

Veterinarski fakultet
Sveučilište u Zagrebu

ŽELJANA VOLOVIĆ i INES VRANEŠEVIĆ

**Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNK
kune bjelice (*Martes foina*) s otoka Hvara**

Zagreb, 2012.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Magde Sindičić, u sklopu znanstvenog projekta Zdravstveni nadzor divljači (053-0532400-2398) voditelja prof. dr. sc. Alena Slavice i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2011./2012.

Popis kratica

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

H – haplotipska raznolikost

IUCN – International Union for Conservation of Nature

MFH – *Martes foina* haplotip

mtDNK – mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina

NCBI – National Center for Biotechnology Information

pb - parova baza

PCR – (Polymerase Chain Reaction), lančana reakcija polimerazom

Π – nukleotidna raznolikost

N – broj analiziranih uzoraka

H – genska raznolikost (haplotipska raznolikost)

π – srednji broj različitih nukleotida između sljedova

Sadržaj

Uvod	1
Hipoteza	2
Materijali i metode	2
Rezultati	4
Rasprava	10
Zaključci	11
Zahvala	12
Literatura	13
Sažetak	15
Summary	16

Uvod

Značajna većina otočkih populacija sisavaca, ptica, gmazova, kukaca i biljaka ima nižu gensku raznolikost nego populacije iste vrste koje nastanjuju kopno (FRANKHAM, 1997.). Genska raznolikost otočkih populacija je rezultat broja životinja koje su osnivači populacije (osnivački učinak), gubitka raznolikosti zbog ograničene veličine populacije, imigracija i mutacija, a ovisi i o veličini otoka, udaljenosti od kopna, te disperziji jedinki (JAENIKE, 1973.).

Istraživanjem raznolikosti mitohondrijske DNK (mtDNK) kune bjelice (*Martes foina*) iz središnje Hrvatske utvrđena je vrlo visoka genska raznolikost, te nije zabilježena geografska pravilnost u rasprostranjenosti osam novo otkrivenih haplotipova (KOS, 2011.; SINDIČIĆ i sur. 2011.). U Hrvatskoj je kuna bjelica autohtona vrsta i naseljava cijeli kontinentalni dio, ali je nalazimo i u priobalju te na otocima (JANICKI i sur. 2007.). Naseljava šume, krška područja i pašnjake te je prisutna u suburbanim i urbanim područjima. Kuna bjelica je prilagođena na suživot s ljudima pa je njena rasprostranjenost u Europi najučestalija na poljoprivrednim, industrijskim i urbanim područjima. U većini zemalja kuna bjelica se legalno lovi te joj je populacija stabilna ili u porastu (PROULX i sur. 2000.).

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 prvenstveno istražuje pomoću neutralnih markera, kao što je kontrolana regija mitohondrijske DNK (VÄLI i sur., 2008.). Mitohondrijska DNK je kružna dvolančana DNK 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. Ne-kodirajući dio se naziva kontrolna regija (BROWN, 1985.) ili hipervarijabilna regija (HVR). Kontrolna regija je mjesto u kojem započinje replikacija i transkripcija mitohondrijskog genoma (CLAYTON, 1991.), te se tu očituje najveća raznolikost nukleotida i dužine sekvence u usporedbi s ostatkom mtDNK (HOELZEL i sur., 1994.). Kontrolna regija se sastoji od oko 1 000 parova baza, te budući ne kodira za sintezu proteina, nije podložna prirodnoj selekciji, što ju čini vrlo dobrim genetskim markerom u rješavanju filogenetskih pitanja (KOCHER i sur., 1989.; AVISE, 1994.). Sama mitohondrijska DNK podložna je brzom evoluciji, tako da je kod sisavaca brzina evolucije mtDNK i do 10 puta brža nego kod jezgrinih gena, a u mtDNK najbrže evoluirala kontrolna regija i to četiri do pet puta brže od ostatka mtDNK (TABERLET, 1996.; PAGE i HOLMES,

1998.). Zbog toga je mtDNK dobar marker za razlučivanje promjena na nižim taksonomskim razinama, dakle između vrsta ili populacija (ZHANG i HEWITT, 1996.). Zbog velike brzine mutacije mtDNK varijabilna je unutar prirodnih populacija, zbog čega je vrlo korisna pri istraživanjima kraćih razdoblja povijesti populacija (GALTIER i sur., 2009.).

