

Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA populacije crvenokljune čigre (*Sterna hirundo*) s područja Njemačke

Grgurević, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:124237>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno - matematički fakultet

Biološki odsjek

Marija Grgurević

**Raznolikost kontrolne regije mitohondrijske DNA populacije
crvenokljune čigre (*Sterna hirundo*) s područja Njemačke**

Diplomski rad

Zagreb, rujan 2020.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Galov. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Najljepše zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Galov na svim stručnim savjetima, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Veliko hvala mag. biol. exp. Idi Svetličić na pomoći oko planiranja izvedbe rada, na susretljivosti i na ustupljenim materijalima. Također zahvaljujem Gordani Žakman na savjetima i pomoći prilikom tehničke izvedbe istraživanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski rad

RAZNOLIKOST KONTROLNE REGIJE MITOHONDRIJSKE DNA POPULACIJE CRVENOKLJUNE ČIGRE (*Sterna hirundo*) S PODRUČJA NJEMAČKE

Marija Grgurević

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Crvenokljuna čigra (*Sterna hirundo*) je ptičja vrsta čija je aktivnost usko vezana uz vodena staništa. Prirodna gnjezdilišta kopnenih populacija čine šljunčani otoci na kojima im veliku prijetnju čini ljudska aktivnost. Iz tog razloga, određivanje genetičke raznolikosti i strukture ključno je jer nam može ukazati na eventualno potrebne mjere za njezinu zaštitu. Cilj ovog diplomskog rada bio je analizirati nukleotidne sljedove kontrolne regije mitohondrijske DNA populacije crvenokljune čigre iz Njemačke, utvrditi distribuciju i učestalost haplotipova te usporediti haplotipove i razinu raznolikosti dobivene u ovom istraživanju s onima utvrđenim u populacijama Slovenije i Hrvatske. U istraživanom uzorku od 95 jedinki utvrđena je prisutnost od ukupno 23 haplotipa od čega je njih 13 zabilježeno samo kod jedne jedinke. Nađena je mala, ali statistički značajna diferencijacija između populacija jezera Neuwarper i jezera Lieps, dok je diferencijacija između grupe populacija iz Njemačke i grupe populacija iz Slovenije i Hrvatske izuzetno niska, što ukazuje na međusobnu povezanost tih skupina populacija. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem bit će dobra podloga za daljnje stvaranje baze podataka o raznolikosti crvenokljune čigre. Na taj način bi se stekla bolja cjelokupna slika ugroženosti ove vrste.

(27 stranica, 3 slike, 6 tablica, 28 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: kontrolna regija mtDNA, genetička raznolikost, morske ptice, Laridae, zaštita

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Ana Galov

izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

izv. prof. dr. sc. Renata Šoštarić

Rad je prihvaćen: 3.9.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology
Graduation Thesis

MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION DIVERSITY OF THE COMMON TERN (*Sterna hirundo*) POPULATION FROM GERMANY

Marija Grgurević

Roosveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Common Tern (*Sterna hirundo*) is a bird whose activity is closely related to water habitats. Natural freshwater tern habitats include river and lake islands in which the main threat for them is human activity. Studies on genetic diversity and structure provide a basis for protection actions that are potentially needed. The aim of this thesis was to analyse nucleotide sequences of the mitochondrial DNA control region of common tern population from Germany, to determine haplotype frequency and distribution, and to compare the levels of genetic diversity among populations from Germany and those from Croatia and Slovenia. In the sample of 95 individuals, 23 haplotypes were found, while 13 of them were found in only one individual. The results indicate that there is low, but statistically significant level of differentiation between populations from lake Nuwarper and lake Lieps. In addition, we found that level of differentiation between Common Terns from Germany and examined individuals from Croatia and Slovenia is low indicating connectivity between the studied population groups. Results of this investigation will be useful for creation of the mitochondrial DNA control region diversity database for Common Terns, which will contribute to better understanding of the threats for this species.

(27 pages, 3 figures, 6 tables, 28 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: mtDNA control region, genetic diversity, sea birds, Laridae, conservation

Supervisor: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Ana Galov, Assoc. Prof.

Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr. Renata Šoštarić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 3.9.2020.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Crvenokljuna čigra | 1 |
| 1.2. Konzervacijska genetika | 3 |
| 1.3. Molekularni markeri..... | 4 |
| 1.3.1. Kontrolna regija mitohondrijske DNA..... | 5 |
| 1.4. Dosadašnja molekularno-ekološka istraživanja crvenokljunih čigri | 7 |
| 1.5. Cilj rada | 8 |
| 2. MATERIJALI I METODE | 9 |
| 2.1. Uzorci perja..... | 9 |
| 2.2. Izolacija DNA | 9 |
| 2.3. Mjerenje koncentracije izolirane DNA..... | 10 |
| 2.4. Lančana reakcija polimerazom..... | 10 |
| 2.5. Elektroforeza | 11 |
| 2.6. Sekvenciranje | 11 |
| 2.7. Računalna obrada podataka..... | 11 |
| 2.7.1. BioEdit | 12 |
| 2.7.2. DnaSP | 12 |
| 2.7.3. PopART | 12 |
| 2.7.4. Arlequin | 12 |
| 3. REZULTATI | 13 |
| 3.1. Uspješnost sekvenciranja | 13 |
| 3.2. Distribucija haplotipova..... | 13 |
| 3.3. Genetička raznolikost | 15 |
| 3.4. Usporedba populacija s područja Njemačke s populacijama iz Hrvatske i Slovenije | 17 |
| 3.5. Mreža haplotipova | 19 |
| 4. RASPRAVA | 21 |
| 5. ZAKLJUČAK | 25 |
| 6. LITERATURA | 26 |
| ŽIVOTOPIS | 29 |

POPIS KRATICA

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

mtDNA - mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina

IUCN - međunarodni savez za očuvanje prirode (od engl. International Union for Conservation of Nature)

PCR - lančana reakcija polimerazom (od engl. polymerase chain reaction)

MHC - glavni sustav tkivne podudarnosti (od engl. major histocompatibility complex)

