemo pratiti promjene u okolišu i pravovremeno na njih reagirati.

Zaključci

1. Utvrdila sam prisutnost osam haplotipova mitohondrijske DNA kod kune bjelice u središnjoj Hrvatskoj.
2. Haplotipska raznolikost (H) iznosi 0.792 ± 0.0689 , dok nukleotidna raznolikost (Pi) iznosi 0.0343 ± 0.0182 .
3. Među pretraženim uzorcima nije utvrđena geografska pravilnost u rasprostranjenosti haplotipova.

Zahvala

Zahvaljujem Danku Deždeku dr. med. vet. s Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu na ustupljenim uzorcima te dr. sc. Tomislavu Gomerčiću sa Zavoda za biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pomoći prilikom analize rezultata.

Popis literature

- AVISE, J. C. (1994): Molecular Markers, Natural History and Evolution, Chapman & Hall. New York, London.
- BROWN, W. M. (1985): The mitochondrial genome of animals. U: Evolution of genes and proteins (MacIntyre, R. J., urednik). Plenum Press. New York. str. 95-130.
- CLAYTON, D. A. (1991): Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. Annual Review of Cell and Developmental Biology 7, 453–478.
- CONNER, J. D., D. L. HARTL (2004): A primer of ecological genetics, Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- DAVISON, A., J. D. S. BIRKS, R. C. BROOKES, J. E. MESSENGER, H. I. GRIFFITHS (2001): Mitochondrial phylogeography and population history of pine martens *Martes martes* compared with polecats *Mustela putorius*. Molecular Ecology 10, 2479-2488.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, S. SCHNEIDER (2005): Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1, 47-50.
- FERNANDES, C. A., C. GINJA, I. PEREIRA, R. TENREIRO, M. W. BRUFORD, M. SANTOS-REIS (2008): Species-specific mitochondrial DNA markers for identification of non-invasive samples from sympatric carnivores in the Iberian Peninsula. Conservation Genetics 9, 681-690.
- GALTIER, N., B. NABHOLZ, S. GLEMIN, G. D. D. HURST (2009): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. Molecular Ecology 18, 4541-4550.
- HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41, 95-98.
- HOELZEL, A. R., J. V. LOPEZ, G. A. DOVER, S. J. O'BRIEN (1994): Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores. Journal of Molecular Evolution. 39, 191–199.

- HOSODA, T., H. SUZUKI, M. HARADA, K. TSUCHIYA, S. HAN, Y. ZHANG, A. P. KRYUKOV, L. LIN (2000): Evolutionary trends of the mitochondrial lineage differentiation in species of genera *Martes* and *Mustela*. *Genes Genet. Syst.* 75, 259-267.
- JANICKI, Z., A. SLAVICA, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2007): Zoologija divljači. Zavod za patologiju i uzgoj divljači, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet
- JANKE, A., G. FUCHS-FELDMAIER, W. KELLY THOMAS, A. VON HAESELER, S. J. O'BRIEN (1994): The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. *Genetics* 137, 243–256.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 6196-6200.
- KOEPFLI, K., K. A. DEERE, G. J. SLATER, C. BEGG, K. BEGG, L. GRASSMAN, M. LUCHERINI, G. VERON, R. K. WAYNE (2008): Multigene phylogeny of the Mustelidae: Resolving relationships, tempo and biogeographic history of a mammalian adaptive radiation. *BMC Biology* 6, 10.
- LACHAT, N. (1991): Stone martens and cars: a beginning of war?. *Mustelid and Viverrid Conservation* 5, 4-6.
- LIVIA, L., F. VERCILLO, A. PALOMBA, F. PANARA, B. RAGNI (2007): A PCR-RFLP method on faecal samples to distinguish *Martes martes*, *Martes foina*, *Mustela putorius* and *Vulpes vulpes*. *Conservation genetics* 8, 757–759.
- LUCENTINI, L., F. VERCILLO, A. PALOMBA, F. PANARA, B. RAGNI (2007): A PCR-RFLP method on faecal samples to distinguish *Martes martes*, *Martes foina*, *Mustela putorius* and *Vulpes vulpes*. *Conservation Genetics* 8, 757–759.
- LUCHERINI, M., G. CREMA (1993): Diet of urban stone martens in Italy. *Mammalia* 57, 274-277.