Hipoteza

Cilj ovog znanstvenog istraživanja je utvrditi gensku raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNK kune bjelice s otoka Hvara, te ju usporediti s raznolikošću populacije iz središnje Hrvatske. Otok Hvar pripada skupini srednjedalmatinskih otoka, površine je 300 km², uglavnom je prekriven borovom šumom i vinogradima te na otoku ima preko 20 naselja. Mjesto na otoku koje je najbliže kopnu je istočni rt otoka - Sućuraj, udaljen tri nautičke milje (5 km) od Drvenika, te smatramo da kuna bjelica ne može preplivati ovu udaljenost. Istražujemo hipotezu da populacija kune bjelice s otoka Hvara ima nižu raznolikost od kopnene populacije iz središnje Hrvatske.

Materijali i metode

Istraživanje smo provele na 46 uzoraka mišića i kože kune bjelice (*Martes foina*) s otoka Hvara. Uzorci su potjecali od životinja odstrijeljenih tijekom redovite provedbe lovnogospodarske osnove zajedničkog lovišta broj XVII/44 – "Hvar", te su nakon dopreme na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu bili pohranjeni u 96% etanolu na - 20°C. Za izolaciju DNK iz uzoraka mišića koristili smo komercijalni kit ChargeSwitch® gDNA Tissue Kits, Invitrogen. Izolacija DNK rađena je prema protokolu proizvođača.

Kod provođenja lančane reakcije polimerazom (PCR) korištene su početnice LRCB1 (5'-TGGTCTTGTAACCAAAAATGG-3') (STATHAM i sur., 2005.) i DLOOP-MelR (5'-ATGTCCTGTAACCATGACTG-3') (SATO i sur., 2009.). 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 5 μl DNK, 1 μl otopine početnica i 44 μl Platinum® PCR SuperMix, Invitrogen. Reakcija se provodila koristeći uređaj Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Za provođenje PCR reakcije nužno je optimizirati temperaturu pri

kojoj se početnice vežu na lanac DNK, stoga smo napravile niz PCR reakcija na temperaturnom gradijentu od 45° do 50° C kroz 40 ciklusa. 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	48	60 sek
Produženje lanca	72	2 min
Završno produženje	72	10 min

Prisutnost PCR proizvoda provjeravale smo 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) 5 µl. Na parafilmu smo izmiješale 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 smo ih nanijele 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 smo provjerile da li je došlo da umnažanja željenog slijeda, te da li su se pojavili dodatni, nespecifični fragmenti. Elektroforezu smo provodile na sobnoj temperaturi, pri naponu od 90 V u trajanju od 40 minuta. Gelovi su promatrani u transiluminatoru te fotografirani digitalnim fotoaparatom.

PCR proizvode pročistile smo pomoću komercijalnog kita Invitrogen ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit te smo ih poslale na sekvenciranje u servis Macrogen Europe u Amsterdam, Nizozemska, gdje koriste 3730XL Automatic DNA sequencer. Rezultate sekvencioniranja (elektroferogram i nukleotidne slijedove) smo dobile u ab1 i PDF formatu.

Sljedove kontrolne regije smo analizirale u BioEdit programu (HALL, 1999.). U BioEditu je implementiran ClustalW program (THOMPSON i sur., 1994.) kojim smo izvršile višestruko sravnjenje sljedova DNK i identificirale sva polimorfna nukleotidna mjesta.