ATP - adenzin trifosfat (od engl. adenosine triphosphate)

rRNA - ribosomna RNA (od engl. ribosomal ribonucleic acid)

tRNA - transportna RNA (od engl. transfer ribonucleic acid)

kb - kilobaza

bp - bazni par

μl - mikrolitar

ml - mililitar

mM - mikromolarna

rpm - okretaja po minuti (od engl. revolutions per minute)

V - volt

UV - ultraljubičasta (od engl. ultraviolet)

N - broj analiziranih jedinki

H - broj haplotipova,

Hd - haplotipska raznolikost

π - nukleotidna raznolikost

k - srednji broj razlika između parova haplotipova

S - broj polimorfni mjesta

1. UVOD

1.1. Crvenokljuna čigra

Crvenokljuna čigra (*Sterna hirundo*), morska je ptičja vrsta čija je aktivnost usko vezana uz vodena staništa na kopnu i na moru. Pripada porodici galebova (*Laridae*) na koje i podsjeća svojom bijelom bojom perja s nijansama sive te crnom bojom perja na glavi. Pored toga, karakteriziraju ju još i narančaste noge te narančasti ili crveni kljun (Slika 1).



Slika 1. Crvenokljuna čigra (Izvor: AllAboutBirds)

Međutim, čigre su znatno okretnije i manjih proporcija od samih galebova, što čini njihovu glavnu razliku. Imaju dug životni vijek i većina pripadnika ove vrste živi dvadeset godina ili više (Vrezec i sur. 2018). Cirkumpolarnom distribucijom ova ptica uglavnom gnijezdi u umjerenim i subarktičkim područjima Europe, Azije i sjeverne Amerike (https://en.wikipedia.org/wiki/Common_tern). Pri tome, glavna područja gniježđenja slatkovodnih kolonija na području Hrvatske i Slovenije nalaze se uz tokove rijeke Save, na području šljunčare Rakitje, te uz rijeku Dravu gdje se glavna kolonija nalazi na akumulacijskom jezeru Ptuj. Pored toga, prisutne su i manje kolonije uz obalu Jadranskog mora, a sa Slovenske strane nalazi se i veća kolonija na području nacionalnog parka Sečovlje Salina (Svetličić i sur. 2019). Nadalje, na području Njemačke najveće se kolonije nalaze uz obalu Sjevernog mora, posebice na otocima uz Nizozemsku prema Danskoj granici. Manje kolonije nalaze se i uz obale Baltičkog mora, dok su slatkovodne kolonije rasprostranjene uglavnom na sjeveru i sjeveroistoku zemlje, područje jezera Mecklenburg i Lausitz, te uz donje tokove rijeke Rajne (Becker i Ludwigs 2004). Crvenokljuna čigra je isključivo

migratorna vrsta te, pored ranije navedenih područja gniježđenja, zimuje u tropskim i subtropskim obalnim predjelima (https://en.wikipedia.org/wiki/Common_tern).

Crvenokljune čigre gnijezde se u kolonijama koje čini i po nekoliko stotina parova, pri čemu ženke godišnje snesu najviše tri, a uglavnom jedno ili dva jaja (Vrezec i sur. 2018). Obzirom na ranije spomenutu povezanost ove vrste s vodenim staništima, prirodna gnjezdilišta kopnenih populacija čine šljunčani otoci. Pored predatora poput štakora, vidri i pasa, puno veću prijetnju ondje im predstavlja ljudska aktivnost (Becker i Ludwigs 2004). Regulacija riječnih tokova, izgradnja brana i akumulacijskih jezera radi iskorištavanja hidroenergije kao rezultat ima uništenje pripadajuće flore i faune. Nekontrolirano ispuštanje velike količine vode poplavljuje sprudove te odnosi jaja i ptice koji se na njima nalaze (Vrezec i sur. 2018). Iako podaci njemačkih istraživanja kažu da je brojnost ove vrste na tom području stabilna i iznosi 9000 – 10000 parova jedinki, samo njih 1350 – 1550 nastanjuje kopnena područja (Seitz i sur. 2003, Sudmann i sur. 2003, Weber i sur. 2003). Značajan pad brojnosti kontinentalnih kolonija započeo je još sredinom 1960-ih godina, usporedno s početkom masovne primjene pesticida (Becker i Ludwigs 2004). Primjerice, brojnost na području ranije spomenutog jezera Mecklenburg tijekom 1998. – 2000. godine iznosila je 700 do 900 parova, a već tijekom 2000. – 2002. godine brojnost se smanjila na 408 – 523 para (Köppen 2001). Takav trend smanjenja brojnosti populacija crvenokljune čigre u cijeloj Europi bilježe i brojna druga istraživanja (Sruoga i sur. 2006, Szczys i sur. 2017). Ipak, smanjenje brojnosti vrste na nekom lokalitetu ne mora uvijek imati isključivo negativnu konotaciju. Pojam metapopulacije uključuje stalni protok gena zahvaljujući imigracijama i emigracijama jedinki različitih populacija. Odnosno, jedinke ili pak više njih, nastanjuju za njih povoljnija područja kada za to osjete potrebu. S tim na umu, smanjenje brojnosti populacije ne mora automatski značiti da je ista u opasnosti, nego se dio članova potencijalno samo premjestio na drugi lokalitet (Szczys i sur. 2017). Takvu povezanost ili pak diferencijaciju populacija iste vrste moguće je utvrditi isključivo molekularno - genetičkim metodama, a utvrđivanje istih iznimno je važno i kako bi se ispravno definirale jedinice upravljanja (Sruoga i sur. 2006). Unatoč tome što se crvenokljuna čigra prema IUCN-u (eng. *International Union for Conservation of Nature*) uvrštava u skupinu najmanje zabrinjavajućih (LC; eng. *Least Concern*) vrsta, njezina brojnost je uglavnom nepoznata i varira između različitih populacija. Ovo je tek drugo istraživanje raznolikosti kontrolne regije mitohondrijske DNA spomenute vrste, a prvo na populaciji čigre iz Njemačke. Prethodno istraživanje provedeno je na populacijama Slovenije i Hrvatske (Svetličić i sur. 2019).