- MARMI, J., J. F. LOPEZ-GIRALDEZ, X. DOMINGO-ROURA (2004): Phylogeny, evolutionary history and taxonomy of the Mustelidae based on sequences of the cytochrome *b* gene and a complex repetitive flanking region. *Zoologica Scripta* 33, 481-499.
- MARTÍNKOVÁ, N., R. A. MCDONALD, J. B. SEARLE (2007): Stoats (*Mustela erminea*) provide evidence of natural overland colonization of Ireland. *Proceedings of the Royal Society – Biological Sciences* 274 (1616), 1387-1393.
- MEYER, A., T. D. KOCHER, P. BASASIBWAKI, A. C. WILSON (1990): Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* 347, 550–553.
- MICHAUX, J. R., O. J. HARDY, F. JUSTY, P. FOURNIER, A. KRANZ, M. CABRIA, A. DAVISON, R. ROSOUX, R. LIBOIS (2005): Conservation genetics and population history of the threatened European mink *Mustela lutreola*, with an emphasis on the West European population. *Molecular Ecology* 14, 2373-2388.
- PAGE, R. D. M., E. C. HOLMES (1998): *Molecular Evolution – A Phylogenetic Approach*, Blackwell Science. Oxford.
- PERTOLDI, C., P. BREYNE, M. T. CABRIA, D. HALFMAERTEN, H. A. H. JANSMAN, K. VAN DEN BERGE, A. B. MADSEN, V. LOESCHCKE (2006): Genetic structure of the European polecat (*Mustela putorius*) and its implication for conservation strategies. *Journal of zoology* 270 (1), 102-115.
- PILOT, M., B. GRALAK, J. GOSZCZYNSKI, M. POSLUSZNY (2007): A method of genetic identification of pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*) and its application to faecal samples. *Journal of Zoology* 271, 140-147.
- PROULX, G., K. B. AUBRY, J. BIRKS, S. W. BUSKIRK, C. FORTIN, H. C. FROST, W. B. KROHN, L. MAYO, V. MONAKHOV, D. PAYER, M. SAEKI, M. SANTOS-REIS, R. WEIR, W.J. ZIELINSKI (2000): World distribution and status of the genus *Martes* in 2000. Pages 21-76 in D. J. Harrison, A. K. Fuller, and G. Proulx, editors, *Martens and fisher (Martes) in human-altered landscapes: an international perspective*. Springer, New York, New York, USA.

- RUIZ-GONZALEZ, A., J. RUBINES, O. BERDION, B. J. GOMEZ-MOLINER (2008): A non-invasive genetic method to identify the sympatric mustelids pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*): preliminary distribution survey on the northern Iberian Peninsula. *European Journal of Wildlife Research* 54, 253-261.
- STONE, K. D., J. A. COOK (2002): molecular evolution of Holarctic martens (genus *Martes*, Mammalia: Carnivora: Mustelidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24, 169-179.
- TABERLET, P. (1996): The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. U *Molecular Genetic Approaches in Conservation* (Smith, T. B., R. K. Wayne, urednici). Oxford University Press. New York. str. 125-142.
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI, S. KUMAR (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- 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 Research* 22, 4673-4680.
- TIKHONOV, A., P. CAVALLINI, T. MARAN, A. KRANTZ, J. HERRERO, G. GIANNATOS, M. STUBBE, R. LIBOIS, M. FERNANDES, P. YONZON, A. CHOUDHURY, A. ABRAMOV, C. WOZENCRAFT (2011): *Martes foina*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 19 March 2011.
- VÄLI, Ü., A. EINARSSON, L. WAITS, H. ELLEGREN (2008): To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology* 17, 3808–3817.
- WAECHTER, A. (1975): Ecologie de la fouine en Alsace. *La Terre et La Vie* 24, 399-457.
- WARD, R. H., B. L. FRAZIER, K. DEW-JAGER, S. PAABO (1991): Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8720-8724.

