Genetička varijabilnost divljeg kunića (O.cuniculus) u Republici Hrvatskoj

Kaštelanac, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:596504

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Ivan Kaštelanac

GENETIČKA VARIJABILNOST DIVLJEG KUNIĆA (*O. cuniculus*) U REPUBLICI HRVATSKOJ

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Ribarstvo i lovstvo

IVAN KAŠTELANAC

GENETIČKA VARIJABILNOST DIVLJEG KUNIĆA (*O. cuniculus*) U REPUBLICI HRVATSKOJ

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik

Neposredni voditelj: dr. sc. Maja Ferenčaković

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____

s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Vlatka Čubrić Čurik _____

2. prof. dr. sc. Roman Safner _____

3. doc. dr. sc. Antun Kostelić _____

Ovom prilikom želio bih se zahvalit na angažmanu inspirativnih ljudi koji su s entuzijazmom prenosili znanje. Želim se zahvaliti doc. dr. sc., Vlatki Čubrić Čurik bez koje ne bih bio u mogućnosti napisat ovaj iznimno zahtjevan rad, koja je bila uvijek dostupna i spremna prenijeti znanje. Zahvaljujem se svojim profesorima na diplomskom studiju „Ribarstvo i Lovstvo“ koji su mi prenijeli dovoljno znanja te omogućili da pristupim ovom radu, posebno prof. dr. sc. Romanu Safneru koji me je oduševio originalnim pristupom i svim detaljima tijekom ovog školovanja. Isto tako zahvalio bih se doc. dr. sc. Antun Kosteliću koji je znao nagraditi moj rad na preddiplomskom studiju „Animalne znanosti“. Zahvalio bih se i svojoj neposrednoj voditeljici dr. sc. Maji Ferenčaković na trudu i Vladimiru Brajkoviću koji mi je pomagao u labaratoriju.

Najviše od svega, zahvalan sam na najboljim roditeljima i svojoj obitelji na njihovim odricanjima koji su me bezuvjetno podupirali do samog kraja obrazovanja.

Sažetak

Oryctolagus cuniculus (Linnaeus, 1758) pripada redu dvojezubaca (Lagomorpha), porodici zečeva (Leporidae) i rodu kunića (Oryctolagus). Među postojećim rodovima porodice zečeva, najstariji je fosil roda *Oryctolagus*, u Europi se prvi put pojavljuje prije oko 3.5 milijuna godina. Danas je raspodjela vrste u Europi neujednačena. Dok u sjevernoj Europi imaju tendenciju širenja i u nekim mjestima se smatra štetočinom, u južnoj Europi tijekom posljednjih desetljeća pretrpio je oštar pad uslijed intenzivne poljoprivrede te novog vala epidemije miksomatoze i hemoragijske bolesti. U Hrvatsku su divlji kunići introducirani na jadranskim otocima, Brijunima, na otoku Cresu, Ižu, Kornatima, Dugom otoku, Pagu i Rabu, danas je njihov broj u opadanju. Do danas nisu rađene analize genetičke varijabilnosti divljih kunića u Republici Hrvatskoj tako da o njegovom podrijetlu nemamo relevantnih podataka. Da bi dobili što bolji uvid, u ovom radu je analizirana kontrolna regija mitohondrijske DNA koja je optimalni biljeg za analize genetičke varijabilnosti, budući da je po arheološkim podatcima divlji kunić prisutan na našim prostorima bio još od razdoblja gornjeg paleolitika ili i ranije. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi varijabilnost europskog divljeg kunića u Hrvatskoj na temelju prikupljenih uzoraka sa uzorcima iz svijeta preko dostupnih nukleotidnih sljedova kontrolne regije mitohondrijske DNA pohranjenih u banci gena. Prema provedenom istraživanju nije utvrđena visoka frekvencija varijabilnosti s obzirom na broj uzoraka i haplotipova te ukazuje na introduciranost divljeg kunića u RH.

Ključne riječi: dvojezubci, *Oryctolagus cuniculus*, mtDNA, kontrolna regija, genetska raznolikost

Summary

Oryctolagus cuniculus (Linnaeus, 1758) pertain to the order Lagomorpha, family Leporidae and genus Oryctolagus. The fossil of genus Oryctolagus is the longest existing among the present genera *Leporidae*. It first appeared in Europe 3,5 millions of years ago. The species has been unevenly distributed across Europe. In Nothern Europe it has shown the tendency of dissemination, considered in places a pest, whereas Southern Europe has sustained a severe decline in recent decades due to intensive farming and the new wave of *myxomatosis epidemics* and hemorrhagic disease. In Croatia, *O. cuniculus* has been introduced to the Adriatic islands: Brijuni, the island of Cres, Iž, Kornati, Dugi otok, Pag and Rab and today they are in decline. Genetic variability analyses of *O. cuniculus* in the Republic of Croatia have not yet been carried out, hence, there is a lack of relevant information about the origin of wild rabbits. In order to gain a deeper insight, this paper has analysed mtDNA control region which is an optimal molecular marker for genetic variability analyses, as according to the archeological data, wild rabbit has been present in our region since the Upper Paleolithic or even before. The main aim of the research is to determine variability of European wild rabbit in Croatia based on the collected samples and samples from the world, through the available nucleotide sequence of mt DNA control region stored in gene bank. According to the conducted research high-frequency variability has not been affirmed with regard to the number of samples and haplotypes also it can indicate the introduction of wild rabbits in Croatia.

Key words: *Lagomorpha, Oryctolagus cuniculus*, mtDNA, control region, genetic variability

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. PREGLED LITERATURE 4

2.1. SISTEMATIKA I EVOLUCIJA DVOJEZUBACA 4

2.1.1. Paleobiogeografski sažetak postojećih rodova Lagomorpha 6

2.2. RASPROSTRANJENOST *O. CUNINCULUS*-A U EUROPI 8

2.3. BIOLOGIJA DIVLJEG KUNIĆA 10

2.3.1. Vanjski izgled i opis 10

2.3.2. Reprodukcija 11

2.3.3. Stanište i ekologija 12

2.3.4 Ugroženost 14

2.4. MITOHONDRIJSKA DNA 15

2.4.1. Kontrolna regija 16

3. HIPOTEZ I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 17

4. MATERIJALI I METODE 18

4.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA 18

4.2. IZDVAJANJE DNA 19

4.2.1. Priprema tkiva pomoću Bio Basic tissue genomic DNA Kit protokola 19

4.2.2. Priprema kolona pomoću Bio Basic tissue genomic DNA Kit protokola 19

4.2.3. Određivanje koncentracije DNA pomoću nano spektrofotometra 19

4.2.4. Vizualizacija elektoforezom na agaroznom gelu 20

4.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR) 21

4.3.1. Kontrola početnica 22

4.3.2. Uvjeti PCR-a 22

4.4. PROČIŠĆIVANJE PCR PRODUKTA I NJEGOVA PRIPREMA ZA ODREĐIVANJE SLIJEDA NUKLEOTIDA POMOĆU „PROMEGA“ WIZARD SV GEL I PCR CLEAN-UP SYSTEM PROTOCOL 23

4.5. ODREĐIVANJE SLIJEDA NUKLEOTIDA PCR PRODUKATA 23

4.6. ANALIZA NUKLEOTIDNIH SLJEDOVA 24

5. REZULTATI I RASPRAVA 25

5.1. IZDVAJANJE DNA IZ UZORAKA TKIVA KUNIĆA 25

5.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM 27

5.3. PROČIŠĆIVANJE PCR PRODUKTA 28

5.4. ANALIZA NUKLEOTIDNIH SLJEDOVA 28

5.5. VARIJABILNOST NUKLEOTIDNIH SLJEDOVA 31

5.5.1. Analiza haplotipova Hrvatskih populacija 31

5.5.2. Analiza haplotipova Hrvatske populacije u usporedbi sa europskom i svjetskom populacijom 34

6. ZAKLJUČCI 36

7. LITERATURA 37

8. PRILOZI 42

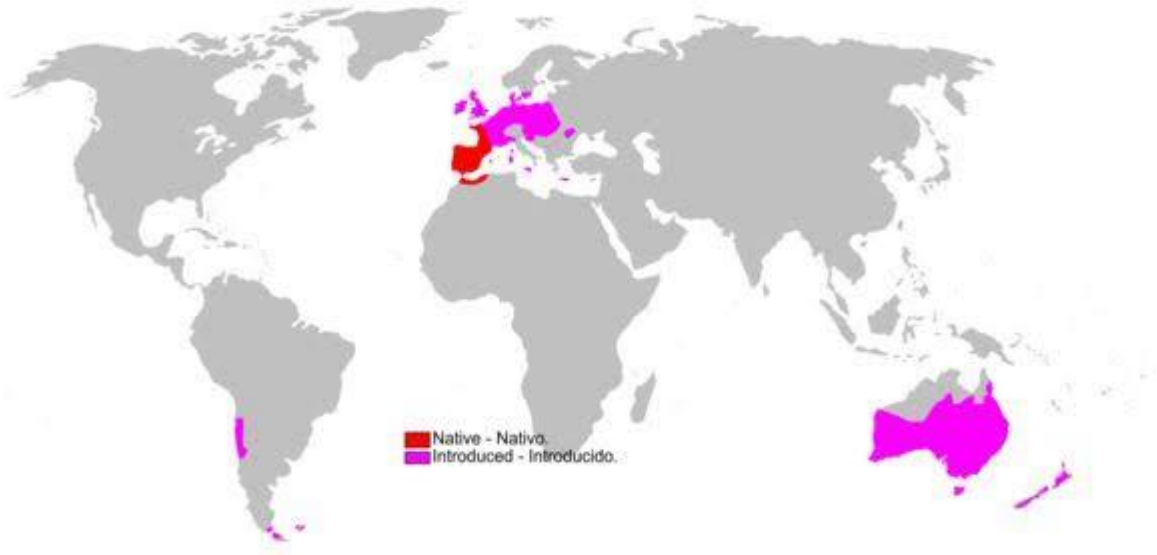
ŽIVOTOPIS 46

1. UVOD

Kunić divlji *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) pripada rodu kunići (Oryctolagus), porodici zečevi (Leporide) i redu dvojezubci (Lagomorpha). U Europi se na Pirinejskom poluotoku pojavljuju u dvije podvrste. *Oryctolagus cuniculus algirus* zauzima jugozapadni dio poluotoka (Portugal i južna Španjolska), a također se pojavljuje na Mediteranu, u Sjevernoj Americi i na otocima Atlantskog oceana. *O. c. cuniculus* za kojega se smatra da je potomak prvotnog domaćeg kunića koji je pušten u divljinu (Gibb, 1990) podvrsta je koja se pojavljuje širom Europe i svijeta (Angulo, 2004). Danas su poznata područja na kojima se ove dvije podvrste preklapaju (Biju-Duval i sur., 1991). Počeci domestikacije kunića evidentirani su u Kini za vrijeme dinastije Ha (206 - 200 g.p.n.e.). Na Pirinejski poluotok (Španjolska, Portugal), u zapadnu Francusku i u sjevernu Afriku kunići su se raširili nakon posljednjeg ledenog doba. Smatra se da je introdukcija kroz cijelu zapadnu Europu započela još u rimsko doba (Gibb, 1990, Mitchell-Jones i sur., 1999). Trenutno naseljavaju sve zemlje zapadne Europe, Irsku i Veliku Britaniju (uključujući otoke), Austriju, dijelove Švedske, Poljske, Češke, Mađarske, Rumunjske, Ukrajine, mediteranskih otoka Sicilije, na Sardiniji, Korzici, Kreti, Balearima (Thompson i King, 1994). Nastanjuju i Hrvatsku i Slovačku (Mitchell-Jones i sur., 1999). U Australiju je prvi put uvezen 1788. god., te ponovo 1859. god., gdje je danas raširen (Thompson i King, 1994). Nakon višekratnih neuspjeha 1936. godine je konačno uspjela introdukcija i u Južnu Ameriku gdje im se populacija održava u ograničenom raspona u Argentini i Čileu (Thompson i King, 1994). Evidentiran je na mnogim otocima u Tihom oceanu, s afričke obale Novog Zeland i na Karibima (slika 1). Budući se *O. cuniculus* obično nalazi na nadmorskim visinama ispod 1500 m (Fa i sur., 1999) u Hrvatskoj su prisutni primarno na jadranskim otocima Brijunima, Cresu, Ižu, Kornatima, Dugom otoku, Pagu i Rabu (Long, 2003).

Porodica zečevi (Leporidae) koja taksonomski pripada redu dvojezubaca (Lagomorpha) broji preko 50 vrsta zečeva i kunića. Osim porodice zečeva (Leporidae) u koju se ubrajaju rod kunići (Oryctolagus) i rod zečevi (Lepus), u dvojezubce spada i porodica zviždara (Ochotonidae) s kojima čine red Lagomorpha. Zečevi se razlikuju od zviždara (pika) jer imaju kratke krznene repiće, izdužene uši i duge stražnje noge. U ranijim sistematskim podjelama se zbog morfoloških sličnosti (odsutnost očnjaka i prisutnost sjekutića koji kontinuirano rastu) dvojezubci nisu izdvajali već su svrstavani u red glodavaca (Rodents). Redovi su razdvojeni

kada su dokazane udaljene genetske povijesti između njih, a osnovna morfološka razlika je prisutnost dva reda sjekutića (četiri sjekutića u gornjoj čeljusti) kod dvojezubaca. Europu nastanjuju samo predstavnici porodice zečeva (Leporidae). Iz roda zečevi (Lepus) to su *L. europaeus, L. corsicanus, L. timidus, L. granatensis, L. castroviejoi*, a iz roda kunići (Oryctolagus) divlji kunić (*Oryctolagus cuniculus*). U Hrvatskoj, u kojoj su tijekom povijesti prebivale mnoge vrste reda dvojezubaca, danas su prisutne samo dvije vrste i to obje iz porodice zečevi. Iz roda zečevi to je *L. europaeus* , a iz roda kunići *O.cuniculus.*



Slika 1. Rasprostranjenost *Oryctolagus cuniculus* (crvena boja – nativni, domaći, ljubičasta - introducirani, http://maps.iucnredlist.org/map.)

Gotovo četvrtini od 87 vrsta dvojezubaca evidentiranih u svijetu prijeti izumiranje (Chapman i Flux, 2008). Ovaj omjer sličan je omjeru ostalih redova sisavaca (Hoffman i sur., 2011). Dvojezubci pokazuju biološku prilagođenost širokom spektru okoliša, od pustinja do arktičkih regija (Chapman i Flux, 2008). Značajno je da im koprofagija povećava učinkovitost probave te nudi moguće objašnjenje zašto uspijevaju u nepogodnom okolišu gdje je pojava ostalih sisavaca biljojeda vrlo rijetka (Hirakawa, 2001). Trenutni raspon vrsta dvojezubaca rezultat je višestrukih procesa kao što su promjene okoliša (sastava vegetacije) koje igraju važnu ulogu u oblikovanju raznolikosti ovog reda sisavaca još od ranog miocena prije 23-16 milijuna godina (Ge i sur., 2012).