1.2. Konzervacijska genetika

Posljednjih 30-ak godina metode molekularne biologije i genetička istraživanja dovela su do revolucije u ekološkim istraživanjima te su devedesetih godina prošlog stoljeća potaknule razvoj potpuno nove znanosti, molekularne ekologije (Freeland i sur. 2011). Dotadašnja istraživanja vezana uz klasifikaciju populacija temeljila su se uglavnom na fenotipskim karakteristikama, ponajviše onim vezanima uz ponašanje i morfološka svojstva (Bridge i sur. 2005). Međutim, ne postoji jednostavna korelacija između genotipa i fenotipa te je isti izuzetno podložan fenotipskoj plastičnosti pod utjecajem različitih ekoloških čimbenika. Danas je poznato da dvije srodne vrste, pa čak i iste, odvajanjem populacija, utjecajem jakog selekcijskog pritiska ili pak djelovanjem okolišnih čimbenika mogu do te mjere promijeniti fenotipska obilježja da ne bismo nikad mogli pretpostaviti da jedinke imaju bilo kakvu genetičku poveznicu. Jednako tako, dvije morfološki slične jedinke mogu biti predstavnici potpuno različitih vrsta. Upravo iz tog razloga, fenotipske karakteristike nisu pouzdan oslonac prilikom populacijskih istraživanja.

Važnu granu molekularne ekologije čini konzervacijska genetika, interdisciplinarna znanost koja primjenom molekularno - genetičkih tehnika nastoji pridonijeti cilju očuvanja i obnove bioraznolikosti. Uz procjene strukturiranosti populacija, fitnessa, križanja u srodstvu i hibridizacije, cilj konzervacijske genetike u konačnici je uvijek zaštita vrste. Svako narušavanje za vrstu važnih razina organizacije kao rezultat može imati smanjenu mogućnost adaptacije, a samim time i ugroziti njezin dugoročni opstanak. Upravo iz tog razloga važno je pratiti genetičku raznolikost jer nam može ukazati na ugroženost vrste. Posljedično, pravovremeno bismo mogli primijeniti eventualno potrebne korake za njezinu zaštitu (Freeland i sur. 2011).

Populacije koje pokazuju veću genetičku raznolikost lakše se nose s prirodnim prijetnjama, imaju veći potencijal adaptacije i izglednije preživljavanje. Istraživanja konzervacijske genetike bazirana su na varijabilnosti DNA na razini vrste, bilo da se radi o raznolikosti unutar iste populacije ili između različitih populacija (Van Dyke 2008). Jedan od izvora genetičke raznolikosti su mutacije do kojih dolazi, među ostalim, zbog svojstva DNA polimeraze koje kao posljedicu ima umetanje pogrešnog nukleotida (Cooper i Hausman 2004, Freeland i sur. 2011).

1.3. Molekularni markeri

Obzirom da se brojnost populacija crvenokljune čigre smanjuje diljem Europe, iznimno je važno istražiti ima li ono negativan utjecaj na genetičku raznolikost vrste (Sruoga i sur. 2006). S obzirom da prilikom genetičkih istraživanja uglavnom ne analiziramo čitave genome populacija, važno je odabrati njegove sastavnice koji će uspješno predstavljati puno veće dijelove genoma. Takvi visoko informativni, varijabilni dijelovi genoma nazivaju se molekularnim markerima. Upravo je varijabilnost ključna pri odabiru regije kao potencijalnog markera jer olakšava usporedbu jedinki i procjenu strukturiranosti populacije. Pored polimorfizma, važna je i konzerviranost pokrajnjih regija ciljnog lokusa koja omogućuje učinkovito vezanje početnica prilikom lančane reakcije polimerazom, PCR (od engl. *Polimerase Chain Reaction*) reakcije (Freeland i sur. 2011).

Svaki takav informativni dio genoma smatra se jednim lokusom, pri čemu on može, a i ne mora biti funkcionalni gen. Različite varijante, odnosno alternativni oblici istog gena ili lokusa nazivaju se alelima. Oni mogu nastati mutacijama, kao što je ranije navedeno, koje su glavni pokretač evolucije i raznolikosti živog svijeta. Pomoću takvih vrijednih informacija možemo otkriti različite podatke o vrsti kao što su: praćenje kretanja jedinki, procjena parenja u bliskom srodstvu, otkrivanje puteva širenja vrste kroz povijest, utvrđivanje populacijsko genetičke strukture, utvrđivanje demografskih oscilacija tijekom evolucijske prošlosti vrste, identifikaciju područja iz kojeg je potekla neka invazivna vrsta i brojne druge (Van Dyke 2008).

Svaki genom sadrži kodirajuće i nekodirajuće regije, odnosno ti termini nam govore podliježe li regija procesu transkripcije dajući u konačnici proteinski produkt. Kodirajući dijelovi genoma, odnosno geni koji kodiraju proteine, u većini slučajeva nisu korisni kao molekularni markeri. Obzirom da proteini imaju iznimno bitne zadaće u organizmu te je cilj takve vitalne funkcije održati očuvanima, kodirajući dijelovi genoma su pod utjecajem prirodne selekcije. Iz tog razloga kažemo da su oni evolucijski konzervirani. Svaka promjena za život važnog proteina kao rezultat bi imala poremećaj ili pak potpuni gubitak neke funkcije, što bi u konačnici dovelo do smrti jedinke. Posljedično možemo zaključiti da sekvence tih proteina ne pokazuju veliku varijabilnost između različitih populacija. Kao iznimka od takvog pravila ističu se geni MHC sustava, koji pokazuju iznimnu varijabilnost, te su zbog svoje specifičnosti posljednjih godina predmet brojnih istraživanja (Cooper i Hausman 2004, Freeland i sur. 2011).