Programski paket Arlequin, v. 3.1 (EXCOFFIER i sur., 2005.) koristile smo za izračun učestalosti pojedinih haplotipova i osnovnih pokazatelja raznolikosti unutar populacije. Gensku udaljenost između haplotipova prikazale smo kao srednji broj različitih nukleotida između svih parova haplotipova unutar istraživanog uzorka (π). Kao pokazatelje raznolikosti izračunale smo gensku (H) te nukleotidna raznolikost (Π). Gensku raznolikost (H) definiramo kao vjerojatnost da se dva slučajno odabrana haplotipa razlikuju unutar jednog uzorka (NEI, 1987.). Nukleotidna raznolikost (Π) 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 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pretražile smo alatom BLAST-om (Basic Local Alignment Search Tool), u potrazi za pohranjenim sljedovima kontrolne regije kuna bjelica iz ostalih dijelova svijeta.

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

Rezultati

DNK smo izolirale iz ukupno 46 uzoraka tkiva kune bjelice i od toga smo kod 27 uzoraka (58.7%) uspješno dobile PCR produkt. Broj uspješno sekvenciranih uzoraka iznosio je 21 (77,8% početnog broja uzoraka) (Tablica 2).

Analizirale smo sljedove kontrolne regije mtDNK ukupne dužine 591 parova baza (pb). Kada se analizirani slijed poravna sa sekvencom cijele mtDNK kune bjelice koju smo preuzele iz GenBank baze (HM106325), slijed odgovara pozicijama 15 443 – 16 034. Utvrdile smo prisutnost osam polimorfni mjesto, koja čine 1,3% dužine analiziranog slijeda. Jedno polimorfno mjesto proizlazi iz insercije/delecije, dok ostalih sedam polimorfni mjesto proizlazi iz baznih supstitucija (Tablica 3). Utvrđena polimorfna mjesto daju pet jedinstvenih haplotipova, s oznakama: MFH1, MFH2, MFH9, MFH10, MFH11. Haplotipove smo označile u skladu s KOS (2011.) te SINDIČIĆ i sur. (2011.). Pripadnost pojedinih uzoraka određenom

haplotipu prikazana je u Tablici 2. Najučestaliji haplotip je MFH2 prisutan kod 12 uzoraka (57,1%), zatim slijedi haplotip MFH9 koji je prisutan kod šest uzoraka (28,6%), dok su haplotipovi MFH1, MFH10 i MFH11 zastupljeni s po jednim uzorkom (4,76%). S obzirom na broj različitih nukleotida među njima međusobno su najsličniji haplotipovi MFH1 i MFH2 koji se razlikuju u jednom polimorfnom mjestu, dok se haplotip MFH2 i MFH9 međusobno razlikuju na svih osam polimorfnih mjesta.

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

Redni br.	Oznaka uzorka	Haplotip	Učestalost pojedinog haplotipa %
1	194K	MFH1	4,76
2	183K	MFH2	57,1
3	214K	MFH2	
4	220K	MFH2	
5	210K	MFH2	
6	202K	MFH2	
7	212K	MFH2	
8	206K	MFH2	
9	219K	MFH2	
10	211K	MFH2	
11	223K	MFH2	
12	222K	MFH2	
13	197K	MFH2	28,6
14	216K	MFH9	
15	213K	MFH9	
16	200K	MFH9	
17	215K	MFH9	
18	192K	MFH9	
19	203K	MFH9	4,76
20	217K	MFH10	
21	226K	MFH11	4,76

Tablica 3. Polimorfna mjesta pet haplotipova mtDNK kune bjelice s otoka Hvara. Polimorfna mjesta su označena brojevima koji odgovaraju redosljedu na analiziranom slijedu dužine 591 pb. Točke označavaju identitet s haplotipom MFH1, a crtice označavaju deleciju nukleotida.