Filogenetske analize mogu definirati kakav utjecaj na biodiverzitet imaju stvaranja novih te izumiranje vrsta (Robosky, 2009) te ekološke mehanizme koji utječu na diversifikaciju. Veličina i brojne korelacije tijela (npr. životno-povijesne osobine) filogenetski su očuvane, ali manjeg su utjecaja na rizik izumiranja malih vrsta (Cardillo i sur., 2004). Globalne promjene (npr. klimatska promjena i sukcesije staništa) uzrokuju smanjenje vrsta s ograničenim klimatskim nišama, staništima i prehranom (Clavel i sur., 2010). Ovakva pojava prijeti rodovima siromašnim vrstama, zato što se oni nerijetko pojavljuju na marginama geografskih i ekoloških područja. Još jedno objašnjenje je da u malim grupama kao što su dvojezubci, ima manje varijacija u bilo kojem poznatom svojstvu pomoću čega se mogu objasnit oscilacije rizika izumiranja. Vrste *caprolagus, oryctolagus, sylvilagus* i *lepus* preživjeli su članovi novijih i raznolikih radijacija, iako su izgubili neke vrste (ili većinu, u slučaju Oryctolagus) promjenama staništa te antropogenim utjecajem (Murray i sur., 2005).

Gensku varijabilnost utvrđuju genetski biljezi, varijacije alela (DNA nukleotidnih sljedova) s lokusom. Od morfoloških biljega značajniji su molekularni, kakav je i DNA biljeg. Prednost je mitohondrijske DNA (mtDNA) u majčinskoj lozi, haploidnosti i visokoj mutacijskoj stopi. Na mitohondrijskoj DNA najinformativnija je *D-loop* kontrolna regija (hipervarijabilna regija), jer najbrže evoluira i ne podliježe prirodnoj selekciji (ne kodira sintezu bjelančevina).

Analiza mitohondrijske DNA ključna je u praćenju stupnja genske varijabilnosti i u filogenetskoj usporedbi haplogrupa unutar populacija, čime je omogućena interpretacija podrijetla i evolucije vrste.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Sistematika i evolucija dvojezubaca

Divlji kunići, zečevi te njima srodne pike spadaju u porodicu dvojezubaca. Prije se je red dvojezubaca svrstavao u red glodavaca (Rodents) zbog morfoloških sličnosti, npr. odsutnosti očnjaka i prisutnosti sjekutića koji kontinuirano rastu. Dokazane su udaljene genetske povijesti između njih, a osnovna morfološka razlika je prisutnost dva reda sjekutića (četiri sjekutića u gornjoj čeljusti) kod dvojezubaca. Pike (Ochotonidae) imaju 26 zubi (zubna formula. 2/1, c. 0/0, p. 3/2, m. 2/3), a kunići i zečevi imaju 28 zuba (tj. 2/1, c. 0/0, p. 3/2, m. 3/3.). Svi dvojezubci imaju izduženu lubanju i kljun, a značajka porodice je da imaju fenestrirane (elastične) kosti za reduciranje težine. Podnožje stopala je dlakavo te pruža izolaciju od hladnoće i ekstremne vrućine, i dobro prianjanje na različitim podlogama.

Red dvojezubci (*Lagomorpha* Brandt, 1885) obuhvaća porodice prolagidi (*Prolagidae* Gureev, 1964), zviždari (*Ochotonidae* Thomas, 1897) i zečevi (*Leporidae* Fischer de Waldheim, 1817). *Prolagidae* sadrže jedan rod, *Prolagus* (Pomel, 1853). U zviždare se ubraja jedan rod, zviždari (*Ochotona* Link, 1795). Nomenklatura dijeli porodicu zečeva na dva roda, zečevi (*Lepus*, Linnaeus, 1758*)* i kunići (*Oryctolagus* Lilljeborg, 1873), *Pentalagus* Lyon, 1904, *Pronolagus* Lyon, 1904, *Romerolagus* Merriam, 1896, *Caprolagus* Blyth, 1845, *Sylvilagus* Gray, 1867, *Brachylagus* Miller, 1900, *Bunolagus* Thomas, 1929, *Poelagus* St. Leger, 1932, *Nesolagus* Forsyth-Major, 1899. Red dvojezubci po zoološkoj sistematici spada u razred sisavaca (*Mammalia*) i najbliži je rodovima glodavaca (*Rodentia*) i primata (*Primates*).

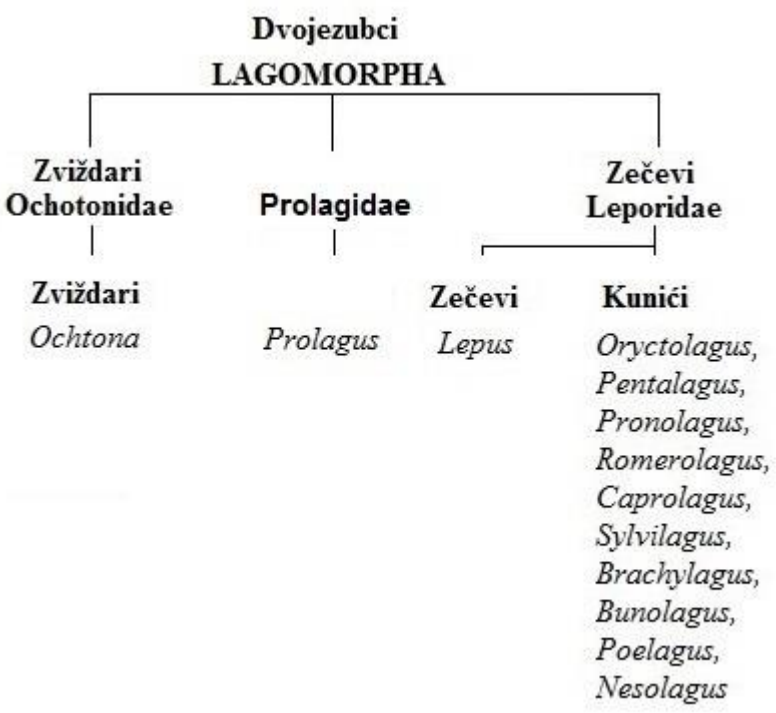
Divlji kunić (*Oryctolagus cuniculus*, Linnaeus, 1758) jedina je vrsta unutar roda kunića (*Oryctolagus*, Lilljeborg, 1873) i smatra se pretkom ostalih rodova kunića.

Sardinijski zviždar (*Prolagus sardus* Wagner, 1832) prema Wilson i Reeder (2005.) jedina je poznata vrsta roda *Prolagus*, koja je do 1774. g. prebivala na mediteranskim otocima (Sardinija, Korzika i susjedni otoci).

Rod zviždara (*Ochotona*) obuhvaća 30 vrsta: cansus, curzoniae, dauurica, huangensis, nubrica, pusilla, rufescens, thibetana, thomasi, alpina, argentata, collaris, hoffmanni, hyperborea, pallasi, princeps, turuchanensis, erythrotis, forresti, gaoligongensis,

gloveri, himalayana, iliensis, koslowi, ladacensis, macrotis, muliensis, nigritia, roylei, rutila. Od ostalih vrsta dvojezubaca odvojili su se najranije u eocenu, prije 50 milijuna g. (Chapman i Flux, 1990.; Slika 2).

Od dvojezubaca danas je najbrojniji rod zečeva (*Lepus*), u koji se ubrajaju 32 vrste: *brachyurus, californicus, callotis, capensis, corsicanus, flavigularis, granatensis, habessinicus, oiostolus, saxatilis, townsendii, yarkandensis, arcticus, othus, timidus, alleni, americanus, insularis, tibetanus, tolai, castroviejoi, comus, coreanus, europaeus, mandshuricus, starcki, fagani, microtis, hainanus, nigricollis, peguensis, sinensis* (Wilson i Reeder, 2005.). Taksonomsko rangiranje dvojezubaca prolazilo je radikalne promjene, od ubrajanja pod glodavce u taksonu *Glires* do udaljavanja od glodavaca i približavanja primatima (Graur i sur., 1996.).



Slika 2. Porodice i rodovi (Lagomrpha) u svijetu (Chapman and Flux, 1990).

2.1.1. Paleobiogeografski sažetak postojećih rodova *Lagomorpha*

Ochotonidae - najveća raznolikost te geografski raspon pika dogodio se tijekom globalnog klimatskog optimum iz kasnog - oligocena do sredine – miocena. (Ge i sur., 2012). Današnje (Ochotonidae) možda jesu ograničene (ekološki i geografski), ali su raznolike zbog njihova pojavljivanja u topografski složenim područijma gdje je veća raznolikost staništa, a jedinice predjela su manje (Shvarts i sur., 1995).

Leporidae - *Pronolagus, Bunolagus, Romerolagus, Pentalagus* i *Nesolagus* mogu pripadati linijama kojih je bilo u izobilju te su bili široko rasprostranjeni u oligocenu i zatim izgubile većinu (iako ne sve) vrste. *Lepus, Sylvilagus, Caprolagus i Oryctolagus* predstavljaju današnje radijacije koje su neujednačeno izgubile vrste tijekom kasnog pleistocena. Današnje vrste u ova četiri roda više su izložene generalnom staništu i ishrani, te su bolje zastupljeni u fosilnim zapisima (Lopez-Martinez, 2008).

Endemi otoka - *Nesolagus netscheri* i *Pentalagus furnessi* ograničeni su otocima te ugroženi. *Nesolagus* pokazuje niz primitivnih morfoloških značajki, bez jasnih znakova da je očito srodan bilo kojem od ostalih (*Leporida)* (Matthee i sur., 2004). Obje vrste *Nesolagusa* pripadaju među manje poznate i rijetke sisavce na svijetu (McCarthy i sur., 2012). Od ostalih vrsta ograničenih otocima, tri su vrste roda (*Lepus*) te dvije vrste (*Sylvilagus*). Od posljednje glacijacije javljaju se ili na otocima odvojenim od kopnenih masa ili na oceanskim otocima (tablica 1). Paleogeografske analize kralježnjaka jugoistočne Azije kao i izumrli oblik *Nesolagus sinensis*, sugeriraju da Sumatranski prugasti kunić (*N. netscheri*) vrlo vjerojatno potječe od nekada široko rasprostranjenih predaka sa Sunda Shelf-a (jugoistočno proširenje epikontinentalnog pojasa jugoistočne Azije). Podizanjem razine mora te povlačenjem šuma tokom pliocena, najvjerojatniji su razlozi njegove geografske izoliranosti (Sterling i Hurley, 2005). Izumrli oblik *Pliopentalagus* iz doba pliocena u Europi i Aziji podupire „izbjeglički“ status preživjelog amami kunića (Lopez-Martinez 2008). Na ovim otocima molekularni podatci pokazuju očuvanost reliktnih populacija *Pentalagus furnessi* (i antiknog glodavca *Tokudaia osimensis*) i nakon izolacije, dok su istovremeno njihovi kontinentalni srodnici izumrli (Yamada i sur., 2002).

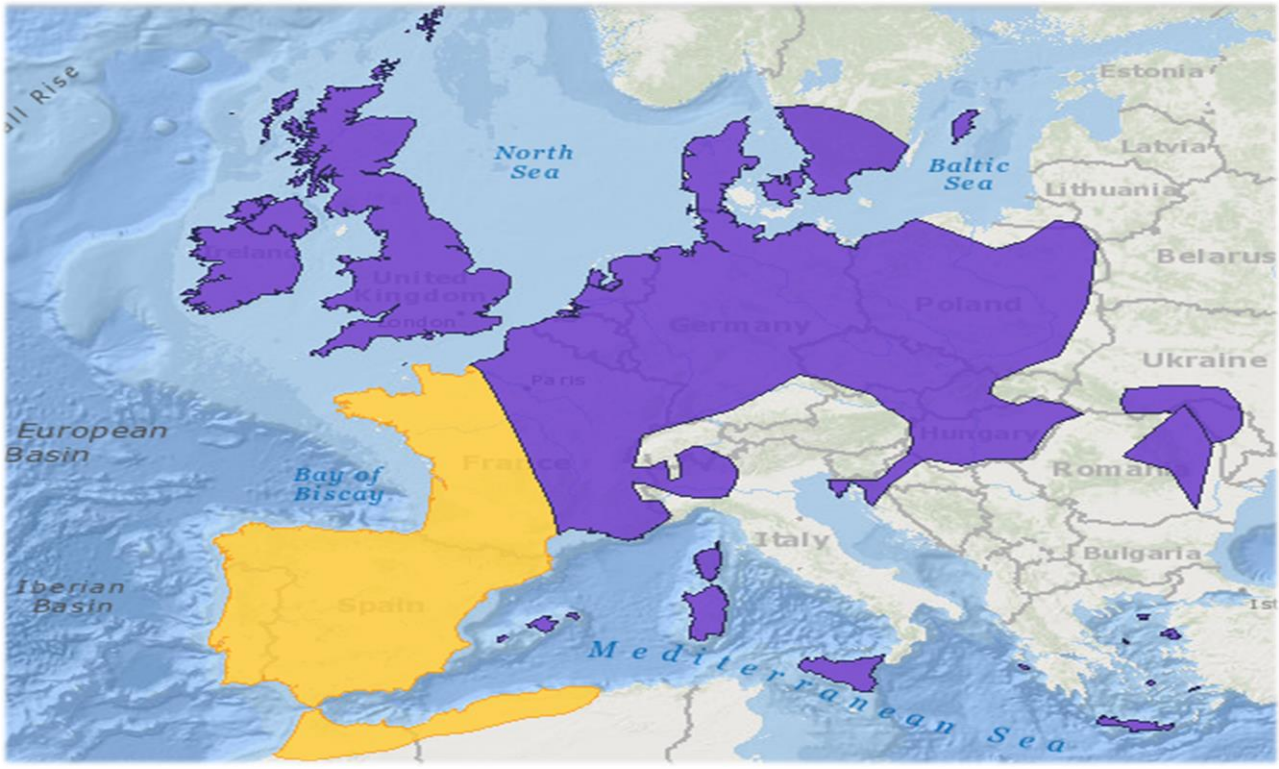
Tablica 1. Endemske vrste dvojezubaca na otocima, (Cardillo i sur., 2008).

Vrste i zajednički naziv	Rasprostranjenost	Tip otoka
Lepus brachyurus Japanski zec	Japan višе otoka	oceanski (~150km u blizini obale)
Lepus hainanus Hanianski zec	otok Hainan, Kina	otok povezan s kopnom
Lepus insularis Crni jackrabbit	otok Espiritu Santo, Meksiko	otok povezan s kopnom
Nesolagus netscheri Sumatranski prugasti kunić	Sumatra, Indonezia	otok povezan s kopnom
Pentalagus furnessi	Amami-Oshima i Tokuno-Shima otoci, Japan	Oceanski (~650km u blizini obale)
Sylvilagus graysoni Tres Marias Cottontail (smećkast kaput, bijeli rep)	Tres Marias Islands, Meksiko	Oceanski (~100km u blizini obale)
Sylvilagus mansuetus Brush Rabbit(dlakavi pokrov)	Otok San José, Meksiko	otok povezan s kopnom

Europa - Među postojećim rodovima porodice *Leporidae*, najstariji je fosil roda *Oryctolagus*, u Europi se prvi put pojavljuje prije oko 3.5 milijuna godina. Prvi pripadajući ostatci divljeg kunića su zabilježeni u južnoj Španjolskoj u srednjem pleistocenu (prije oko 0,6 milijuna god.), prilagođen na mediteransku klimu uglavnom ograničen tropskim pojasom. Kroz ovaj period u Europi, fosilni materijal bilježi izumiranje najmanje pet vrsta roda *Oryctolagus* (Lopez-Martinez, 2008).