Za genetička istraživanja na populacijama divljih životinja uglavnom se koriste neutralni genetički markeri. Takvi nekodirajući dijelovi genoma nisu izvor genetičke

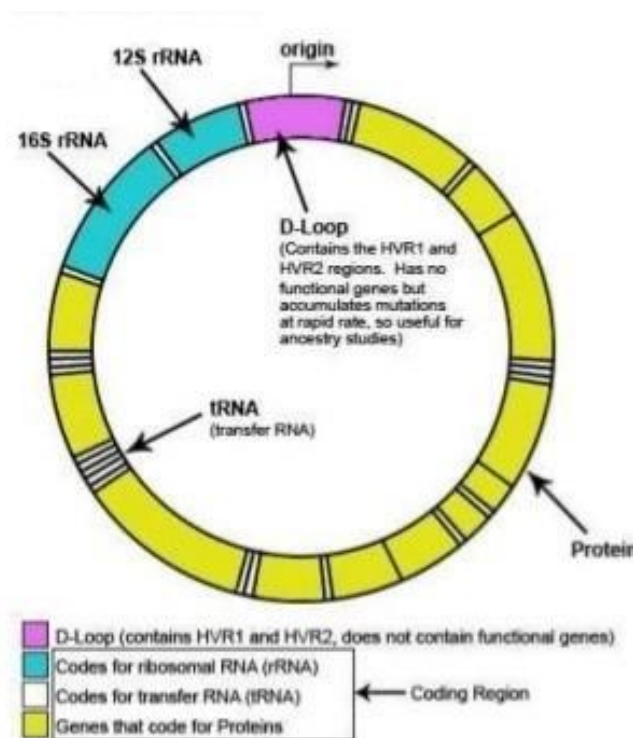
informacije i još uvijek im se ne zna točna uloga. Nadalje, njezine promjene i mutacije nemaju utjecaj na opstanak vrste te pretpostavljamo da uglavnom nisu kao takve podložne utjecaju prirodne selekcije, zbog čega je varijabilnost te regije veća. Njima pripadaju repetitivne sekvence poput mikrosatelita i kontrolna regija mitohondrijske DNA (Svetličić i sur. 2019, Cooper i Hausman 2004).

Mikrosatelitni lokusi su varijabilni dijelovi genoma te se kao markeri uspješno primjenjuju u ispitivanju genetičke strukture i raznolikosti populacija ptica. Spadaju u skupinu kodominantnih markera, odnosno pomoću njih je moguće odrediti je li ispitivana jedinka homozigot ili heterozigot. Ukoliko jedinka ima dvije kopije istog alela na promatranom lokusu zaključujemo da je ona homozigot, a jedinka čiji su aleli različitih duljina je heterozigot (Sruoga i sur. 2006). Neka od dosadašnjih istraživanja na populacijama crvenokljunih čigri koristila su upravo mikrosatelitske lokuse (Sruoga i sur. 2006, Szczys i sur. 2017). Druga nekodirajuća regija genoma važna za genetička istraživanja, korištena i tijekom analiza potrebnih za izradu ovog diplomskog rada, jest kontrolna regija mitohondrijske DNA.

1.3.1. Kontrolna regija mitohondrijske DNA

Mitohondriji su glavni kotači prilikom stvaranja energije kod eukariota. Pojednostavljena teorija kaže da se unutar tih staničnih odjeljaka procesom oksidativne fosforilacije stvara adenzin trifosfat (ATP, od engl. *adenosine triphosphate*), iz energije oslobođene razgradnjom ugljikohidrata i masnih kiselina (Cooper i Hausman 2004). Obavijeni su s dvije membrane međusobno odvojene međumembranskim prostorom, pri čemu je unutarnja naborana i tvori kriste koje strše u matriks organela. Unutar matriksa nalaze se sve genetički važne komponente, proteini, enzimi i transportne molekule važne za metaboličku aktivnost (Diez - Juan i Marin 2018). Eukarioti se smatraju svojevršnim genetičkim kimerama obzirom da mitohondriji imaju zaseban genetički materijal, različit od genoma jezgre stanice. Naslijeđen je vertikalno od arheobakterije roda *Rickettsia* koja je endosimbiozom unijela svoj genetički materijal u genom domaćina. Takvim endosimbiontskim posredstvom, mitohondriji su nastanili eukariotsku stanicu i pomiješali svoj genetički materijal s njom, što je bio izniman evolucijski korak (Diez - Juan i Marin 2018, Cooper i Hausman 2004). Genomi mitohondrija uglavnom su kružne dvolančane molekule, poput bakterijskih, a unutar citoplazme organela nalaze se u velikom broju kopija. Animalni mitohondrijski genom dug je 15 – 16 kb i kodira 2 gena za ribosomnu RNA (rRNA, od engl. *ribosomal ribonucleic acid*), 22 gena za transportnu RNA (tRNA, od engl. *transfer ribonucleic acid*) i 13 gena za proteine (Beebe i Rowe 2008).

No, iako im je stvaranje ATP - a daleko najvažnija funkcija, ono zbog čega su mitohondriji zanimljivi molekularnim ekolozima je nešto sasvim drugo. Od tih 15 – 16 kb mitohondrijskog genoma, otprilike 1000 bp zauzima kontrolna regija (Slika 2). Ono što kontrolnu regiju čini pogodnom za genetička i filogeografska istraživanja je činjenica da je ona nekodirajuća (Freeland i sur. 2011). Dakle, mutacije ove regije ne ugrožavaju jedinku pa su zbog toga i učestale, zbog čega je izrazito varijabilna i korisna za istraživanja strukturiranosti populacije. Pokrajnje regije, odnosno susjedne sekvence kontrolne regije, su konzervirane čime je osiguran i drugi važan preduvjet za odabir korisnog genetičkog markera. On osigurava pravilno vezanje početnica tijekom PCR reakcije, a početnicama radimo i svojevrstu selekciju, odnosno odabiremo specifične dijelove od interesa koje daljnjom analizom želimo istražiti, a to su upravo željeni lokusi. Također, kontrolna regija ima samo jednu kopiju koja se nasljeđuje po majčinskoj liniji pa je ta regija pogodna za istraživanja srodstva populacija temeljem majčinskog nasljeđivanja. Povezano s tim, prednost je i izostanak rekombinacije obzirom da se genetički materijal nasljeđuje isključivo od majke, što olakšava analize tijekom istraživanja (Freeland i sur. 2011).



Slika 2. Struktura mitohondrijske DNA (Izvor: SlideShare.net)

1.4. Dosadašnja molekularno-ekološka istraživanja crvenokljunih čigri

Genetička raznolikost populacije utječe na njezinu mogućnost adaptacija i samim time na dugoročni potencijal preživljavanja. Njezino praćenje, očuvanje i poduzimanje koraka zaštite onda kada je to potrebno, ključno je kako bi se populacija održala stabilnom. Razvojem molekularno - genetičkih metoda i same molekularne ekologije, omogućeno je kvantitativno praćenje i analiza genetičke raznolikosti populacija (Van Dyke 2008).