Haplotip	55	58	82	140	172	173	198	199
MFH1	C	A	T	A	A	C	C	C
MFH2	.	.	.	G
MFH9	-	G	C	.	G	T	T	T
MFH10	-	G	C	G	G	T	T	.
MFH11	.	G	C	.	G	T	T	T

Haplotipska raznolikost (H) kune bjelice s područja otoka Hvara iznosi 0.614 +/- 0.090, dok je nukleotidna raznolikost (Π) 0.007 +/- 0.004 (Tablica 4).

Tablica 4. Indeksi genske raznolikosti kune bjelice s otoka Hvara

N	H	Π	π
21	0.614 +/- 0.090	0.007 +/- 0.004	3.905 +/- 2.040

N – broj analiziranih uzoraka

H – genska raznolikost (haplotipska raznolikost)

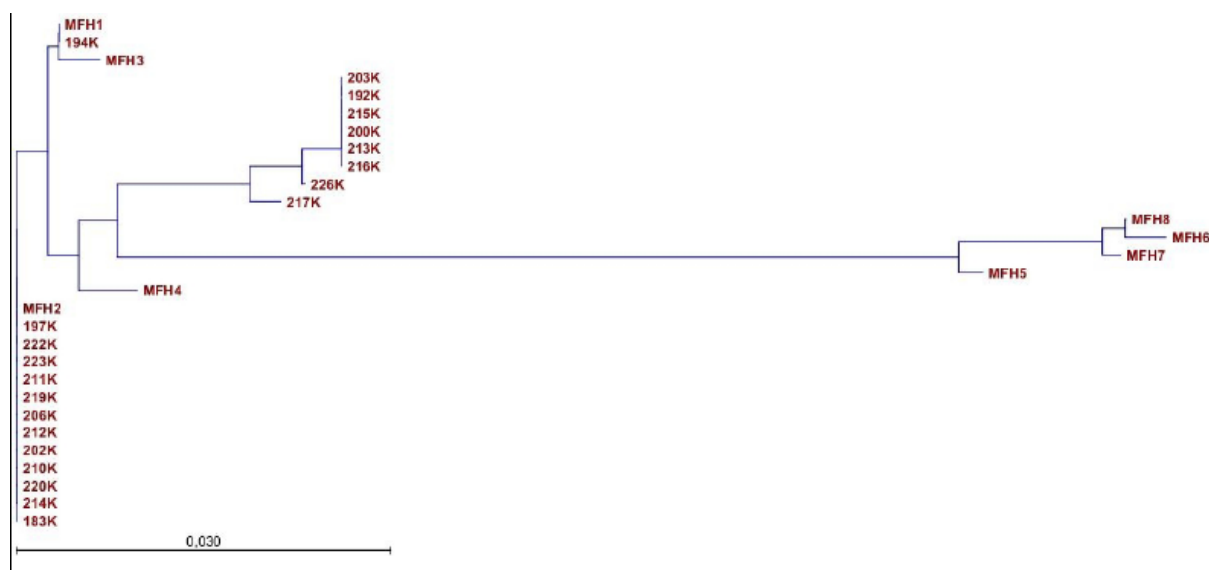
Π - nukleotidna raznolikost

π – srednji broj različitih nukleotida između sljedova

Na temelju 301 parova baza koji se podudaraju usporedile smo sljedove kontrolne regije kuna bjelica iz središnje Hrvatske (KOS, 2011.; SINDIČIĆ i sur., 2011.) i kuna bjelica s otoka Hvara, pri čemu nije izgubljeno niti jedno polimorfno mjesto (od ukupno njih 28). Utvrdile smo da se dva haplotipa s otoka Hvara poklapaju s haplotipovima iz središnje Hrvatske (MFH1 i MFH2), što je vidljivo na filogenetskom stablu (Slika 1). Usporedivši njihovu učestalost, možemo zaključiti da je haplotip MFH1 učestaliji na području središnje Hrvatske (22,7%), dok se na otoku Hvaru znatno češće javlja haplotip MFH2 s učestalošću od 57,1% (Tablica 5).