2.2. Rasprostranjenost *O. cuninculus-a* u Europi

Europski divlji kunić smatra se ključnom vrstom na mediteranskom ekosustavu (Calvete i sur., 2004; Delibes i sur., 2007), budući da je najvažniji plijen za mnoge vrste predatora. Osim toga ova vrsta snažno utječe na ekosustav. Kopanjem jazbina značajno utječe na površinu tla (Eldridge i Myers, 2001), disperziju sjemena, a fekalne pelete poboljšavaju plodnost tla (Dixon i Hambler, 1993). Dok je u potrazi za hranom utječe na kompoziciju biljnih zajednica (Foran, 1986). Izvorna raspodjela nakon posljednjeg ledenog doba uključuje Pirinejski poluotok (Španjolska, Portugal), zapadnu Francusku i sjevernu Afriku, a smatra se da je introdukcija kroz cijelu zapadnu Europu došla još u rimsko doba (Gibb, 1990, Mitchell-Jones i sur., 1999) (slika 3). Trenutno se kreće kroz sve zemlje zapadne Europe, Irskoj i Velikoj Britaniji (uključujući otoke), Austriji, dijelovima Švedske, Poljske, Češke, Mađarske, Rumunjske, Ukrajine i mediteranskih otoka, Sicilije, Sardinije, Korzike, Krete, Baleara (Thompson i King, 1994), Hrvatske i Slovačke (Mitchell-Jones i sur., 1999).



Slika 3. Rasprostranjenost *O.cuninculusa* u Europi (žuta boja - izvorni; ljubičasta - introducirani) (http://maps.iucnredlist.org)

Danas je raspodjela vrste po Europi je neujednačena. Dok u sjevernoj Europi imaju tendenciju širenja i u nekim mjestima se smatra štetočinom, u južnoj Europi tijekom posljednjih desetljeća pretrpio je oštar pad uslijed intenzivne poljoprivrede te novog vala epidemije miksomatoze i hemoragijske bolesti (Ross i Tittensor, 1986). U Italiji vrsta je raširena na Siciliji i Sardiniji s populacijama visoke gustoće (Caruso i Siracusa, 2001). U sjevernoj Italiji, pokazuje se nagomilana distribucija, uglavnom prisutne uz rijeku Po, s niskom populacijom gustoće (Meriggi, 2001).

U Španjolskoj se populacija smanjila na 20 % ukupne od 1975. (Virgos i sur., 2005). Godine 2005. populacija se smanjila na tek 5 % ukupne od 1950, na temelju smanjenja populacije u Donana Nacionalnom parku, zaštićenom području. (Delibes i sur., 2000). Gustoća divljeg kunića zabilježena je maksimalno 40 jedinki po hektru u prvotnom staništu, iako je veliki broj značajno smanjen zbog nadolaska novih prijetnji sredinom 20. stoljeća (Angulo, 2004). U Portugalu, smanjenje populacije za 24 % zabilježeno je između 1995. i 2002. (Alves i Ferreira, 2002). *O. cuniculus* obično se nalazi ispod 1.500 m nadmorske visine (Fa i sur., 1999). U Hrvatskoj najviše obitava na sjevernodalmatinskim otocima, ljudskom aktivnošću prenesen je u Varaždin u lovište „Zelendvor“. Međutim danas ne možemo precizirati brojno stanje zbog nedostatka evidencije.

2.3. Biologija divljeg kunića

2.3.1. Vanjski izgled i opis

Tijelo kunića je obraslo dlakom. Boja je po leđima pretežito smeđe-siva, na leđima žućkastosmeđa, na bokovima svijetlo-hrđasta do sivo-bijela, a na trbuhu bijela. Rep je odozgo crn kao i rubovi ušiju, a odozdo bijelo obojen. Mužjaci i ženke su jednako obojeni, bez izražene fenotipske razlike. U usporedbi sa zecom, uške su mu kraće od dužine glave (6,5 do 8 cm), a i glava mu je zaokruženija. Karakteriziraju ga dobar sluh, dobar njuh i nešto slabiji vid, što je generalna osobitost cijele porodice zečeva. Stražnje noge su mu nešto duže od prednjih. Na prednjim nogama ima po pet prstiju, a na stražnjima po četiri. Palac je na prednjim nogama zakržljao i ne otiskuje se u podlozi. Prednje, kraće noge divljeg kunića, kojima kopa svoje podzemne nastambe, puno su snažnije nego u zeca (Mustapić, 2004) (Slika 4).

Slika 4. Divlji kunić (http://www.arkive.org/rabbit/oryctolagus-cuniculus/)

U ustima ima nepotpuno heterodontno zubalo (nedostaju očnjaci) sastavljeno od 28 zuba. Posebnost su zaglodnjaci, smješteni iza glodnjaka gornje vilice. Pretkutnjaci i kutnjaci su vrlo zbijeni. Između njih i sjekutića je tzv. krezubina. I dok su pretkutnjaci i kutnjaci zubi s ograničenim rastom, sjekutići su trajno rastući zubi. Na usta se nadovezuju ždrijelo, jednjak i tanko, slijepo i debelo crijevo. Slijepo crijevo bogato je mikroorganizmima te se u njemu

obavlja znatan dio prerade hrane. Konzumiranjem dijela vlastitog izmeta (koprofagija) divlji kunić kao i zec dio neiskorištenih hranjivih komponenata vraća ponovno u organizam. Optička osjetila divljih kunića smještena su bočno u očnim šupljinama lubanje pa divlji kunić bolje uočava predmete koji su sa strane od onih ispred njega. Divlji je kunić manji od običnog zeca. Prosječna je dužina tijela odrasle životinje 40 cm, a njezina repa oko 6 cm. Visina do grebena ne prelazi 16 cm. Tjelesna masa kreće se od 1.3 - 2.5 kg (Mustapić, 2004).

2.3.2. Reprodukcija

Kunići se pare od veljače do rujna, a ženke se kote od ožujka do listopada. Skotnost traje oko 30 dana (od 28 do 31). Ženke dosežu spolnu zrelost prosječno u tri i pol mjeseca, mužjaci četiri, a mogu živjeti do devet godina (Macdonald i Barrett, 1993), iako se neki mnogo ranije predaju predatorima i ostalim opasnostima. Do 75 % mladih stradaju od predatora prije nego uspostave teritorij (Angulo, 2004). U tijeku rasplodne sezone jedna ženka iz prirodne populacije divljih kunića može donijeti na svijet pet do sedam generacija (okota). U svakoj generaciji može biti od četiri do deset kunića. Veliku reproduktivnu sposobnost pospješuje i za divljeg kunića karakteristična superfertacija. Mladi kunići na svijet dolaze u podzemnim jazbinama zaštićeni od vremenskih nepogoda i predatora. Nakon okota potpuno su goli, slijepi i bespomoćni (slika 5) i prvih nekoliko tjedana potpuno su ovisni o vrlo brižnoj majci. Prva se dlaka javlja tek šest do osam dana nakon okota, kada divlji kunići počinju razaznavati i zvukove. Oči im se otvaraju desetog dana. Otprilike dva tjedna nakon okota mladunci napuštaju gnijezdo krijući se u visokoj travi. U dobi od nekoliko mjeseci divlji kunići se osamostaljuju i kopaju prve nastambe u blizini gnijezda (Mustapić, 2004).

Slika 5. Kunići nakon okota (http://www.arkive.org/rabbit/oryctolagus-cuniculus/)

2.3.3. Stanište i ekologija

O. cuniculus odabire miješano stanište mediteranskog hrasta savane ili šikare ili područja na kojem oko 40 % otpada na skrovišta od predatora i otvorena područja koja podržavaju njihovu prehranu bogatu travama i žitaricama (Ward, 2005). Dragi su mu pjeskoviti predjeli s klancima i usjecima između kamenja s niskim raslinjem. Divlji kunić kopa svoja podzemna obitavališta, kunićnjake u propusnim i rahlim tlima koja se ne narušavaju, najradije na sunčanim položajima (slika 6). Hodnici su prokopani u različitim smjerovima, pod različitim i naglim kutovima zakretanja i s većim brojem izlaza, označeni izmetom. U posebno izdvojenom rovu, obloženom suhom travom i dlakom s vlastitih prsiju, ženka svija gnijezdo i koti mlade. Ženka se zadržava u njegovoj neposrednoj blizini ulazeći samo da nahrani mlade. Svaki put kad majka napušta gnijezdo, brižno za sobom zatrpava izlaz zemljom i travom te ga obilježava vlastitim urinom. Divlji je kunić životinja sumraka. Podzemne nastambe napušta uglavnom pred večer i ranom zorom, a za lijepa sunčana vremena može izići i danju. Iako se divlji kunić vrlo brzo kreće, nije izdržljiv i ustrajan trkač pa se uglavnom zadržava u neposrednoj blizini svoje jazbine. U opasnosti se zavlači u nju trčeći u cik-cak liniji. Prestrašen i u opasnosti glasa se drečanjem. Kunići vole teritorije i skloni su živjeti i loviti hranu u kolonijama do 20 odraslih (Mitchell-Jones i sur., 1999) te preferiraju sumrak (Ward, 2005). Vjerni su prvotnom staništu, gdje su okoćeni i nisu skloni seobama. Divlji kunić se hrani ponajprije zeljastim biljkama, koje čine 70 do 80 % njegove prehrane. Zamjenska su mu hrana jednogodišnje mladice drveća i grmlja,

drveni dijelovi biljaka, iglice četinjača, podzemni dijelovi bilja, sjemenke i zrna. Ne preza ni od iskapanja korijenja ili odgrizanja pupova, a mladice i plodovi obične borovnice su mu poslastica. Zimi u nedostatku ispaše, glođe koru drveća. Glodanje kore, ispaša, karakteristično rovanje tla i prokopavanje zemlje gradnjom podzemnih nastamba osobito su izraženi ondje gdje divlji kunić obitava u velikim kolonijama gdje mogu nastati štete na šumskom kompleksu, a izvjesne štete prave i u poljoprivredi. Sačinjava prehranu za preko četrdeset vrsta predatora, od kojih se nekoliko specijaliziralo za ovu vrstu (Delibes i Hiraldo., 1981). Preko 80 % prehrane iberijskog risa *(Lynx pardinus)* sastoji se od divljeg kunića. (Delibes i sur., 2000), orao krstaš (*Aquila heliaca)* divlje kuniće u prehrani konzumira 40-80 %, a smanjenje broja *O. cuniculus* povezuje se s približnim istrebljenjem dvaju predatora (Zofio i Vega, 2000). Osim toga ova vrsta snažno utječe na ekosustav. Kopanjem jazbina značajno utječe na površinu tla i disperziju sjemena, a fekalne pelete poboljšavaju plodnost tla. Dok je u potrazi za hranom utječe na kompoziciju biljnih zajednica.

Slika 6. Kunićnjak (http://www.arkive.org/rabbit/oryctolagus-cuniculus/)

Divlji kunić se kreće isključivo skakutanjem pravilno zabacujući stražnje noge ispred prednjih. Prilikom brza kretanja, bijega, skupina mu je otisaka u obliku slova Y. Otisak prednje šape koja je prva dotaknula podlogu, uvijek je dalje od otiska prednje šape koja je druga dodirnula podlogu. Skokovi uglavnom ne prelaze dužinu od jednoga metra i kraći su od skokova običnog zeca, ali je njihova frekvencija znatno veća. Suštinski se trag nogu divljeg kunića i zeca

razlikuju samo po veličini, nešto su manji od zečjih. Staze divljih kunića nalaze se unutar kolonija ili u njihovoj blizini. Vode uglavnom od podzemnih nastambi do izvora hrane. Trag su divljeg kunića i njegovi brabonjci. Oni su nešto manji od zečjih i gotovo su okrugli. Ostavlja ih u većim ili manjim hrpama blizu podzemnih nastamba (Mustapić, 2004).

2.3.4 Ugroženost

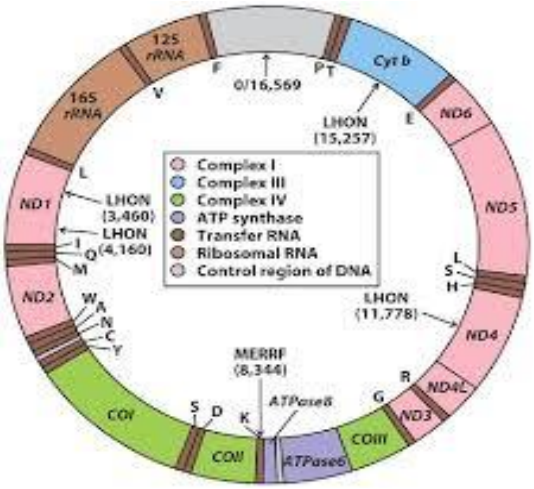
Najjača sila koja stoji iza smanjenja *O. cuniculusa* bile su dvije bolesti koje su se pojavile u 20-om stoljeću. Miksomatoza je južnoamerički virus koji se prvenstveno širi vektorima insekata (komarca i muhe) koji je namjerno uveo farmer sredinom 1950-ih godina u Francuskoj radi kontrole populacije kunića (Angulo i Cooke, 2002). Procjenjuje se da je 90 % europskih divljih kunića nestalo zbog miksomatoze (Virgos i sur., 2005). Nakon pojave simptoma, smrt rezultira u prosjeku unutar 13 dana (Ward, 2005). Kunići s virusom mnogo su ranjivija meta za predatore (Villafuerte i sur., 1995). Mladi su podložniji miksomatozi od odraslih. Slučajevi miksomatoze dosežu vrhunac od ranog ljeta do jeseni (Angulo, 2004). Hemoragijska bolest kunića (RHD) je virus koji se pojavio u europi kasnih 1980-ih, uzrokujući smrt 55-75 % kunića na Pirinejskome poluotoku (Villafuerte i sur., 1995). RHD se primarno širi direktnim kontaktom. Smrt obično rezultira unutar 24 sata od pojave simptoma s kratkom inkubacijom unutar 48 sati (Villafuerte i sur., 1995). Odrasli su manje podložni RHD-u nego mladi (suprotno od miksomatoze), a RHD prevladava pretežno u kasnoj zimi i proljeću (Angulo 2004). Gubitak staništa i rasipavanje su neprekidni uzroci smanjenja populacije *O. cuniculusa,* koji iziskuje makiju i šumsku vegetaciju za hranu i sklonište (Ward, 2005). Visoko intenzivna produkcija stoke doprinosi degradaciji staništa i konkurenciji resursa. Uzorana zemlja se češće pretvori u zatvorenu šumu nego u makiju, što nije pogodno stanište za ovu vrstu (Ward, 2005).