ZHANG, D. X., G. M. HEWITT (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecol & Evolution* 11, 247-251.

Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA kune bjelice (*Martes foina*) iz središnje Hrvatske

DRAGANA KOS

Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

KOS, D. (2011.): Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA kune bjelice (*Martes foina*) iz središnje Hrvatske

Sažetak

Kuna bjelica (*Martes foina*) naseljava središnju Aziju, Bliski istok i veliki dio Europe, osim većine sredozemnih otoka te Velike Britanije i Irske. U Hrvatskoj je autohtona vrsta i naseljava gotovo cijelu zemlju, uključujući priobalje i nekoliko otoka. U većini zemalja u kojima je prisutna, kuna bjelica se legalno lovi i njezina je populacija stabilna ili u porastu što je najvjerojatnije i razlog malog broja dosadašnjih istraživanja koja se bave populacijskom genetikom te vrste. Cilj ovog znanstvenog rada bio je utvrditi gensku raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA kune bjelice iz središnje Hrvatske. Analizirala sam kontrolnu regiju mitohondrijske DNA na 22 uzorka jetre i bubrega. Utvrdila sam ukupno 28 polimorfni mjesta na dužini slijeda od 302 pb, koja čine osam haplotipova s vrlo visokom haplotipskom ($H=0.792 \pm 0.0689$), te nukleotidnom raznolikošću ($\Pi=0.0343 \pm 0.0182$). S obzirom na lokacije u središnjoj Hrvatskoj na kojima su uzorci prikupljeni, nisam utvrdila značajan geografski obrazac u distribuciji haplotipova. Usporedbom osam hrvatskih haplotipova utvrđenih ovim istraživanjem s tri slijeda kontrolne regije pohranjena u bazi GenBank (dva s Iberijskog poluotoka i jedan iz nedefinirane europske zemlje) nisam utvrdila podudarnost između haplotipova.

Ključne riječi: kontrolna regija, mitohondrijska DNA, haplotip, kuna bjelica, *Martes foina*

Diversity of mitochondrial DNA control region in stone marten (*Martes foina*) from central Croatia

DRAGANA KOS

Department for game biology, pathology and breeding
Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

KOS, D. (2011.): Diversity of mitochondrial DNA control region in stone marten (*Martes foina*) from central Croatia

Abstract

Stone marten (*Martes foina*) inhabits central Asia, the Middle East and almost entire Europe, except most Mediterranean islands, Great Britain and Ireland. Stone marten is autochthonous species in Croatia, present in most of the continental part, including coastal region and some of the islands. In most countries where it occurs, the stone marten is a legally harvested, with stable or increasing population. Probably due to stable and growing population size throughout its habitat, population genetic of stone marten has not been researched often. The main goal of my scientific research was to explore genetic diversity of the mtDNA control region in stone martens from central Croatia. I have analyzed mitochondrial DNA control region in 22 stone marten liver/kidney samples. Totally 28 polymorphic sites have been found on 302 base pair sequence, representing eight haplotypes with very high haplotype ($H=0.792 \pm 0.0689$) and nucleotide diversity ($\Pi=0.0343 \pm 0.0182$). Regarding sampling locations in central Croatia, a clear geographical pattern in the distribution of haplotypes was not found. Comparison of eight Croatian mtDNA haplotypes found in this study with three control region sequences deposited in the GenBank (two from Iberian Peninsula and one from undefined European country) revealed no potential matches between haplotypes.

Key words: control region, mitochondrial DNA, haplotype, stone marten, *Martes foina*