Tablica 5. Učestalost haplotipova MFH1 i MFH2 na područjima središnje Hrvatske (KOS, 2011.; SINDIČIĆ i sur., 2011.) i otoka Hvara

Haplotip	Učestalost haplotipova središnja Hrvatska (%)	Učestalost haplotipova Hvar (%)
MFH1	22,7	4,76
MFH2	4,5	57,1



Slika 1. Filogenetsko stablo 21 uzorka kuna bjelica iz središnje Hrvatske te osam haplotipova kuna bjelica s otoka Hvara

Usporedbom raznolikosti haplotipova s otoka Hvara te haplotipova s područja središnje Hrvatske (KOS, 2011.; SINDIČIĆ i sur., 2011.) utvrdile smo veći broj polimorfni mjesta kod haplotipova iz središnje Hrvatske, njih 28 (9,3%) (Tablica 6). Sve ostale mjere raznolikosti također imaju veće vrijednosti kod populacije iz središnje Hrvatske. Genska raznolikost (H) populacije s otoka Hvara je 0.614 ± 0.090 , dok je genska raznolikost populacije iz središnje Hrvatske 0.614 ± 0.090 .

Tablica 6. Usporedba raznolikosti haplotipova iz središnje Hrvatske (KOS, 2011.; SINDIČIĆ i sur., 2011.) te haplotipova s otoka Hvara

	N	pb	N pm	N h	H	Π	π
SH	22	302	28 (9,3%)	8	0.792 +/- 0.069	0.034 +/- 0.018	10.364 +/- 4.916
H	21	591	8 (1,3%)	5	0.614 +/- 0.090	0.007 +/- 0.004	3.905 +/- 2.040

SH – središnja Hrvatska

H- Hvar

N – broj analiziranih uzoraka

pb – dužina sekvence u parovima baza

N pm – broj polimorfni mjesta

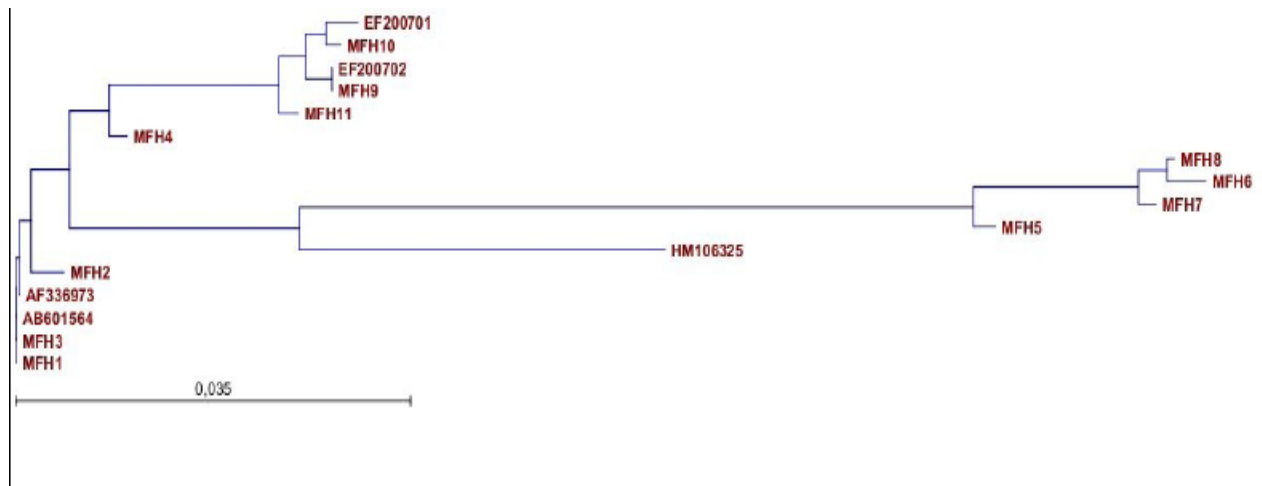
N h – broj haplotipova

H – genska raznolikost (haplotipska raznolikost)