2.4. Mitohondrijska DNA

Filogenetske analize često se temelje na usporedbi nukleotidnih sljedova mitohondrijskih gena. Mitohondrijska DNA vrlo je popularan i u praksi možda i najčešće korišten izvor filogenetskih informacija iz nekoliko izvora. Prisutna je u genomu stanica u vrlo velikom broju kopija pa ju je moguće umnožiti i iz vrlo ograničene količine uzorka ili iz uzorka „lošijeg integriteta“. Ona ne sadrži introne, što olakšava postupak umnažanja i određivanja sljedova nukleotida. Mitohondrijska DNA životinja najčešće sadrži 37 „Single - copy“ gena različitog stupnja varijabilnosti. Danas postoji velik broj u potpunosti sekvenciranih genoma različitih životinjskih i biljnih vrsta. U filogenetskim i filogeografskim analizama najčešće su korišteni geni za citokrom-oksidazu, NADH dehidrogenazu, geni za veliku i malu pod jedinicu rRNA, citokrom b, geni za pod jedinice ATP sintetaze te ne-kodirajuća kontrolna regija (Ristov, A. 2007) (slika 7).

Mitohondrijska DNA sisavaca ima jednostrano majčinsko nasljeđivanje bez rekombinacija te se relativno brzo razvija (mutira). Zbog takvih genetskih osobina mtDNA se smatra vrlo korisnim genetskim biljegom za proučavnje porijekla, genetske raznolikosti i diferencijacije visoko srodnih vrsta i jedinki unutar vrsta (Liu i sur., 2006). Mitohondriji se nalaze u gotovo svim stanicama u dovoljnom broju pa se mitohondrijska DNA može izolirati iz svih tkiva, iako s različitim prinosom (White i sur., 1998.). Upravo majčinsko nasljeđivanje i haploidnost dvije su glavne razlike mitohondrijskog i nuklearnog genoma (Ballard i Whitlock, 2004). Mitohondrijska DNA je vrlo značajan dio genoma i nalazimo je u svakoj stanici sa 0.0006 % ili 1 % ukupne mase stanične DNA.

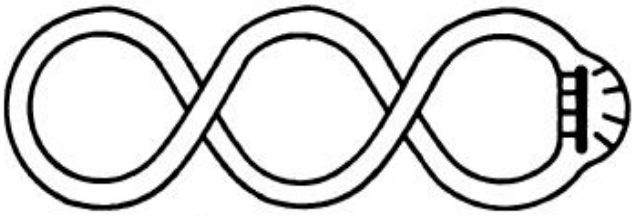
Mithondrijski genom sisavaca je zatvorena kružna spiralno zavijena dvolančana molekula veličine oko 16 kilobaza (kb), koja sadrži gene ribosomalne (rRNA), prijenosne (tRNA) i glasničke (mRNA) RNA (Wood Phua, 1996). Mitohondrijski genom se sastoji od dvije rRNA, 22 tRNA i 13 genskih proteina koji kodiraju komponente enzimskog kompleksa respiratornog lanca (Villalta i sur., 1992). Ti geni zauzimaju veći dio dužine mitohondrijskog genoma ostavljajući samo kratku kontrolnu regiju koja uključena u regulaciju transkripcije i translacije. Mitohondrijska DNA *Oryctolagus cuninculs-a* duga je 17247 parova baza.



Slika 7. Mitohondrijska DNA (http://chimerasthebooks.blogspot.hr).

2.4.1. Kontrolna regija

Kasamatsu i sur., (1971.), ustanovili su u istraživanju da polovica molekula kovalentno vezanih eksponencijalnog rasta stanica sadrže odvojeni dio DNA regije, koju su nazvali kontrolnom regijom (displacement loop). Kontrolna regija sadrži dvostruki segment i izbočeni dio jednolančane DNA. Jednolančani dio je tanji i ima nepravilniji oblik nego dvostruka regija. Dužine jednolančanog ulomka i dvostrukog dijela kontrolne regije su otprilike jednake dužine (Kasamatsu i sur., 1971). Kontrolna regija je ne kodirajući dio mtDNA dužine oko 1000 bp sa nukleotidnim sljedovima koji djeluju u začetku replikacije i transkripcije mitohondrijskog genoma (Harrison, 1989). U kontrolnoj regiji svih kralješnjaka nalazi se D – petlja (D – loop), trolančana struktura koja nastaje tijekom replikacije, a često se taj naziv upotrebljava i kao sinonim za kontrolnu regiju (White i sur., 1998). Kontrolna regija ne kodira za sintezu proteina i zbog toga ne podliježe prirodnoj selekciji, još jedan od razloga zbog kojeg je pogodna za filogenetska istraživanja.



Slika. 8 Zatvorena kružna mtDNA sa kontrolnom regijom (Kasamatsu i sur., 1971.)

3. HIPOTEZ I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Do danas nisu rađene analize genetičke varijabilnosti divljih kunića u Republici Hrvatskoj tako da o podrijetlu kunića nemamo relevantnih podataka. Da bi dobili što bolji uvid, u ovom radu je analizirana kontrolna regija mtDNA koja je optimalni biljeg za analize genetičke varijabilnosti, budući da je po arheološkim podatcima kunić prisutan na našem prostorima još od razdoblja gornjeg paleolitika ili ranije.

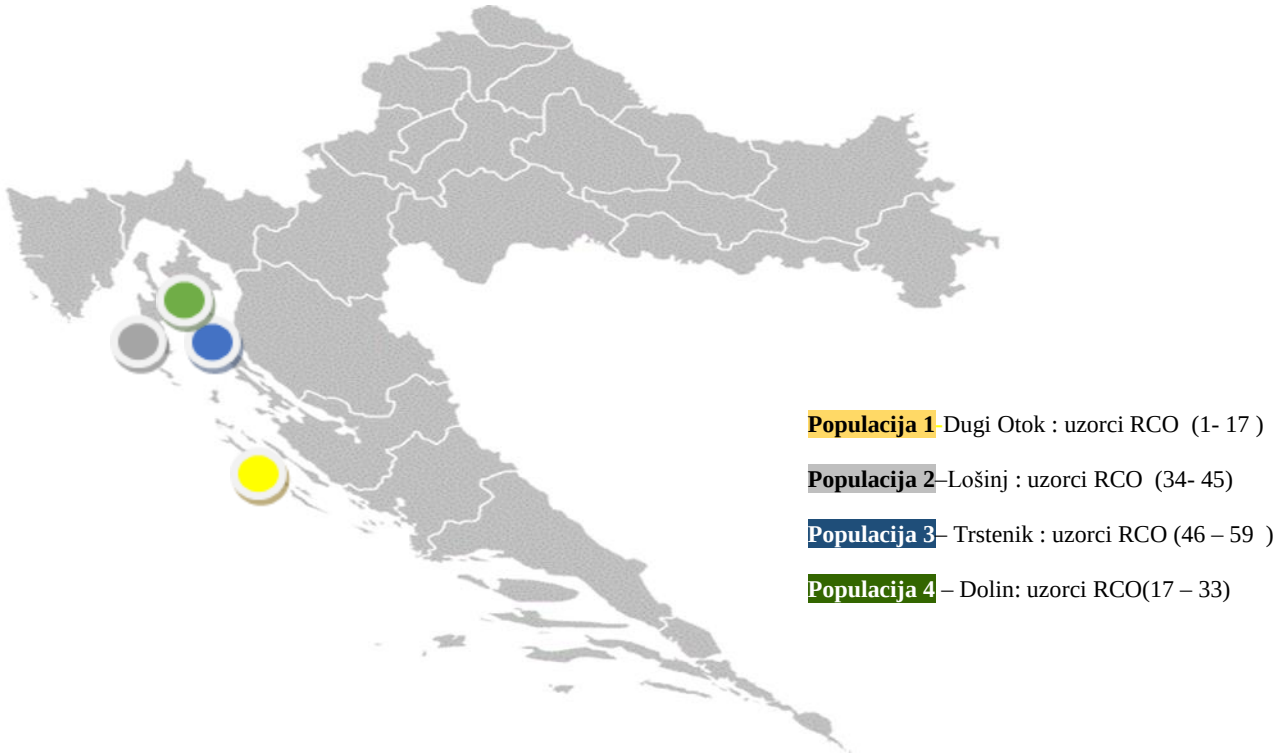
Ciljevi istraživanja:

- Ekstrakcija DNA i optimizacija početnica za umnažanje kontrolne regije mtDNA lanačanom reakcijom polimeraze,
- Podrijetlo *O. cuninculusa* koji nastanjuje RH,
- Na temelju molekularno-genetskih analiza putem kontrolne regije mtDNA usporediti varijabilnost divljeg kunića sa područja RH sa divljim kunićima iz Europe i svijeta,

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorci tkiva divljeg kunića prikupljeni su na sjevernojadranskim otocima, na otoku Lošinju, Dolinu, Trsteniku i na Dugom otoku. Na otoku Lošinju prikupljeno je 17 uzoraka (RCO1, RCO2, RCO3, RCO4, RCO5, RCO6, RCO7, RCO8, RCO9, RCO10, RCO11, RCO12, RCO13, RCO14, RCO15, RCO16, RCO17). Na otoku Dolinu prikupljeno je 10 uzoraka (RCO34, RCO35, RCO36, RCO37, RCO38, RCO39, RCO40, RCO41, RCO42, RCO43, RCO44, RCO45). Iz Dugog otoka prikupljeno je 13 uzoraka (RCO46, RCO47, RCO48, RCO49, RCO50, RCO51, RCO52, RCO53, RCO54, RCO55, RCO56, RCO57, RCO58, RCO59), a sa Trstenika 16 uzoraka (RCO17, RCO18, RCO19, RCO20, RCO21, RCO22, RCO23, RCO24, RCO25, RCO26, RCO27, RCO28, RCO29, RCO30, RCO31, RCO32, RCO33). Iz banke gena preuzete su dodatne sekvence (GenBank, http:/ncib.nlm.nih.gov/genbank/nucleotide) iz Španjolske, Francuske, Njemačke, Belgije, USA, Engleske, Novog Zelanda, Australije, Kine, i sekvence iz uzgoja (prilog1).



Slika 9. Lokacije prikupljenih uzoraka divljeg kunića, (RCO = laboratorijski broj divljeg kunića).

4.2. Izdvajanje DNA

Ekstrakcija i pročišćavanje genomske DNA iz uzoraka animalnog podrijetla početni je korak za daljnje analize genetičke varijabilnosti populacija domaćih životinja i njihovih divljih srodnika. Danas postoje mnoge različite metode i tehnologije za ekstrakciju genomske DNA. Sve metode uključuju lizu (razgradnju) početnog materijala, uklanjanje proteina i ostataka kemikalija za uspješnu ekstrakciju DNA.

Uzorci tkiva izvađeni su iz hladnjaka i ostavljeni na sobnoj temperaturi prije početka izdvajanja DNA. DNA iz tkiva izdvojena je koristeći komplet reagencija Bio Basic, prema uputama proizvođača (Bio Basic Canada Inc., Procedure for Isolation of Genomic DNA from Animal For Animal Tissue).

4.2.1. Priprema tkiva pomoću Bio Basic tissue genomic DNA Kit protokola

U 1,5 ml „eppendorf“ epruvetu dodano je 30 mg izrezanog tkiva, dodano je 300 µl ACL otpine (animal), zatim 20 µl proteinaze K. Sadržaj je izmiješan te inkubiran na 55 °C (1-3 h), tijekom inkubacije sadržaj je povremeno miješan kako bi se tkivo potpuno razgradilo. Nakon inkubacije sadržaj je izmiješan 20 s te je centrifugiran na 12000 rpm (5 min). 300 µl sadržaja premješteno je u novu 1,5 ml „eppendorf“ epruvetu, zatim je dodano 300 µl AB otopine.

4.2.2. Priprema kolona pomoću Bio Basic tissue genomic DNA Kit protokola

U kolone je dodano 500 µl Wash solution te je centrifugirano na 10000 rpm (2 min). Sadržaj koji je prošao kroz kolonu je odbačen, a kolona je postavljena u novu „eppendorf“ epruvetu. Ovaj postupak je ponovljen. Kolone su premještene u nove „eppendorf“ epruvete i dodano je 40 µl otopine za eluciju, sadržaj je inkubiran na 50 °C (2 min), zatim je centifugiran na 10000 rpm (1 min). Ovim postupkom protokol je završen, tekućina koja je prošla kroz kolone sadržava odvojenu DNA.

4.2.3. Određivanje koncentracije DNA pomoću nano spektrofotometra

Za kvantitativno proučavanje molekule DNA postoji metoda spektrofotometrijskog određivanja koncentracije DNA. Apsorpcijski spektar molekule DNA određuje se spektrofotometrom pri čemu se bilježi stupanj apsorpcije (apsorbancija) pri svakoj valnoj

duljini. Koncentacije DNA mjerene su pomoću nano spektrofotometra (Implen NanoPhotometer™ Pearl, P-30-NSW).

4.2.4. Vizualizacija elektoforezom na agaroznom gelu

Elektroforeza u agaraznom gelu je adekvatna za razdvajanje molekula između 100 i 30000 pb. Agarozni gel se prije razlijevanja u kalup mora ohladiti te se dodaje etidij bromid koji interkalira u baze te zbog toga DNA možemo vizualizirati pod UV svjetlom. Pufer u elektroforezi (TBE) osigurava ione koji omogućavaju vođenje struje.

Vizualizacija se postiže unošenjem uzorka zajedno s bojom metiloranž u omjeru 1:5 u jažice gela. Na mikrofilm se ispipetiralo 3 µl boje metiloranž i 2 µl DNA, lagano se promiješalo te ispipetiralo u jažicu gela. Nakon što su se uzorci postavili na gel; uključio se uređaj za provođenje struje kroz pufer, 20 min na 90 V. Nakon 20 min se uređaj se ugasio, radila se vizualizacija na UV svijetlu te nakon toga slikanje na uređaju UVITEC Gel Documentation Systems & Software.

.

4.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) je metoda umnažanja određenog odsječka DNA u uvjetima in vitro. Da bi se molekula DNA (ili samo njezin odsječak) umnožila ovom metodom potrebno je poznavati njezin (barem djelomičan) slijed nukleotida na osnovu kojega će se odabrati početnice. Početnice su dva kraća oligonukleotida koji predstavljaju granice odsječka DNA koji umnažamo; jedna je komplementarna 5' kraju jednog lanca DNA, a druga 3' kraju drugog lanca. PCR reakcija se sastoji od tri dijela: 1. denaturacija dvolančane DNA 2. sparivanje početnica s komplementarnom jednolančanom DNA 3. produljenje lanca DNA

Kako bi umnožili mtDNA kontrolnu regiju koristile su se početnice preuzete od Pierpaoli i sur. (1999).