Neka od prvih genetičkih istraživanja na čigrama provedena su na alozimima iz uzoraka krvi i tkiva (Sruoga 2002) pri čemu je detektirana genetička raznolikost među kolonijama crvenokljune čigre s područja Litve. Procjenom populacijske strukturiranosti, među uzorcima prikupljenim na pet lokaliteta, utvrđena je prisutnost dvaju genskih skupova na tim područjima.

U većini istraživanja koja su uslijedila korišteni su nuklearni markeri poput mikrosatelitnih lokusa (Sruoga i sur. 2006, Szczys i sur. 2017), kod kojih su utvrđene značajnije genetičke raznolikosti crvenokljunih čigri s različitih lokaliteta. Sruga i sur. (2006) su tako istraživanjem mikrosatelitnih lokusa crvenokljune čigre s područja Litve utvrdili postojanje visoke razine genetičke raznolikosti. Međutim, istovremeno su zabilježili značajno odstupanje od Hardy - Weinbergove ravnoteže zbog velikog nedostatka heterozigota na šest od sedam lokacija uključenih u analizu. Pretpostavka je da su uzrok tome visoka stopa parenja u srodstvu i genski otklon.

Ona istraživanja koja su pak analizirala mitohondrijsku DNA, kao marker su koristila citokrom b (Bridge i sur. 2005, Szczys i sur. 2017). Pri tome, Szczys i sur. (2017) su svojim istraživanjem ispitivali povezanost metapopulacija crvenokljune čigre i njihovu povijesnu strukturiranost s ciljem zaštite vrste. Utvrđeno je kako su 1960-ih godina započele migracije populacija kopnenih čigri iz unutrašnjosti prema obalnim lokalitetima, dok migracije u obrnutom smjeru nisu zabilježene. Ta spoznaja je korisna za poduzimanje daljnjih koraka zaštite ove vrste. Citokrom b je kao marker manje varijabilan od kontrolne regije mitohondrijske DNA, no dugo vremena je korišten kao marker jer su za njega postojale univerzalne početnice (Beebee i Rowe 2008).

1.5. Cilj rada

Cilj ovog diplomskog rada je analizirati nukleotidne sljedove kontrolne regije mitohondrijske DNA populacije crvenokljune čigre iz Njemačke te utvrditi distribuciju i učestalost utvrđenih haplotipova. Pomoću tih podataka moći će se procijeniti razina genetičke raznolikosti i potencijalna strukturiranost populacija s dvije lokacije u Njemačkoj. Također, cilj je i usporediti haplotipove i razinu raznolikosti dobivene u ovom istraživanju s onima utvrđenim u populacijama Slovenije i Hrvatske, što će omogućiti dobivanje uvida u eventualnu povezanosti kontinentalnih populacija crvenokljune čigre u Europi te u konačnici pridonijeti njihovoj zaštiti.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorci perja

Za provođenje istraživanja u ovom diplomskom radu neinvazivnim metodama prikupljeno je 105 uzoraka pera crvenokljune čigre. Uzorci su prikupljeni na dva lokaliteta sa sjevera Njemačke: 40 uzoraka je prikupljeno s jezera Neuwarper, otok Riether Werder (53°42'22"N, 14°16'07" E), te 65 uzoraka s jezera Lieps (53°27'25.51"N, 13°9'50.26"E). Uzorke je prikupio dr. Thomas Hofmann. Uzorak pojedine jedinke se sastojao u prosjeku od 10 - 20 pera koji su bili pohranjeni u papirnoj kuverti i čuvani na sobnoj temperaturi.

2.2. Izolacija DNA

Izolaciju DNA provela sam pomoću *Dneasy Blood and Tissue Kit* (Promega). Najprije sam pripremila stalke i sterilne Eppendorf epruvete, označivši ih prema brojevima uzoraka uz dodanu jednu tubicu za kontrolu. Na taj način sam označila tri seta tubica. Zatim sam u 1,5 ml Eppendorf epruvete odpipetirala 180 µl ATL pufera. Nakon toga sam otvorila kuvertu s željenim uzorkom i iz nje sterilnom pincetom izvadila sva pera na podlogu od filter papira. Razdvojila sam ih iz grumena kako bih omogućila lakše rukovanje. Koristila sam otprilike 20 pera po uzorku i svakom peru sam škarama odstranila korijen pera pazeći da na njemu ne bude, ili pak da bude što manje, perja. Odstranjeni korijen pera zatim sam pincetom prenijela u označenu tubicu u kojoj se nalazio prethodno dodan ATL pufer. Nakon svakog odrađenog uzorka mijenjala sam podlogu od filter papira i rukavice, a škare i pincetu sterilizirala sam ispirući ih u varikini, vodi i alkoholu i zatim ih spaljivala na plamenu. Sve to s ciljem sprječavanja kontaminacije. Isti postupak ponavljala sam i s ostalim uzorcima. Zatim sam tubice stavila na prethodno ugrijani termoblok na 94°C i inkubirala uz 10 minutno treskanje. Nakon toga sam tubicu ohladila 5 minuta i centrifugirala ju 10 sekundi kako bi se sadržaj spustio na dno tubice. Potom sam dodala 20 µl proteinaze K u svaku tubicu. Stavila sam tubice na termoblok i inkubirala na 56°C uz treskanje do idućeg dana.