Π - nukleotidna raznolikost

π – srednji broj različitih nukleotida između sljedova

Pretraživanjem računalne baze podataka GenBank pronašle smo pet sljedova kontrolne regije mitohondrijske DNK 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. Uzorak pod oznakom AB601564 potječe iz Njemačke, a uzorku oznake HM106325 nije navedena zemlja podrijetla. Usporedile smo sljedove 11 haplotipova kune bjelice iz Hrvatske (KOS, 2011.; SINDIČIĆ i sur., 2011. i ovo istraživanje) s pet haplotipa pohranjenih u GenBanku. Sljedove smo usporedili u dužini od 245 pb koji se podudaraju, pri čemu smo zbog rezanja sljeda kod naših uzoraka izgubile dva polimorfna mjesta pa nam je haplotip MFH1 postao jednak haplotipu MFH3. Na Slici 2. prikazano je filogenetsko stablo 11 haplotipova iz Hrvatske i pet haplotipova iz GenBank baze. Vidljivo je da haplotipovi MFH1 i MFH3 odgovaraju haplotipu AB601564, te da je haplotip MFH9 jednak haplotipu EF200702.



Slika 2. Filogenetsko stablo 11 haplotipova kune bjelice s otoka Hvara i središnje Hrvatske (MFH1-11) i pet haplotipova iz GenBank baze podataka (AB601564, HM106325, AF336973, EF200701, EF200702)

Rasprava

Ovim istraživanjem dobiveni su podaci o raznolikosti kontrolne regije mitohondrijske DNK kune bjelice (*Martes foina*) otoka Hvara. Usporedile smo ih s podacima o raznolikosti kontrolne regije mitohondrijske DNK kune bjelice iz središnje Hrvatske (KOS, 2011.; SINDIČIĆ i sur., 2011.) kako bismo istražile hipotezu da otočka populacija ima nižu raznolikost od kopnene populacije.

Od ukupno 46 uzoraka kune bjelice s otoka Hvara PCR produkt dobile smo kod 27 uzoraka (58.7%), a niska uspješnost rezultat je razgradnje DNK zbog neprikladne konzervacije uzoraka prije dostavljanja uzoraka na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Na 21 uspješno sekvencioniranom uzorku kune bjelice s otoka Hvara analizirale smo slijed kontrolne regije mitohondrijske DNK dužine 591 parova baza. Pronašle smo osam polimorfni mjesta, koji čine 1.3% analiziranog slijeda, dok je kod haplotipova iz središnje Hrvatske čak 9.3% slijeda polimorfno. Srednji broj različitih nukleotida između slijedova (π) kod uzoraka iz središnje Hrvatske je iznosio 10.364 +/- 4.916, značajno više nego na Hvaru (3.905 +/- 2.040) čime je potvrđena naša pretpostavka o nižoj raznolikosti populacije kune bjelice otoka Hvara u usporedbi s onom iz središnje Hrvatske. Niža raznolikost rezultat je ograničene veličine te izoliranosti otočne populacije, jer smatramo da zbog udaljenosti od

kopna prirodna migracija kuna bjelica s kopna na otok nije moguća. Ne možemo isključiti unošenje novih životinja s kopna na otok od strane čovjeka, no o tome nema zapisa u literaturi. Dva se haplotipa iz središnje Hrvatske poklapaju s haplotipovima kuna bjelica s otoka Hvara (MHF1 i MHF2), što potvrđuje nalaz KOS (2011.) i SINDIČIĆ i sur. (2011.) da pojedini haplotipovi nisu ograničeni na određenu lokaciju.