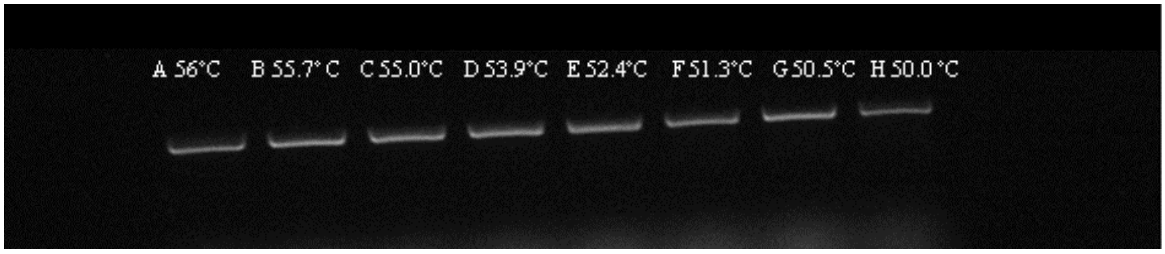
„forward“ 5’- CACCATCAGCACCCAAAG - 3’ i

„reverse“ 5’- ATTTAAGAGGAACGTGTGGG - 3’

4.3.1. Kontrola početnica

Umnažanje u PCR-u se radilo pomoću gradijenta (56 °C – 50 °C). Uzorci su podijeljeni na osam jednakih dijelova te se dodala i negativna kontrola (uzorak bez DNA) u svrhu kontrole kontaminacije. Umnažanje se radilo prvo na 95 °C (5 min) te 35 ciklusa od tri dijela 95 °C, 45 s, od 50 °C do 56 °C (po gradijentu A 56 °C, B 55.7 °C, C 55.0 °C, D 53.9 °C, E 52.4 °C, F 51.3 °C, G 50.5 °C, H 50.0 °C), 72 °C na jednu min te na kraju 72 °C (1 min) i nakon toga ciklus s 4 °C do ∞. Nakon završenog PCR-a, osam istih uzoraka stavili su se na gel elektroforezu (20 min, na 90 V) (slika 10).

Ovaj postupak se radio ne samo u svrhu kontrole početnica u smislu kompatibilnosti s regijom koju treba umnožiti već i u svrhu kontrole ispravnosti parametara temperature. Ukoliko je elektroforezom pokazano da je regija uzorka umnožena ispravno to znači da su početnice dobro odabrane isto kao i parametri temperatura. Iako je temperatura preostalih uzoraka odgovarla u ovom radu koristio se gradijent E, 52 °C.



Slika 10. PCR gradijent na elektroforezi.

4.3.2. Uvjeti PCR-a

Za 13 uzoraka za umnažanje lančanom reakcijom polimeraze napravio se Master mix. Uzela se prazna „eppendorf“ epruveta te se dodalo: EmeraldAmp® GT PCR Master Mix koji se dodao u koncentraciji od 12,5 µl, Forward početnice 0,5 µl, Reverse početnice 0,5 µl, vode bez nukleotida 9,5 µl i DNA 2 µ. Ove koncentracije se se dodale samo za jedan uzorak, uz dodatak negativne kontrole. Za svako umnažanje se dodala jedna negativna proba sa dodatkom 2 µl H_2O umjesto DNA u svrhu kontrole kontaminacije.

Uvjeti korišteni u radu:

95 °C - 5 min
95 °C - 45 s
52 °C - 45 se } 38x
72 °C - 1 min
72 °C - 1 min
4 °C - ∞

4.4. Pročišćivanje PCR produkta i njegova priprema za određivanje slijeda nukleotida pomoću „Promega“ Wizard SV Gel i PCR Clean-Up System protocol

Uzorak obrađen PCR-om stavio se u „eppendorf“ epruvetu od 1.5 ml. U epruvetu se dodao dvostruki volumen (dodalo se 50 µl Membrane Binding otopine u epruvetu s 23 µl PCR produkta). Dodala se kap Binding otopine na stijenku membrane kako bi se aktivirala. PCR produkt sa Membrane Binding otopine se zatim prebacio u mikrotubu ispod koje je epruveta za sakupljanje sedimenta te se inkubirala (4 min) na sobnoj temperaturi. Centrifugirala se na 14 000 rmp na (1 min). Nakon toga se sediment bacio.

Ispiranje - Dodalo se 700 µl Membrane Wash otopine (sa dodanim etanolom). Centrifugiralo se (1 min) na 14 000 rpm te se sediment bacio. Nakon toga se ponovio prethodni korak, sa dodavanjem 500 µl Membrane Wash otopine i centrifugiralo se na 14 000 rpm (5 min). Sediment se bacio te se centrifugirao (1 min). Zatim se dio epruvete sa membranom izvadio i stavio u „eppendorf“ epruvetu od 1.5 ml. Dodalo se 30 µl vode bez nukleotida na membranu. Inkubacija je trajala tri minute nakon toga se centrifugirala (1 min) na 14 000 rpm. Sediment sadrži DNA, te se filter bacio, epruveta se skladištila na temperaturi od 4 °C ili – 20 °C.

4.5. Određivanje slijeda nukleotida PCR produkata

Određivanje nukleotidnih sljedova vršilo se na uređaju ABI PRISM ®3100-Avant Genetic Anlyser pomoću Sanger dideoksi metode. Za određivanje nukleotidnih sljedova koristile su se iste početnice kao i za umnažanje kontrolne regije mtDNA.

4.6. Analiza nukleotidnih sljedova

Analiza nukleotidnih slijedova dobivena uređajem (ABI PRISM ®3100-Avant Genetic Anlyser), vršena je programom MEGA 6.0 (Tamura, 2013, http://www.megasoftware.net/) Statistička obrada podataka i dendogram napravljeni su pomoću programa MEGA 6.0. Vjerodostojnost dendograma je provjerena bootstrapom 1-10000.

Nukleotidna razlika te razlika haplotipova izračunata je u programu DNAsp5 (Librado. P, Rozas J., 2009, http://dnasp.software.informer.com/5.1/).

Median – Joing mreža napravljena je programskim paketom Network (Bandelt i sur., 1999, http://www.fluxus-engineering.com/netwinfo.htm).

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Izdvajanje DNA iz uzoraka tkiva kunića

Ekstrakcija DNA vršila se pomoću kompleta Bio Basic (Procedure for Isolation of Genomic DNA from Animal). Uzorci prikupljeni sa tri lokacije u Hrvatskoj su predstavljali kvalitetan izvor DNA, dok sa uzorcima otoka Lošinja to nije bio slučaj, izolirana DNA uglavnom je bila razgrađena i slabo vidljiva na gelu te ovi uzorci nisu dalje analizirani. Kvalitativna provjera je rađena elektroforezom u agaroznom gelu. Koncentracija DNA mjerena je nanospektofotometrom (Implen Nanophotometer™ Pearl) te je iznosila od 10 do 400 ng/µl. (Tablica 2).

Tablica 2. Rezultat mjerenja koncentracije DNA nanospektofotometrom.

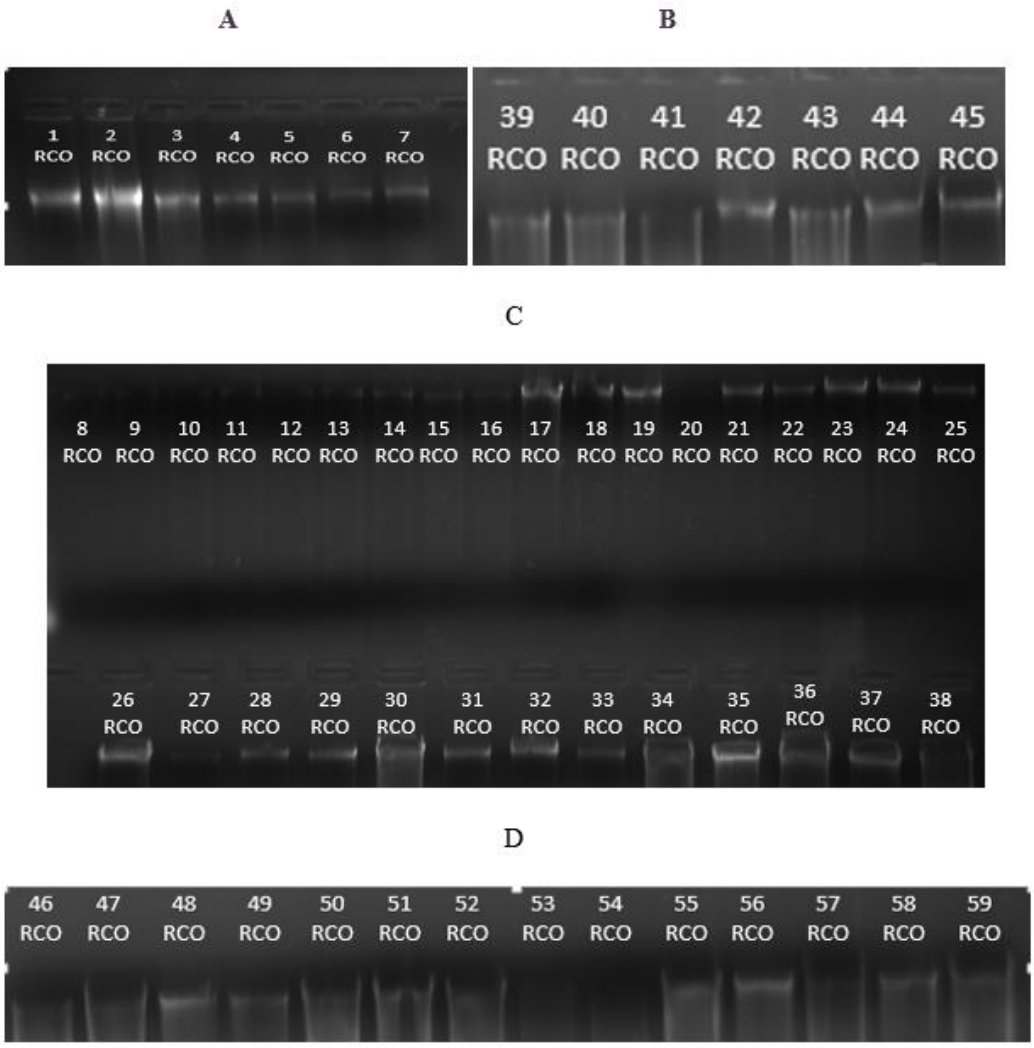
Laboratorijski broj	Ime	Lokacija	Vrsta uzorka	Koncentracija (ng/µl)
RCO 1	RCO 1	Lošinj	tkivo	59
RCO 2	RCO 2	Lošinj	tkivo	118
RCO 3	RCO 3	Lošinj	tkivo	55,5
RCO 4	RCO 4	Lošinj	tkivo	29,5
RCO 5	RCO 5	Lošinj	tkivo	30,5
RCO 6	RCO 6	Lošinj	tkivo	13,5
RCO 7	RCO 7	Lošinj	tkivo	26,5
RCO 8	RCO 8	Lošinj	tkivo	11,5
RCO 9	RCO 9	Lošinj	tkivo	14
RCO 10	RCO 10	Lošinj	tkivo	20
RCO 11	RCO 11	Lošinj	tkivo	20
RCO 12	RCO 12	Lošinj	tkivo	27
RCO 13	RCO 13	Lošinj	tkivo	26
RCO 14	RCO 14	Lošinj	tkivo	26
RCO 15	RCO 15	Lošinj	tkivo	31
RCO 16	RCO 16	Lošinj	tkivo	20,5
RCO 17	RCO 17	Trstenik	tkivo	79
RCO 18	RCO 18	Trstenik	tkivo	49
RCO 19	RCO 19	Trstenik	tkivo	39
RCO 20	RCO 20	Trstenik	tkivo	6,5
RCO 21	RCO 21	Trstenik	tkivo	48
RCO 22	RCO 22	Trstenik	tkivo	30,5
RCO 23	RCO 23	Trstenik	tkivo	111
RCO 24	RCO 24	Trstenik	tkivo	48
RCO 25	RCO 25	Trstenik	tkivo	24

Tablica 2. Rezultat mjerenja koncentracije DNA nanospektofotometrom (nastavak).

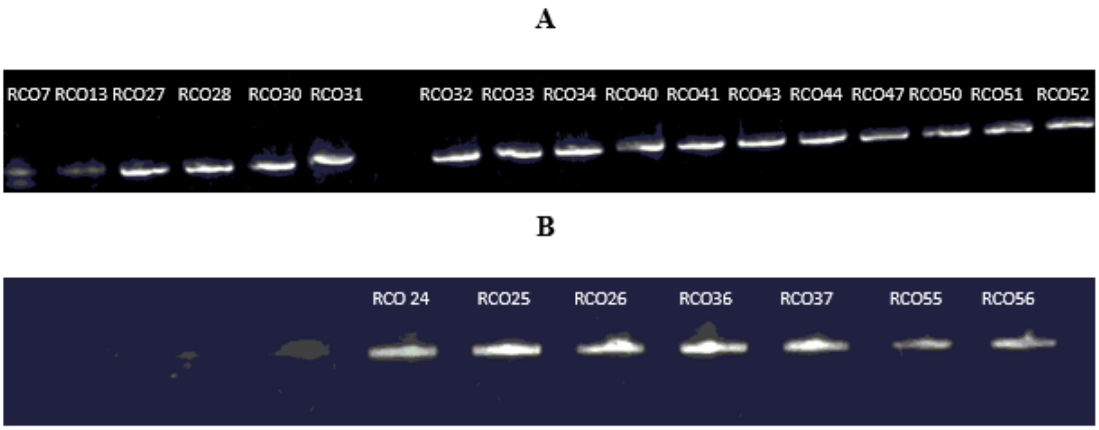
Laboratorijski broj	Ime ili broj	Lokacija	Vrsta uzorka	Koncentracija (ng/µl)
RCO 26	RCO 26	Trstenik	tkivo	124
RCO 29	RCO 29	Trstenik	tkivo	38,5
RCO 30	RCO 30	Trstenik	tkivo	251
RCO 31	RCO 31	Trstenik	tkivo	39,5
RCO 32	RCO 32	Trstenik	tkivo	84,5
RCO 33	RCO 33	Trstenik	tkivo	49,5
RCO 34	RCO 34	Otok Dolin	tkivo	158
RCO 35	RCO 35	Otok Dolin	tkivo	112
RCO 36	RCO 36	Otok Dolin	tkivo	225
RCO 37	RCO 37	Otok Dolin	tkivo	96,5
RCO 38	RCO 38	Otok Dolin	tkivo	357
RCO 39	RCO 39	Otok Dolin	tkivo	236
RCO 40	RCO 40	Otok Dolin	tkivo	304
RCO 41	RCO 41	Otok Dolin	tkivo	198
RCO 42	RCO 42	Otok Dolin	tkivo	70,5
RCO 43	RCO 43	Otok Dolin	tkivo	335
RCO 44	RCO 44	Otok Dolin	tkivo	180
RCO 45	RCO 45	Otok Dolin	tkivo	185
RCO 46	RCO 46	Dugi otok	tkivo	76
RCO 47	RCO 47	Dugi otok	tkivo	151
RCO 48	RCO 48	Dugi otok	tkivo	51,5
RCO 49	RCO 49	Dugi otok	tkivo	24
RCO 50	RCO 50	Dugi otok	tkivo	84,5
RCO 51	RCO 51	Dugi otok	tkivo	47
RCO 52	RCO 52	Dugi otok	tkivo	83
RCO 53	RCO 53	Dugi otok	tkivo	20
RCO 54	RCO 54	Dugi otok	tkivo	53
RCO 55	RCO 55	Dugi otok	tkivo	66
RCO 56	RCO 56	Dugi otok	tkivo	53
RCO 57	RCO 57	Dugi otok	tkivo	160
RCO 58	RCO 58	Dugi otok	tkivo	34,5
RCO 59	RCO 59	Dugi otok	tkivo	91

5.2. Lančana reakcija polimerazom

Dizajnirane početnice preuzete su prema (Pierpaoli i sur., 1999), uspješno je umnožen odsječak kontrolne regije mitohondrijske DNA. Protokol za lančanu reakciju polimerazom je optimiziran pomoću PCR - gradijenta (iCyeler, BIORAD, Germany). Reakcija je provedena u 38 ciklusa, optimalna temperatura sparivanja bila je 52 °C. Kvaliteta dobivenog PCR provjerena je elektoforezom na gelu (slika 12). Umnoženi PCR produkt iz tkiva divljeg kunića bio je dobre kvalitete, uzorci sa otoka Lošinja bili su slabije vidljivi (slika 11).