Nakon inkubacije, idući dan sam centrifugirala tubice 15 sekundi i odpipetirala tekućinu bez taloga u novi set tubica od 1,5 ml. Vorteksirala sam ih 15 sekundi kako bi se sadržaj dobro promiješao i potom dodala 200 µl pufera AL. Ponovno sam sve vorteksirala. Nakon toga sam oprezno, uzimajući u obzir viskoznost, dodala 200 µl hladnog etanola (96%), vorteksirala i potom kratko centrifugirala tubice kako bi se sadržaj spustio na dno. Zatim sam čitav sadržaj odpipetirala u kolonice i centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm. Bacila sam tubice s nečistoćama, pazeći pri tome da se sva tekućina iz kolonica spustila u tubice, a kolonice sam premjestila u

nove tubice od Promega kompleta. Potom sam u kolonice odpipetirala 500 µl AW1 pufera, centrifugirala 1 minutu na 8000 rpm i ponovno bacila tubice s nečistoćama, kolonice premjestila u čiste tubice od kompleta. Zatim sam odpipetirala 500 µl pufera za ispiranje AW2 (od engl. *Wash Buffer*) na kolonice i centrifugirala 3 minute na 14000 rpm. Bacila sam tubice s nečistoćama, a kolonice postavila u označeni treći set Eppendorf epruveta od 1,5 ml. Za kraj, odpipetirala sam 50 µl pufera za eluciju AE (od engl. *Elution Buffer*) na kolonice i inkubirala ih 2 – 5 minuta na sobnoj temperaturi. Centrifugirala sam tubice 1 minutu na 8000 rpm i potom bacila kolonice, a tubice s izoliranom DNA pohranila u frižer na 4°C.

2.3. Mjerenje koncentracije izolirane DNA

Mjerenje koncentracije izolirane DNA izvodila sam pomoću fluorimetra QFX Fluoremeter (DeNovix), prema protokolu proizvođača. Pri tome sam koristila komplet *DeNovix dsDNA Broad Range DNA Kit*. Kemikalije iz kompleta trebaju prije uporabe odstajati na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta u tamnoj vrećici navedenog kompleta.

Pripremila sam fluorometrijske tubice za broj uzoraka koji nam je potreban i označila ih. Označila sam i dvije dodatne tubice potrebne za dodatak standarda (0 i 200). Pripremila sam i jednu epruvetu za ukupni volumen radne otopine od 10 ml. U volumen radne otopine ubraja se potreban volumen pufera, pojačivača i boje, koji se izračuna ovisno o broju uzoraka kojima određujemo koncentraciju. Nakon što sam izračunala koliki mi je volumen svake pojedine komponente radne otopine potreban, odpipetirala sam u epruvetu od 10 ml prvo pufer, a zatim boju i pojačivač pazeći da ne ostaju na stijenkama epruvete. Radnu otopinu zatim sam dobro vorteksirala da se njezin sadržaj promiješa. Zatim sam u svaku fluorometrijsku tubicu pripremljenu za uzorke odpipetirala 199 µl radne otopine i 1 µl uzorka. U tubice standarda odpipetirala sam 190 µl radne otopine i 10 µl standarda. Dakle, ukupni volumen u svim fluorometrijskim tubicama treba biti 200 µl. Nakon pipetiranja, fluorometrijske tubice sam kratko vorteksirala. U fluorimetru sam prvo izmjerila koncentracije standarda 0 i 200 kako bi se prema njima izradila kalibracijska krivulja po kojoj uređaj zatim određuje nepoznate koncentracije uzoraka.

2.4. Lančana reakcija polimerazom

PCR reakcijom umnožila sam regiju od interesa, kontrolnu regiju mitohondrijske DNA, dugačke oko 800 bp. Pri tome sam koristila početnice SH-mtCR4F (AACACCCATCCAACCTCGGAA) i SH-mtCR4R (AATTTCACTGTCTGTTGACGTGT) (Svetličić i sur. 2019). Za svaku PCR reakciju, ovisno o broju uzoraka, pripremila sam u jednoj

tubici potreban volumen otopine *Master Mixa*, *Primer Mixa* i vode. U konačnici sam za svaku PCR reakciju koristila volumen početnica od 2,5 μ l (koncentracije 2 μ M), a konačni ukupni volumen je bio 25 μ l. Pored toga, volumen otopine *Master mixa* iznosio je 12,5 μ l, a volumen vode iznosio je 2,5 μ l ukoliko se radilo o uzorcima s izmjerenom niskom koncentracijom DNA, a 7,5 μ l ukoliko je uzorcima izmjerena visoka koncentracija DNA. Zatim sam, u tubice za PCR dodala 17,5 μ l te otopine kada se radilo o uzorcima s izmjerenom niskom koncentracijom DNA, a 22,5 μ l kada se radilo o uzorcima s visokom koncentracijom DNA. Potom sam u tubice za PCR dodavala i 7,5 μ l DNA željenog uzorka ukoliko se radilo o uzorku s izmjerenom niskom koncentracijom DNA, a 2,5 μ l ukoliko je uzorak imao izmjerenu visoku koncentraciju DNA. Dakle, za svaku PCR reakciju koristila sam ukupan volumen od 25 μ l. Od toga sam u daljnjim analizama 3,5 μ l koristila za elektroforezu kako bih provjerila uspješnost PCR reakcije, a ostatak volumena poslala sam na sekvenciranje.

2.5. Elektroforeza

Postupak elektroforeze provodila sam kako bih potvrdila prisutnosti PCR produkta. Nanosila sam 3,5 μ l PCR produkta na pripremljeni 1% agarozni gel. 1%-tni agarozni gel dobila sam otapanjem prethodno izvaganih 0,5 g agaroze u 50 ml 0,5 X TBE pufera. Smjesu sam zagrijavala na Bunsenovom plameniku sve do vrenja, dok nisam dobila čistu otopinu bez vidljivih zrnaca agaroze. U otopinu agara dodala sam 5 μ l SYBR®Safe boje. Otopinu sam izlila u kalup, potom sam provjerila da nisu nastali mjehurići zraka prilikom izlivanja, te sam postavila češalj za jažice. Ostavila sam gel da se ohladi 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon što se gel ohladio, u jažice sam dodala prethodno pomiješanih 3,5 μ l uzorka i 3,5 μ l pufera za nanošenje uzoraka u gel (*Blue Juice*). Proces elektroforeze odvijao se na naponu od 200V u vremenskom periodu od 30 minuta. Nakon elektroforeze promatrala sam gel pod UV svjetlom.

2.6. Sekvenciranje

Uspješno umnožene PCR uzorke slala sam na sekvenciranje u Macrogen servis, a sekvenciranje je obavljeno većinom iz jednog smjera, pomoću početnice SH-mtCR4F, dok je za dio uzoraka bilo provedeno i sekvenciranje iz drugog smjera, korištenjem početnice SH-mtCR4R.