Usporedivši jedanaest haplotipova kune bjelice iz Hrvatske s pet haplotipova kuna bjelica iz cijelog svijeta pohranjenih u računalnoj bazi podataka GenBank u dužini od 245 pb kod naših smo uzoraka izgubile dva polimorfna mjesta te nam je haplotip MFH1 postao jednak MFH3. Rezultati te usporedbe su nam pokazali da su haplotipovi MFH1 i MFH3 jednaki haplotipu AB601564 koji potječe iz Njemačke, dok je haplotip MFH9 pronađen na otoku Hvaru jednak haplotipu EF200702 koji potječe s Iberijskog poluotoka. Ti rezultati ukazuju na očuvanu raznolikost europske populacije kuna bjelica te da pojedini haplotipovi nisu ograničeni na određena geografska područja. Važno je napomenuti da su ovo preliminarni rezultati zbog malog broja istraženih uzoraka iz ostalih dijelova Europe.

Zaključci

1. Utvrdile smo prisutnost pet haplotipova mitohondrijske DNK kod kune bjelice (*Martes foina*) s otoka Hvara.
2. Haplotipska raznolikost (H) kune bjelice s područja otoka Hvara iznosi 0.614 ± 0.090 , srednji broj različitih nukleotida između sljedova (π) iznosi 3.905 ± 2.040 , dok je nukleotidna raznolikost (II) 0.007 ± 0.004 .
3. Dva haplotipa utvrđena na otoku Hvaru identični su s haplotipovima iz središnje Hrvatske (MFH1 i MFH2). Haplotip MFH1 učestaliji je na području središnje Hrvatske (22,7%), dok je haplotip MFH2 učestaliji na otoku Hvaru (57,1%).
4. Genska raznolikost kune bjelice s otoka Hvara, značajno je niža od raznolikosti kopnene populacije iz središnje Hrvatske.
5. Jedan haplotip pronađen na Hvaru i u središnjoj Hrvatskoj (MFH1, MFH3) identičan je haplotipu uzorka kune bjelice iz Njemačke (GenBank broj AB601564), dok je haplotip pronađen na otoku Hvaru (MFH9) identičan haplotipu uzorka s Iberijskog poluotoka (GenBank broj EF200702).

Zahvala

Ovo istraživanje ne bi bilo moguće provesti bez pomoći LD Hvar i dr. med. vet. Prospera Vlahovića koji su prikupili uzorke kuna bjelica s otoka Hvara i na tome im srdačno zahvaljujemo. Posebna zahvala dr. sc. Magdi Sindičić na strpljenju, stručnom i tehničkom vodstvu pri izradi ovog rada.

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. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 7, 453–478.
- CONNER, J. D., D. L. HARTL (2004): A primer of ecological genetics, Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- 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.
- FRANKHAM, A. (1997): Do island populations have less genetic variation than mainland populations? Heredity 78, 311-327.
- GALTIER, N., B. NABHOLZ, S. GLEMIN, G. D. D. HURST (2009): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. Mol. Ecol. 18, 4541-4550.
- 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.
- 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. J Mol. Evol. 39, 191–199.
- JAENIKE, J. R. (1973): A steady state model of genetic polymorphism on islands. Am. Nat. 107, 793–795.
- JANICKI, Z., A. SLAVICA, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2007): Zoologija divljači. Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači, Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu.
- 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.
- KOS, D. (2011): Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA kune bjelice (*Martes foina*) iz središnje Hrvatske. Studentski znanstveni rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- NEI, M. (1987): Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York, NY, USA.