Slika 11. Nepročišćeni uzorci na gelu prije umnažanja PCR-om; slika A - uzorci s otoka Lošinja; slika B - uzorci s otoka Dolina; slika C - uzorci (17–35) Trstenik; slika D - uzorci s Dugog otoka.



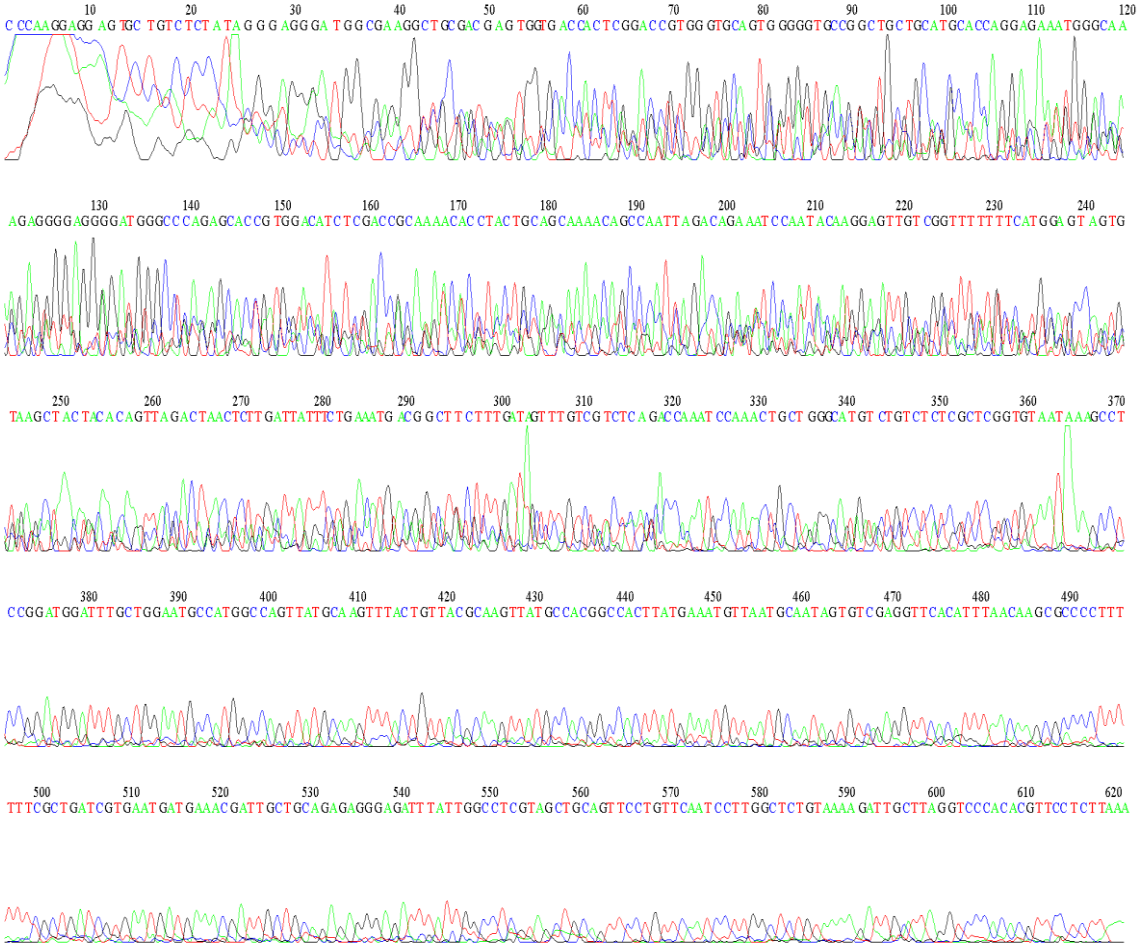
Slika 12. Dobiveni PCR produkti; slika A – obuhvaćen dio uzoraka sa svih lokacija; slika B - obuhvaćen dio sa Trstenika, Dugog otoka i Dolina

5.3. Pročišćivanje PCR produkta

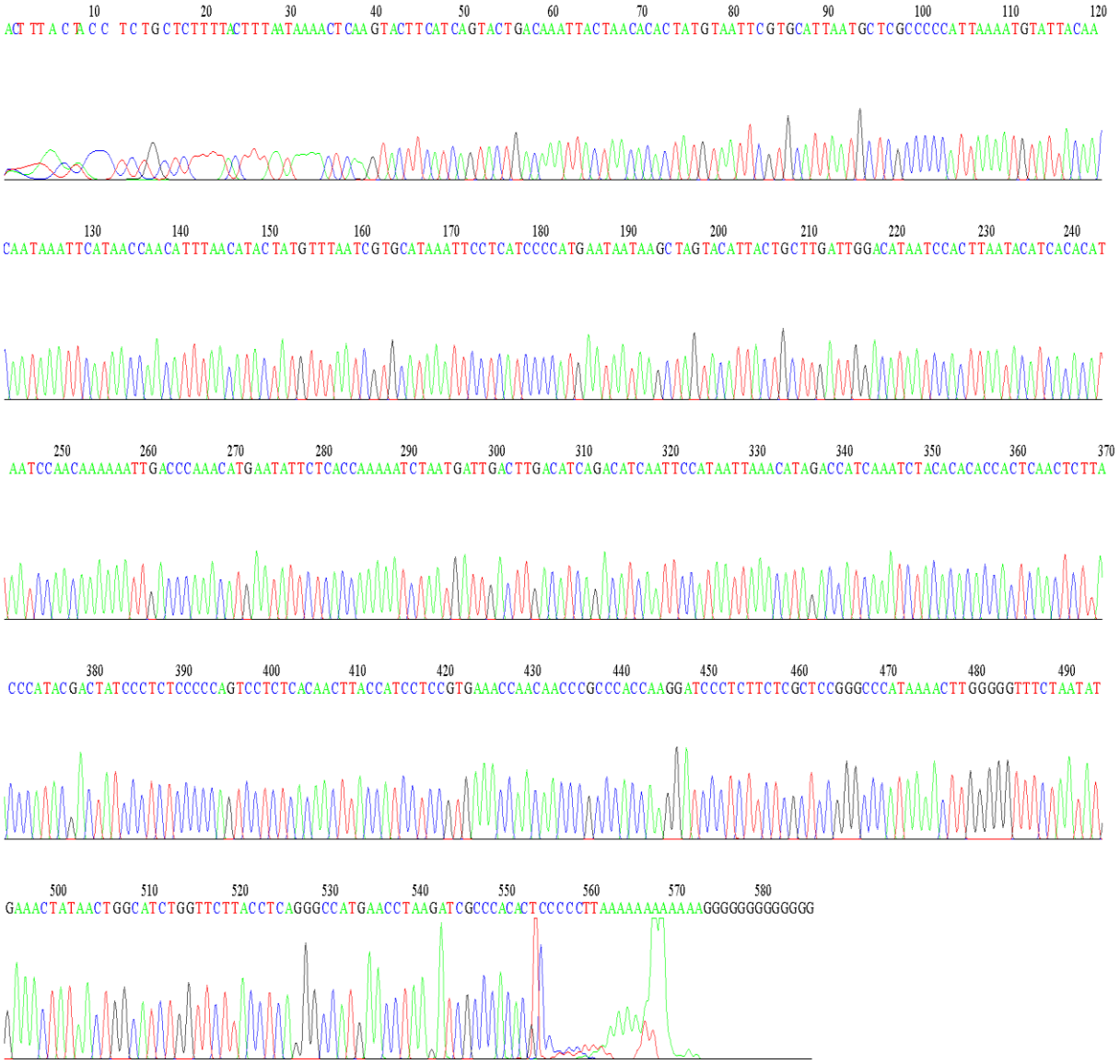
Zaostatci početnica i kemikalija nakon obavljene lančane reakcije polimerazom uklonjeni su Promega Wizard SV Gel i PCR Clean-Up System protocol (Promega Corporation, USA) kompletom za pročišćivanje nukleotidnih slijedova iz gela po zadanim uputama proizvođača. PCR produkti uspješno su pročišćeni u volumenu 30 µl.

5.4. Analiza nukleotidnih sljedova

Analiza nukleotidnih sljedova dobivenih (ABI PRISM ®3100-Avant Genetic Anlyser) odradila se pomoću paketnog programa Mega 6.0 (Tamura, 2013, http://www.megasoftware.net/) svaki slijed pojedinačno se provjeravao i prekidao na mjestima na kojima nukleotidi nisu bili jasno vidljivi i bez poklapanja sa drugim nukleotidima. Slijed se nakon toga prebacivao na opciju „*alignment*“ u programu Mega 6.0, nakon čega je uslijedilo poravnavanje (Alignment) sa programom ClustalW. Pomoću ove opcije svaka sekvenca je poravnata tako da se poklapa sa ostalim sekvencama koje smo dodali. Uzorci s lokacije otoka Lošinja bili su loše kvalitete (slika 13) te su uklonjeni kako bi smanjili greške daljnjih analiza. Na slici 14. prikazan je rezultat sekvence koji zadovoljava kriterij za daljnju analizu. Nukleotidni sljedovi u daljnjem postupku su skraćeni na svim uzorcima zbog mogućnosti daljnje analize (neighbor – joining mreže) veličina uzorka od 510 bp svedena je na 360 bp, nalazi se na mjestu 15489-15848 u kontrolnoj regiji mtDNA.



Slika 13. Rezultat sekvence koji ne zadovoljava kriterij za daljnju analizu

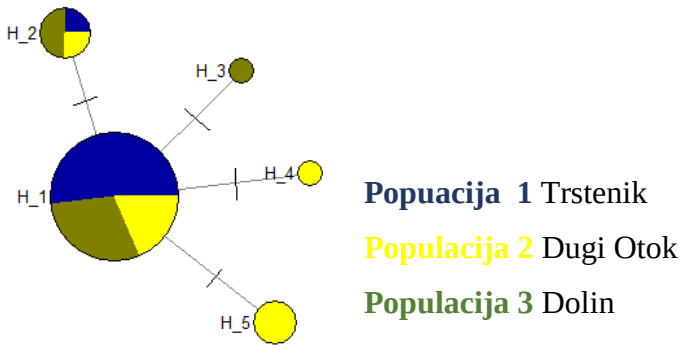


Slika 14. Rezultat sekvence koji zadovoljava kriterij za daljnju analizu.

5.5. Varijabilnost nukleotidnih sljedova

5.5.1. Analiza haplotipova Hrvatskih populacija

Filogenetska analiza u programu Network obuhvaćala je 36 jedinki iz tri populacije (Dolin, Dugi Otok, Trstenik) sjevernojadranskih otoka Republike Hrvatske. Ispisom u DNAsp (prilog 2) programu ustanovljeno je pet haplotipova (H_1, H_2, H_3, H_4, H_5) divljeg kunića (*O.cuninculus)*. Ustanovljena je izrazito niska varijabilnost haplotipova, koja se potvrđuje samim omjerom haplotip:broj uzoraka 1:7. Dužina kontrolne regije iznosila je 510 bp, rezultat analize sadržavao je veći broj haplotipova u odnosu na dužinu od 360 bp koja je korištena u usporedbi hrvatskih populacija sa svjetskim. U tablici 3. prikazani su haplotipovi divljeg kunića Hrvatske. Na slici 15. nacrtana je Neighbor – joining mreža koja prikazuje udaljenosti unutar grupe divljih kunića Hrvatske.



Slika 15. Neighbor – joining mreža haplotipova iz Hrvatske.

Tablica 3. Prikaz haplotipova divljeg kunića Hrvatske i broj nukleotidnih sljedova (n), duljine sekvence 510 bp.

Haplotip	Trstenik (n)	Dugi otok(n)	Dolin(n)
H_1	14	5	8
H_2	1	1	2
H_3			1
H_4		1	
H_5		3	

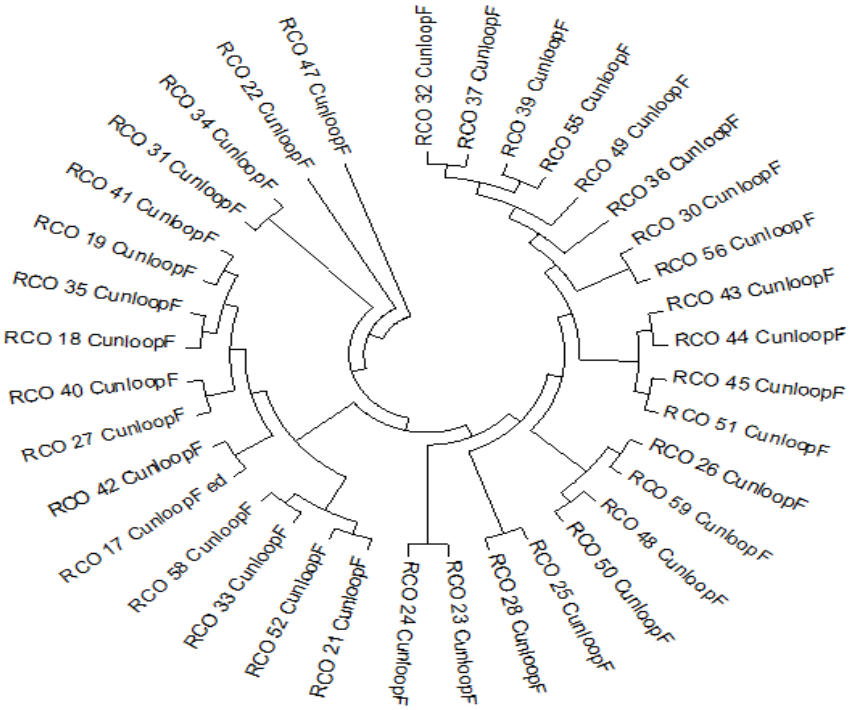
U haplotipu H_1 i H_2 svrstale su se sve tri populacije (otok Dolin, Trstenik i Dugi otok) dok su haplotip H_4 i H_5 činili uzorci sa Dugog otoka. Postoje indikacije koje pokazuju blago dijeljenje populacije sa Dugog Otoka (H_4 i H_5) i populacije sa otoka Dolina (H_3) od drugih populacija prikazane haplotipovima.