2.7. Računalna obrada podataka

Za računalnu obradu podataka koristili smo programe BioEdit, DnaSP, PopART i Arlequin.

2.7.1. BioEdit

BioEdit (Hall 2011) jedan je od najčešće korištenih računalnih programa u istraživanjima nukleotidnih sljedova. Kao bioinformatički program, uglavnom se koristi za poravnanje i uređivanje sekvenci. Pored toga, nudi i brojne mogućnosti poput ručnog poravnanja sekvenci, obilježavanja i crtanja plazmida te naznačavanja restrikcijskih mjesta. Nakon što sam dobila rezultate sekvenciranja iz *GenBanka*, spremila sam ih na računalo i sekvence unijela u BioEdit. Ondje sam koristila opciju za poravnanje sljedova. Analizirana duljina slijeda iznosila je 710 bp.

2.7.2. DnaSP

DnaSP (od engl. *DNA Sequence Polymorphism*), računalni je program pomoću kojega određujemo razinu nukleotidnog polimorfizma među uzorcima. Nakon što sam poravnala sekvence u BioEditu, kopirala sam ih u Notepad i ondje ih prebacila iz .fasta u .meg format. Kao takve sam ih analizirala u DnaSP - u. Kao rezultat sam dobila brojnost, odnosno distribuciju haplotipova.

2.7.3. PopART

PopART (od engl. *Population Analysis with Reticulate Trees* (Leigh & Bryant 2015)), program je koji sam koristila za izračun i vizualizaciju povezanosti istraživanih haplotipova. Pomoću dobivenog shematskog prikaza mreže haplotipova vidljiva je učestalost haplotipova, kao i njihovo odvajanje, odnosno prisutnost mutacija koje su dovele do raznolikosti haplotipova.

2.7.4. Arlequin

Za kvantifikaciju genetičke diferencijacije između populacija koristila sam F-statistiku. Naime, pomoću računalnog programa Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier i Lischer 2010) sam procjenjivala vrijednosti F_{ST} (fiksacijske indekse) između svih parova populacija, u što sam osim dvije populacije iz ovog istraživanja uključila i tri populacije iz Hrvatske i Slovenije (Sava, Drava i Sečovlje) (Svetličić i sur. 2019). Vrijednosti F_{ST} se mogu kretati od 0 (koja ukazuje da populacijska struktura ne postoji) do 1 (koja ukazuje na to da su populacije potpuno genetički diferencirane). Smatra se da vrijednosti $> 0,2$ odražavaju snažno genetičko strukturiranje, premda i niže vrijednosti također mogu biti značajno različite od 0. Statistička značajnost se procjenjuje permutacijskim testovima (Beebe i Rowe 2008).

3. REZULTATI

3.1. Uspješnost sekvenciranja

Od ukupno 105 uzoraka, elektroferogrami dobiveni za 6 uzoraka (RW2, RW49, RW66, RW78, RW82 i RW105) nisu bili zadovoljavajuće kvalitete te nisu mogli biti uključeni u daljnje analize. Također, daljnjim analizama utvrđena je prisutnost duplikacija kod 4 uzorka (RW7, RW15, RW30 i RW98), te ni ti uzorci nisu uključeni u daljnju analizu. U konačnici, u daljnju obradu podataka uključila sam 95 uzoraka za koje sam dobila nukleotidne sljedove kontrolne regije mtDNA odgovarajuće kvalitete, od čega je s lokacije jezera Neuwarper bilo 35 uzoraka, a s lokacije jezera Lieps 60.

3.2. Distribucija haplotipova

Analizom odsječaka kontrolne regije mtDNA dugih 710 bp utvrđena je prisutnost 23 haplotipa unutar 95 jedinki. Od toga je 17 haplotipova zabilježeno na području jezera Neuwarper, a njih 13 na području jezera Lieps (tablica 1). Najučestaliji haplotipovi u populacijama čigri iz Njemačke jesu Stehi03 i Stehi12, pri čemu je Stehi03 dominantniji i pronađen je u čak 46% uzoraka. Također su prisutni i brojni haplotipovi koji su zabilježeni samo kod jedne jedinke, njih 13. Deset haplotipova je jedinstveno (privatno) za područje jezera Neuwarper, a 6 za jezero Lieps. Uzorci prikupljeni s dva istraživana lokaliteta međusobno dijele 7 haplotipova (Tablica 1).

Tablica 1. Učestalost haplotipova crvenokljune čigre s područja Njemačke. Brojevi prikazuju broj uzoraka za pojedini haplotip i populaciju, a u zagradi su navedene njihove identifikacijske oznake, odnosno učestalost pojave pojedinog haplotipa u ukupnom uzorku.

| <i>Haplotip</i> | <i>Jezero Neuwarper</i> <i>N = 35</i> | <i>Jezero Lieps</i> <i>N = 60</i> | <i>Ukupno</i> <i>N = 95</i> |
|-----------------|---|--|--------------------------------|
| <i>Stehi01</i> | 2 (RW3, RW9) | 5 (RW42, RW95, RW96, RW101, RW103) | 7 (7,37%) |
| <i>Stehi02</i> | 1 (RW33) | 1 (RW43) | 2 (2,11%) |
| <i>Stehi03</i> | 12 (RW12, RW13, RW19, RW20, RW22, RW24, RW27, RW34, RW35, RW36, RW37, RW39) | 32 (RW44, RW45, RW47, RW50, RW51, RW52, RW53, RW54, RW55, RW56, RW57, RW60, RW61, RW62, RW63, RW64, RW65, RW67, RW68, RW83, RW84, RW85, RW86, RW90, RW91, RW92, RW93, RW94, RW97, RW100, RW104, RW106) | 44 (46,32%) |
| <i>Stehi04</i> | 1 (RW25) | 2 (RW48, RW89) | 3 (3,16%) |
| <i>Stehi05</i> | / | 2 (RW70, RW80) | 2 (2,11%) |
| <i>Stehi06</i> | 1 (RW31) | 5 (RW41, RW46, RW58, RW72, RW99) | 6 (6,32%) |
| <i>Stehi11</i> | 5 (RW6, RW14, RW17, RW32, RW40) | / | 5 (5,26%) |
| <i>Stehi12</i> | 2 (RW5, RW29) | 7 (RW59, RW71, RW74, RW76, RW79, RW87, RW88) | 9 (9,47%) |
| <i>Stehi14</i> | / | 1 (RW73) | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi16</i> | 1 (RW18) | / | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi18</i> | 1 (RW10) | / | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi22</i> | 1 (RW4) | / | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi23</i> | 1 (RW8) | / | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi24</i> | 1 (RW11) | / | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi25</i> | 1 (RW16) | / | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi26</i> | 1 (RW21) | 1 (RW102) | 2 (2,11%) |
| <i>Stehi27</i> | 1 (RW23) | / | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi28</i> | 1 (RW26) | / | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi29</i> | 2 (RW28, RW38) | / | 2 (2,11%) |
| <i>Stehi30</i> | / | 1 (RW69) | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi31</i> | / | 1 (RW75) | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi32</i> | / | 1 (RW77) | 1 (1,05%) |
| <i>Stehi33</i> | / | 1 (RW81) | 1 (1,05%) |