- PAGE, R. D. M., E. C. HOLMES (1998): Molecular Evolution – A Phylogenetic Approach, Blackwell Science. Oxford.
- 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. U: Martens and fisher (*Martes*) in human-altered landscapes: an international perspective Harrison, D. J., A. K. Fuller, G. Proulx, urednici). Springer, New York, New York, USA. str. 21-76.
- SATO, J. J., S. P. YASUDA, T. HOSODA (2009): Genetic diversity of the Japanese marten (*Martes melampus*) and its implications for the conservation unit. Zool. Sci. 26, 457–466.
- SINDIČIĆ, M., T. GOMERČIĆ, D. KOS, D. DEŽDEK, D. KONJEVIĆ, T. KEROS, A. SLAVICA (2011): Variability of mitochondrial DNA in beech marten (*Martes foina*) from central Croatia. Abstract volume VIth European Congress of Mammalogy, Pariz, Francuska. str. 71.
- STATHAM, M., P. D. TURNER, C. O' REALLY (2005): Use of PCR amplification and restriction enzyme digestion of mitochondrial D-loop for identification of mustelids in Ireland. Ir. Nat. J. 28, 1–6.
- 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. Mol. Biol. Evol. 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 Res. 22, 4673-4680.
- VÄLI, Ü., A. EINARSSON, L. WAITS, H. ELLEGREN (2008): To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? Mol. Ecol. 17, 3808–3817.
- ZHANG, D. X., G. M. HEWITT (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. Trends Ecol. Evol. 11, 247-251.

Sažetak

ŽELJANA VOLOVIĆ I INES VRANEŠEVIĆ

Studentice 5. godine Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNK kune bjelice (*Martes foina*) s otoka Hvara

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati gensku raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNK kune bjelice (*Martes foina*) s otoka Hvara te istražiti hipotezu da populacija kune bjelice s otoka Hvara ima nižu raznolikost od kopnene populacije iz središnje Hrvatske. Analizirale smo kontrolnu regiju mitohondrijske DNK 21 uzorka, ukupne dužine 591 parova baza. Utvrdile smo prisutnost pet haplotipova, čija haplotipska raznolikost (H) iznosi 0.614 ± 0.090 , srednji broj različitih nukleotida između sljedova (π) iznosi 3.905 ± 2.040 , dok je nukleotidna raznolikost (II) 0.007 ± 0.004 . Dva haplotipa utvrđena na otoku Hvaru identični su s haplotipovima iz središnje Hrvatske (MFH1 i MFH2). Haplotip MFH1 učestaliji je na području središnje Hrvatske (22,7%), dok je haplotip MFH2 učestaliji na otoku Hvaru (57,1%). Genska raznolikost kune bjelice s otoka Hvara, značajno je niža od raznolikosti kopnene populacije iz središnje Hrvatske. Jedan haplotip pronađen na Hvaru i u središnjoj Hrvatskoj (MFH1, MFH3) identičan je haplotipu kune bjelice iz Njemačke (GenBank broj AB601564), dok je haplotip pronađen na otoku Hvaru (MFH9) identičan haplotipu s Iberijskog poluotoka (GenBank broj EF200702).

Ključne riječi: kontrolna regija, mitohondrijska DNK, raznolikost, kuna bjelica, *Martes foina*

Summary

ŽELJANA VOLOVIĆ and INES VRANEŠEVIĆ

Students of 5th year at Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

Diversity of mitochondrial DNA control region in stone marten (*Martes foina*) from island Hvar

The goal of our research was to analyze the genetic diversity of mitochondrial DNA control region of stone marten (*Martes foina*) from the island Hvar and to investigate the hypothesis that stone marten population from island Hvar has a lower diversity than mainland population from central Croatia. We analyzed the mitochondrial DNA control region of 21 samples in total length of 591 base pairs. We found five haplotypes, with the haplotype diversity (H) 0.614 +/- 0.090, the mean number of different nucleotides between sequences (π) 3.905 +/- 2.040, and nucleotide diversity (Π) 0.007 +/- 0.004. Two haplotypes found on the island were identical to haplotypes from central Croatia (MFH1 and MFH2). Haplotype MFH1 was more frequent in central Croatia (22.7%), whereas haplotype MFH2 had higher frequency on island Hvar (57.1%). We confirm that genetic diversity of stone marten from the island Hvar is significantly lower than the diversity of terrestrial populations from Central Croatia. Sequence of haplotypes found on the island Hvar and in central Croatia (MFH1, MFH3) is identical to the haplotype found in Germany (GenBank AB601564), while haplotype MFH9 found on the island Hvar is identical to sequence from the Iberian Peninsula (GenBank EF200702).

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