Na otoku Dolinu uočena su tri haplotipa (H_1, H_2 i H_3). Dugi otok je bio zastupljen sa četiri haplotipa (H_1, H_2, H_4 i H_5), a Trstenika dva haplotipa (H_1 i H_2). Haplotip H_1 pokazao se s najvećom frekvencijom kod sve tri populacije (slika16).

Na slici 16. prikazana je frekvencija haplotipova sjevernojadranskih otoka.

Na slici 17. na cirkularnom dendogramu prikazana je raznolikost 36 nukleotidnih sljedova divljeg kunića sjevernojadranskih otoka.

Slika 16. Frekvencije haplotipova sjevernojadranskih otoka Republike Hrvatske.



Slika 17. Cirkularni dendogram divljeg kunića sjevernojadranskih otoka RH.

5.5.2. Analiza haplotipova Hrvatske populacije u usporedbi sa europskom i svjetskom populacijom

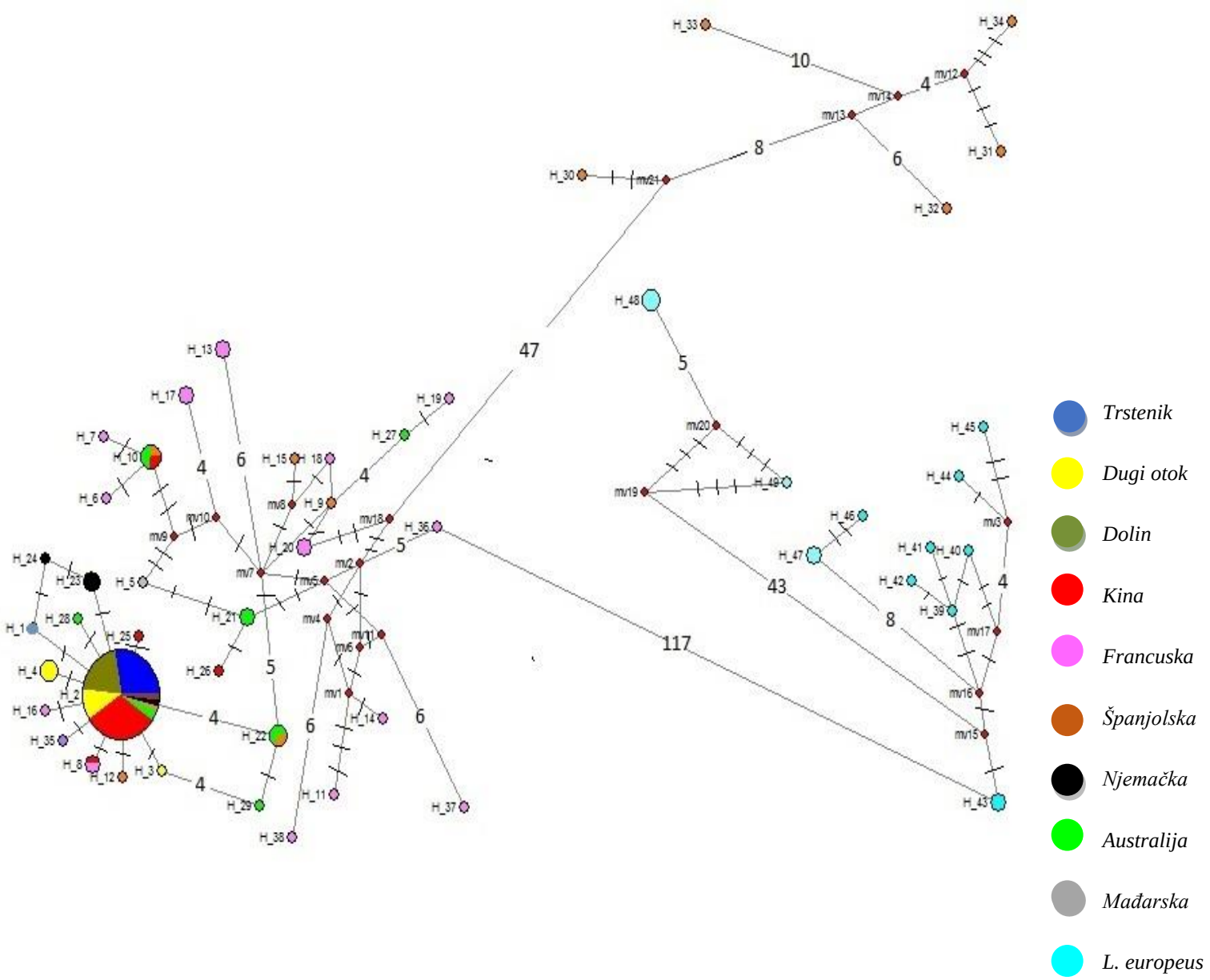
Analiziranjem nukleotidnih sljedova kontrolne regije mitohondrijske DNA preuzetih iz banke gena (Prilog 1), 69 uzoraka divljeg kunića (*O. cuniculusa*) te 14 uzoraka (*L. europeus*) zajedno sa 36 uzoraka divljeg kunića iz Hrvatske utvrđena je 49 haplotipova (Prilog 3). Duljina sekvence iznosila je 360 bp.

Haplogrupu A činilo je 14 hapltipova (H_1, H_2, H_3, H_4, H_8, H_12, H _16, H_ 22, H_23, H_24, H_ 25, H_28, H_29, H_35). H_1 predstavljao je refernetnu mtDNA divljeg kunića. Haplotip H_2 imao je najveću frekfenciju (54) uzorka; 32 uzorka iz Hrvatske, 16 uzoraka iz Kine, dva uzorka Australije, iz Španjolske, Njemačke i USA po jedan uzorak. Haplotip H_3 i H _4 pokazivali su frekvenciju sa Dugog otoka. H_ 8 činio je po jedan uzorak iz Francuske i Kine, H_ 12 iz Španjolske; H_16 iz Francuske; H_ 22 dva uzorka iz Australije i 1 iz Španjolske, H_23 iz Njemačke i USA, H_ 24 Njemačka, H_25 Kina, H_28 i H_ 29 Australija, H_35 Engleska.

U haplogrupi B nalazila su se četiri haplotipa (H_5, H_6, H_7, H_10, H_21, H_26), Haplotip H_5 iz Mađarske, H_ 6 i H_7 iz Francuske, H_10 jedan uzorak iz Španjolske, dva iz Australije i jedan iz Kine , H_21 po dva uzorka iz Australije, H_26, Kina

U haplogrupi C vidiljvo je šest hapltipova (H_9, H_15, H_18, H_19, H_20, H_27) H_ 15 i H_9 dolazili su iz Španjolske, H_18, H_19 iz Francuske, H_20 iz Francuske, H_ 27 iz Australije.

Haplotipovi H_11, H_13, H_14, H_17, H_ 36, H_37 i H_38 nisu pripadali nijednoj od navedenih haplogrupa. Izuzetak bi bili uzorci iz Španjolske koji čine svoju zasebnu haplogrupu H_30, H_31, H_32, H_33, H_34 udaljeni 47 mutacija. U svrhu provjere dodana je tzv. Out grupa kako bi se utvrdila udaljenost vrsta po broju mutacija, out-grupu čine europski zečevi (*L. europaeus*) udaljeni 117 mutacija. Geografski, haplogrupa A koja je najviše komponirana se sastoji od 14 haplotipova. Haplotip H_2 je najčešći u grupi, i mnogi drugi haplotipovi su povezaniji s njom. Iako se kod haplotipova Hrvatske uočava značajna udaljenost po mutacijama na slici 18. ipak postoje indikacije povezanosti divljeg kunić Hrvatske u usporedbi sa ostalim populacijama Europe i svijeta.



Slika 18. Filogenetski odnosi prikazani su u Median-joining mreži, haplogrupe sastavljene od 1 do 49 haplotipova.

Kako je prikazano na slici 19. uočavala se povezanost haplotipova sa pojedinih država u većoj frekvenciji; povezanost hrvatskih, kineskih i australskih, njemačkih, španjolskih te isto tako uočava se pozvanost francuskih H_16 i H_ 8 odvojenih samo jednu mutaciju u haplogrupi A. Ostali haplotipovi su povezani sa francuskim haplotipovima, što je isto zanimljivo.

6. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja na kontrolnoj regiji (*O.cuninculusa*) su doneseni sljedeći zaključci:

1. Analizom gradijenta PCR-a utvrđena je optimalna temperatura od 52°C
2. Na području Hrvatske ustanovljena je izrazito niska varijabilnost haplotipova, koja se potvrđuje samim omjerom haplotip / broj uzoraka (1:7). Iz tri populacije sjevernojadranskih otoka Republike Hrvatske analizom je utvrđeno pet haplotipova divljeg kunića (*O. cuninculus)*
3. Promatrajući samo uzorke divljeg kunića iz Hrvatske može se zaključiti da je veća genetska raznolikost uzorkovana duljim nukleotidnim slijedom
4. U odnosu na europske, azijske i uzorke iz Australije, u Hrvatskoj je uočen najmanji broj haplotipova divljeg kunića

7. LITERATURA

1. Alves, P. C. and Ferreira, C. (2002). *Determinação da abundância relativa das populações de coelho-bravo (Oryctolagus cuniculus algirus) em Portugal Continental*. Universidade de Porto, ICETA. Final report CIBIO-UP/ICN.

2. Alves P. C., Ferrand N., Hackländer K. (2008). Lagomorph Biology: Evolution, Ecology, and Conservation. Springer-Verlag, New York.

3. Angulo, E. and Cooke, B. (2002). First synthesize new viruses then regulate their release? The case of the wild rabbit. *Molecular Ecology* 11: 2703-2709.

4. Angulo, E. (2004). El conejo. In: C. M. Herrera (ed.), *El Monte mediterraneo en Andalucia*, pp. 122-125. Conserjeria de Medio Ambiente, Junta de Andalucia, Sevilla, Sevilla, Andalucia, Spain.

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

6. Biju-Duval, C., Ennafaa, H., Dennebouy, N., Monnerot, M., Mignotte, F., Soriguer, R. C. and El Gaaied, A. 1991. Mitochondrial DNA evolution in Lagomorphs: origin of systematic heteroplasmy and organization of diversity in European rabbits. *Journal of Molecular Evolution* 33: 92-102.

7. Blašković, E. (2014). Varijabilnost dvojezubaca na području Europe. Sveučilište u Zagrebu Agronomski Fakultet (2014). Str. 4 -5

8. Calvete C., Angulo E. and Estrada R. (2004). Conservation of European wild rabbit populations when hunting is age and sex selective. Biol. Cons., 121: 623- 634.

9. Cardillo, M. et al. (2004). Human population density and extinction risk in the world's carnivores. – PLoS Biol 2: e 197

10. Cardillo, M. et al. (2008). Global patterns in the phylogenetic structure of island mammalassemblages. — Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 275: 1549-1556.

11. Caruso S. and Siracusa A. (2001). Factors affecting the abundance of wild rabbit (Oryctolagus cuniculus) in agroecosystems of the Mount Etna Park. Hystrix It. J. Mamm., 12: 45-49.

12. Chapman JA, Flux JEC (1990). Rabbits, hares and pikas. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland, p9.

13. Chapman, J. A. and Flux, J. C. (2008). Introduction to the Lagomorpha. – In: Alves, P. et al (eds), Lagomorph biology. Springer, pp. 1-9.

14. Clavel, J. et al. (2010). Worldwide declin of specialist species: toward a global functional homogenization? – front. Ecol. Environ. 9: 222 – 228

15. Delibes, M. and Hiraldo, F. (1981). The rabbit as prey in the Iberian Mediterranean ecosystem 12-16.. In: C. D. MacInnes and K. Myers (eds), Proceedings of the World Lagomorph Conference. Guelph, Canada. 614-622.

16. Delibes, M., Rodrigues, A. and Ferreras, P. (2000). Action Plan for the Conservation of the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*) in Europe. Convention on the conservation of European wildlife and natural habitats: 1-40. Oslo, Norway.

17. Dixon J.M. and Hambler D.J. (1993). Wildlife and reclamation ecology: Rabbit middens on seeded limestone quarryspoil. Environ. Conserv. 20 (1): 65-73

18. Eldridge D.J. and Myers C.A. (2001). The impact of warrens of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.) on soil and ecological processes in a semi-arid Australian woodland. J. Arid Environ., 47: 325-337.

19. Fa, J. E., Sharples, C. E. and Bell, D. J. (1999). Habitat correlates of European rabbit distribution in southern Spain. *Journal of Zoology (London)* 249: 83-96

20. Foran B.D. (1986). The impact of rabbits and cattle on an arid calcareous shrubby grassland in central Australia. Vegetatio, 66: 49-59.

21. Ge, D**.** et al. (2012). Did the expansion of C4 plants drive extinction and massive rangecontraction of micromammals? Inferences from food preference and historicalbiogeography of pikas. — Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 326–328: 160-171.

22. Gibb**,** J. A. (1990). The European Rabbit *Oryctolagus cuniculus*. In: J. A. Chapman and J. E. C. Flux (eds), *Rabbits, hares and pikas: Status survey and conservation action plan*, pp. 116-120. IUCN, Oxford, UK.

23. Graur D., Duret L., Gouy M. (1996). Phylogenetic position of the order *Lagomorpha* (rabbits, hares and allies). Nature. 379(6563):333-5

24. Hirakawa, H. (2001). Coprofhagy in leporids and other mamalian herbivores. – Mamm. Rev. 31: 61 – 80

25. Hoffman, M. et al. (2011). The changing fates og the world's mammals. - Phil. Trans. R. Soc B 366: 2598 – 2610

26. Long, J.L. (2003). Introduced Mammals of the World: Their History, Distribution and Influence. C SIR O Publishing, Colling wood, Australia.)

27. Lopez-Martinez, N. (2008). The Lagomorph Fossil Record and the Origin of the European Rabbit. — In: Alves, P. et al. (eds), Lagomorph Biology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 27-46.

28. Macdonald, D. and Barrett, P. (1993). *Collins Field Guide: Mammals of Britain and Europe*. HarperCollins Publishers, London, UK.

29. Matthee, C. A. et al. (2004). A Molecular Supermatrix of the Rabbits and Hares (*Leporidae*) Allows for the Identification of Five Intercontinental Exchanges During the Miocene.— Systematic Biology 53: 433-44

30. McCarthy, J. L. et al. (2012). Using camera trap photos and direct sightings to identify possible refugia for the Vulnerable Sumatran striped rabbit Nesolagus netscheri. — Oryx 46: 438-441.

31. McKinney, M. L. (2002). Urbanization, biodiversity, and conservation. Bioscience 52, 883–890.

32. Meriggi A. (2001). Il coniglio selvatico. In: Prigioni C., Cantini M., Zilio A. (eds), Atlante dei Mammiferi della Lombardia. Regione Lombardia. 130-133.

33. Mitchell-Jones, A. J., Amori, G., Bogdanowicz, W., Kryštufek, B., Reijnders, P. J. H., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J. B. M., Vohralik, V. and Zima, J. (1999). *The Atlas of European Mammals*. Academic Press, London, UK

34. Murray, K. A. et al. (2011). Integrating species traits with extrinsic threats: closing the gap between predicting and preventing species declines. – Proc. R. Soc B 278: 1515 – 1523
35. Mustapić, Zvonko i suradnici. Lovstvo. Zagreb : Hrvatski lovački savez, (2004).
36. Pierpaoli, M. et, al. (1999). Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (L.Corsicanus) as described by mitochondrial DNA sequencing: Molecular Ecology 8, 1085-1817.
37. Ristov, A. (2007.) Metode u molekularnoj biologij. Institut Ruđer Bošković.
38. Ross J., Tittensor A.M. (1986). Influence of myxomatosis in regulating rabbit numbers. Mamm. Rev., 16: 163-168.
39. Rabosky, D. L. (2009). Ecological limits and diversification rate: alternativ pardigms to expalin the variation in species richness among clades and regions. – Ecol. Lett. 12: 735 – 743.
40. Shvarts, E. A. et al. (1995). Geography of Mammal Diversity and Searching for Ways to Predict Global Changes in Biodiversity. — Journal of Biogeography 22: 907-914.
41. 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., http://www.megasoftware.net (10.9.2015).
42. The IUCN Red List of Threatened Species, http://www.iucnredlist.org/details/full/41280/0, http://maps.iucnredlist.org/ (17.06.2015).
43. Thompson, H. V. and King, C. M. (1994).*The European Rabbit: The History and Biology of a Successful Colonizer*. Oxford University Press, Oxford, UK, New York, USA and Tokyo, Japan.
44. Villafuerte, R., Calvete, C., Blanco, J. C. and Lucientes, J. (1995). Incidence of viral hemorrhagic disease in wild rabbit populations in Spain. *Mammalia* 59(4): 651-659 pp.
45. Virgos, E., Cabezas-Diaz, S. and Lozano, J. (2005). El declive del conejo en Espana: evidencias a partir de las estadisticas de caza. *Quercus* 236: 16-20 pp.
46. Ward, D. (2005). Reversing Rabbit Decline: One of the Biggest Challenges for nature conservation in Spain and Portugal.

47. White, P. S., Tatum, O.L., Tegelstrom, H., Densmore, L. (1998): Mitochondrial DNA isolation, separation, and detection of fragments. U: Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. 2nd ed (Hoelzel, A. R., urednik). Oxford University Press. Oxford. str. 65-101

48. Wiens, B. J. The causes of species richness patterns across space, time, and clades and the role of „ecological limits“. – Q. Rev. Biol. 86: 75- 96

49. Wilson**,** D. E., Reeder D. A. M. (2005). Mammal Species of the world. A Taxonomic and Geographic Reference (3rd ed). Johns Hopkins University Press. http://www.departments.bucknell.edu/biology/resources

50. Yamada, F. et al. (2002). Molecular phylogeny of Japanese Leporidae, the Amami rabbit Pentalagus furnessi, the Japanese hare Lepus brachyurus, and the mountain hare *Lepus timidus*, inferred from mitochondrial DNA sequences. 153— Genes & Genetic Systems 77: 107-116.

51. Zofio, J. B. and Vega, I. (2000). El Aguila Imperial. *Gran Fauna* 4.

8. PRILOZI

Prilog 1. U prilogu su navedeni izvori sekvenci d-loop regije korišteni u radu zajedno sa porijeklom i autorima te pripadajućim haplotipom.

Banka Gena	Porijeklo	Haplotip	Autor
AJ293838	Mađarski veliki	H_5	Bolet at al, 2000.
AJ293844	Flamish veliki	H_6	Bolet at al, 2000.
AJ293843	Bečki bijeli	H_7	Bolet at al, 2000.
AJ293836	Flamish veliki	H_8	Bolet at al, 2000.
Z83363	Japanski bijeli	H_37	van der Loo at al, 1997.
Z83354	Španjolska	H_9	van der Loo at al, 1997.
Z83365	Španjolska	H_10	van der Loo at al, 1997.
Z83361	Francuska	H_11	van der Loo at al, 1997.
Z83364	Španjolska	H_12	van der Loo at al, 1997.
Z83356	Francuska	H_13	van der Loo at al, 1997.
Z83352	Francuska	H_13	van der Loo at al, 1997.
Z83357	Francuska	H_14	van der Loo at al, 1997.
Z83350	Španjolska	H_15	van der Loo at al, 1997.
AJ563722	Francuska	H_16	Queney at al, 2002.
AJ563721	Francuska	H_17	Unpublished.
AJ563720	Francuska	H_17	Queney,G. at al. 2003.
AJ563719	Francuska	H_18	Unpublished.
AJ563718	Francuska	H_19	Unpublished.
AJ563716	Francuska	H_20	Unpublished.
AJ563715	Francuska	H_20	Unpublished.
OCU62927	europski kunić u Australiji	H_10	Fuller, at al 1997.
OCU62926	Australija	H_21	Fuller, at al 1997.
OCU62925	Australija	H_2	Fuller, at al 1997.
OCU62924	Australija	H_22	Fuller, at al 1997.
AF534108	USA	H_23	Long,J.R at al 2003.
AF534107	Njemačka	H_23	Long,J.R at al 2003.
AF534106	Njemačka	H_24	Long,J.R at al 2003.
AF534105	Yufeng smeđi	H_25	Long,J.R at al 2003.
AF534104	Japanski bijeli	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534102	New Zealand	H_10	Long,J.R at al 2003.
AF534099	Yufeng smeđi	H_26	Long,J.R at al 2003.
AF534098	Taihang Moutain	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF003195	europski kunić u Australiji	H_27	Zenger,K.R at al, 1997.
AF003194	europski kunić u Australiji	H_22	Zenger,K.R at al, 1997.
AF003193	europski kunić u Australiji	H_28	Zenger,K.R at al, 1997.
AF003192	europski kunić u Australiji	H_10	Zenger,K.R at al, 1997.
AF003191	europski kunić u Australiji	H_29	Zenger,K.R at al, 1997.
AF003190	europski kunić u Australiji	H_21	Zenger,K.R. and Richardson,B.J. 1997.
AF003189	europski kunić u Austral.	H_2	Zenger,K.R. and Richardson,B.J. 1997.
AF534097	Fujian smeđi	H_2	Long,J.R at al 2003.

Prilog 1. U prilogu su navedeni izvori sekvenci d-loop regije korišteni u radu zajedno sa porijeklom i autorima te pripadajućim haplotipom (nastavak).

Banka Gena	Porijeklo	Haplotip	Autor
AF534095	Njemačka uzgoj, Angora	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534094	Njemačka uzgoj, rex	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534093	Japanski bijeli	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534092	Sichuan bijeli	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534091	Zika uzgoj	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534090	USA	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534089	Novi Zeland	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534088	uzgoj: Elco	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534087	uzgoj: Dwarf	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534086	Kalifornia	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534085	Belgija	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534084	Yufeng Brown	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534083	Smeđi kunić	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534081	Haerbin White	H_2	Long,J.R at al 2003.
AF534080	Qixing	H_2	Long,J.R at al 2003.
Z83340	Španjolska	H_30	van der Loo at al, 1997.
Z83341	Španjolska	H_31	van der Loo at al, 1997.
Z83342	Španjolska	H_32	van der Loo at al, 1997.
Z83343	Španjolska	H_33	van der Loo at al, 1997.
Z83344	Španjolska	H_34	van der Loo at al, 1997.
Z83349	Španjolska	H_2	van der Loo at al, 1997.
Z83366	Španjolska	H_22	van der Loo at al, 1997.
Z83367	Španjolska	H_2	van der Loo at al, 1997.
AJ293835	Engleska	H_35	Bolet at al, 2000.
Z83362	Francuska	H_37	van der Loo at al, 1997.
Z83358	Francuska	H_39	van der Loo at al, 1997.
Z83347	Francuska	H_36	van der Loo at al, 1997.
AY466782	FYROM Makedonia,zec	H_39	Kasapidis p., 2005.
AY466783	FYROM Makedonia,zec	H_40	Kasapidis p., 2005.
AY466784	FYROM Makedonia zec	H_41	Kasapidis p., 2005.
AY466786	FYROM Makedonia zec	H_42	Kasapidis p., 2005.
AY466787	Grčka, europski zec	H_42	Kasapidis p., 2005.
AY466788	Grčka, europski zec	H_43	Kasapidis p., 2005.
AY466789	Grčka, europski zec	H_44	Kasapidis p., 2005.
AY466790	Grčka, europski zec	H_45	Kasapidis p., 2005.
AY466791	Grčka, europski zec	H_46	Kasapidis p., 2005.
AY466792	Grčka, europski zec	H_47	Kasapidis p., 2005.
AY466793	Grčka, europski zec	H_47	Kasapidis p., 2005.
DQ883206	Španjolska, europski zec	H_48	Melo-Ferreira,J. 2007.
DQ883204	Španjolska, europski zec	H_48	Melo-Ferreira,J. 2007.
DQ883198	Španjolska, europski zec	H_48	Melo-Ferreira,J. 2007.
DQ883201	Španjolska, europski zec	H_49	Melo-Ferreira,J. 2007.

Prilog 2. Distibucija haplotipova sjevernojadranskih otoka divljeg kunića dobivena programom DNAsp.

Number of sequences: 36 Number of sequences used: 36

Selected region: 1-511 Number of sites: 511

Total number of sites (excluding sites with gaps / missing data): 509

[Hap_1: 27 [RCO_17] [RCO_18] [RCO_19] [RCO_21] [RCO_22] [RCO_23] [RCO_24] [RCO_25] [RCO_26] [RCO_27] [RCO_28] [RCO_30] [RCO_31] [RCO_33] [RCO_34] [RCO_35] [RCO_36] [RCO_40] [RCO_42] [RCO_43] [RCO_44] [RCO_45] [RCO_48] [RCO_49] [RCO_50] [RCO_51] [RCO_52]

[Hap_2: 4 ['RCO_32] [RCO_37] [RCO_39] [RCO_55]

[Hap_3: 1 [RCO_41]

[Hap_4: 1 [RCO_47]

[Hap_5: 3 [RCO_56] RCO_58] [RCO_59]

Prilog 3. Distibucija haplotipova svjetske populacije divljeg kunića dobivena programom DNAsp.

[Number of sequences: 119] [Number of sequences used: 119] [Number of Sites in the complete Data File: 359] [Selected Region: 1-359]

[Hap# Freq. Sequences]

[**Hap_1**: 1 O._cuniculus] [**Hap_2**: 54 RCO_17] [RCO_18] [RCO_19] [RCO_21] [RCO_22] [RCO_23] [RCO_24] [RCO_25] [RCO_26] [RCO_27] [RCO_28] [RCO_30 [RCO_31] [RCO_32] [RCO_33] [RCO_34] [RCO_35] [RCO_36] [RCO_37] [RCO_39] [RCO_40] [RCO_41] [RCO_42] [RCO_43] [RCO_44] [RCO_45] [RCO_48] [RCO_49] [RCO_50] [RCO_51] [RCO_52] [RCO_55] [OCU62925] [AF534104] [AF534098] [AF003189] [AF534097] [AF534096] [AF534095] [AF534094] [AF534093] [AF534092]_[AF534091] [AF534090] [AF534089] [AF534088] [AF534087] [AF534086] [AF534085] [AF534084] [AF534083] [AF534081] [AF534080] [Z83367] [**Hap_3**: 1 [RCO_47] [**Hap_4**: 3 RCO_56] [RCO_58] [RCO_59] [**Hap_5**: 1 [AJ293838] [**Hap_6**: 1 [AJ293844] [**Hap_7**: 1 [AJ293843] [**Hap_8**: 2 [AJ293836] [Z83363] [**Hap_9**: 1 [Z83354] [**Hap_10**: 4 [Z83365] [OCU62927] [AF534102] [AF003192] **[Hap_11**: 1 [Z83361] **[Hap_12**: 1 [Z83364] **[Hap_13**: 2 Z83356] [Z83352] **[Hap_14**: 1 Z83357] **[Hap_15**: 1 Z83350] **[Hap_16**: 1 [AJ563722] **[Hap_17**: 2

[AJ563721] [AJ563720]**[Hap_18**: 1 [AJ563719] **[Hap_19**: 1 [AJ563718] **[Hap_20**: 2 [AJ563716] [AJ563715] **[Hap_21**: 2 [OCU62926] [AF003190] **[Hap_22**: 3 [OCU62924] [AF003194] [Z83366] **[Hap_23**: 2 [AF534108] [AF534107] **[Hap_24**: 1 [AF534106] **[Hap_25**: 1 [AF534105] **[Hap_26**: 1 [AF534099] **[Hap_27**: 1 [AF003195] **[Hap_28**: 1 [AF003193] **[Hap_29**: 1 [AF003191] **[Hap_30**: 1 [Z83340] **[Hap_31**: 1 [Z83341] **[Hap_32**: 1 [Z83342] **[Hap_33**: 1 [Z83343] **[Hap_34**: 1 [Z83344] **[Hap_35**: 1 [AJ293835] **[Hap_36**: 1 [Z83362] **[Hap_37**: 1 [Z83363] **[Hap_38**: 1 [Z83358] **[Hap_39**: 1 [AY466782] **[Hap_40**: 1 [AY466783] **[Hap_41**: 1 [AY466784] **[Hap_42**: 1 [AY466786] **[Hap_43**: 2 **[**AY466787] **[**AY466788] **[Hap_44**: 1 **[**AY466789] **[Hap_45**: 1 **[**AY466790] **[Hap_46**: 1 **[**AY466791]**[Hap_47**: 2 **[**AY466792] **[**AY466793]**[Hap_48**: 3 **[**DQ883206] **[**DQ883204]_ **[**DQ883198] **[Hap_49**: 1 **[**DQ883201]

ŽIVOTOPIS

Ime / Prezime	Ivan Kaštelanac
E-mail	ikastelanac@gmail.com
Obrazovanje i osposobljavanje	
	Srednja strukovna škola „Stanka Ožanića“, Zadar Veterinarski tehničar. 2008 godine upisao Agronomski fakultet na Sveučilištu u Zagrebu, 2013 stekao naziv univ. bacc Animalnih znanosti, iste godine upisao diplomski studij Ribarstvo i lovstvo na Agronomskom fakultetu. Stručnu praksu odradio na: Zavod za ribarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju, AS- lovni turizam, Zagreb, Hrvatska.
Radno iskustvo	Kroz akademsko obrazovanje radio preko student servisa na raznim poslovima: DMD Naturalis j.d.o.o. Zagreb (Hrvatska) Rad na terenu, administrativni poslovi, prezentacije, prijevoz djelatnika , ADC usluge tjelesne zaštite, PASTOR adminstrativni poslovi, HCPHS - Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo administrativni poslovi