3.3. Genetička raznolikost

Ukupna haplotipska raznolikost iznosi 0,7682, a nukleotidna raznolikost 0,00178 (Tablica 2). Ukoliko zasebno uspoređujemo populacije s dvaju lokaliteta, svi indeksi raznolikosti viši su kod populacije s jezera Neuwarper, mada je veličina tog uzorka značajno manja (N=35). Tako njihova haplotipska raznolikost iznosi 0,86723, a nukleotidna 0,00228. Nasuprot tome, populacija s jezera Lieps (N=60) pokazuje haplotipsku raznolikost od 0,69548, a nukleotidnu od 0,00148. Raspon mutacija koji je doveo do raznolikosti haplotipova kreće se od jedne do šest mutacija (slika 3), dok je srednji broj razlika između pojedinih parova haplotipova (k) u ove dvije populacije iznosio 1,11751 i 1,72437.

Tablica 2. Genetička raznolikost populacija čigri s područja Njemačke.

| <i>Populacija</i> | <i>N</i> | <i>H</i> | <i>Hd</i> | π | <i>k</i> | <i>S</i> |
|-------------------------|----------|----------|-----------|---------|----------|----------|
| <i>Jezero Neuwarper</i> | 35 | 17 | 0,86723 | 0,00228 | 1,72437 | 12 |
| <i>Jezero Lieps</i> | 60 | 13 | 0,69548 | 0,00148 | 1,11751 | 9 |
| <i>Ukupno</i> | 95 | 23 | 0,7682 | 0,00178 | 1,34289 | 14 |

N – broj jedinki, H – broj haplotipova, Hd – haplotipska raznolikost, π – nukleotidna raznolikost, k – srednji broj razlika između parova haplotipova, S – broj polimorfni mjesta.

Ukupan broj varijabilnih (polimorfni) mjesta iznosi 14, s time da kod jedinki s jezera Neuwarper iznosi 12, a kod onih s jezera Lieps ukupno 9 (tablica 2). Kod svih zabilježenih supstitucija radilo se o tranziciji, odnosno zamjeni purinskog nukleotida drugim purinom, ili pak zamjeni pirimidinskog nukleotida drugim pirimidinom. Pored toga, utvrđena je i jedna insercija timina na 41. poziciji kod četiri haplotipa (RW23, RW24, RW31, RW33), a kraj istraženog fragmenta pokazao se potpuno nepolimorfni s obzirom da od 573. nukleotidnog mjesta do 710. nije nađeno niti jedno varijabilno nukleotidno mjesto (Tablica 3).

Tablica 3. Varijabilna nukleotidna mjesta istraživanog fragmenta kontrolne regije mtDNA dugog 710 bp. Brojevi u prvom retku označavaju poziciju nukleotida.

| <i>Haplotip</i> | 3 | 5 | 18 | 41 | 76 | 93 | 96 | 99 | 130 | 265 | 408 | 474 | 482 | 573 |
|-----------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>Stehi01</i> | G | A | T | - | A | C | C | A | G | A | G | C | G | T |
| <i>Stehi02</i> | . | G | . | - | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi03</i> | . | . | . | - | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi04</i> | . | . | . | - | . | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi05</i> | . | G | . | - | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi06</i> | . | . | . | - | . | T | T | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi11</i> | . | . | . | - | . | . | T | . | . | . | . | T | . | . |
| <i>Stehi12</i> | . | . | . | - | . | . | T | . | A | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi14</i> | . | . | . | - | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi16</i> | . | G | . | - | . | . | T | . | A | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi18</i> | . | . | . | - | . | . | T | G | A | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi22</i> | A | . | . | - | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi23</i> | . | G | . | T | G | . | T | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi24</i> | . | . | . | T | . | . | T | . | A | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi25</i> | . | G | . | - | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi26</i> | . | . | . | - | . | . | T | . | A | . | . | . | A | . |
| <i>Stehi27</i> | . | . | . | - | . | . | T | . | . | G | . | . | . | . |
| <i>Stehi28</i> | . | . | C | - | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi29</i> | . | . | . | - | . | T | T | . | A | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi30</i> | . | . | . | - | . | . | T | . | . | . | A | . | . | . |
| <i>Stehi31</i> | . | . | . | T | . | . | T | G | A | . | . | . | . | . |
| <i>Stehi32</i> | . | . | . | - | . | . | T | . | . | . | . | . | . | A |
| <i>Stehi33</i> | . | G | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |

3.4. Usporedba populacija s područja Njemačke s populacijama iz Hrvatske i Slovenije

Uspoređujemo li genetičku raznolikost čigri uključenih u ovo istraživanje s onima iz Hrvatske i Slovenije, veću raznolikost pokazuju crvenokljune čigre s područja Hrvatske i Slovenije. To pogotovo možemo zaključiti uzmemo li u obzir da je istraživanjem Svetličić i sur. (2019) utvrđena prisutnost 21 haplotipa u svega 60 uzorkovanih jedinki dok su 23 haplotipa zabilježena ovim istraživanjem koje je uključivalo čak 95 jedinki. Jednako tako, i haplotipska i nukleotidna raznolikost u istraživanju Svetličić i sur. (0,8599, odn. 0,0025) veće su od onih utvrđenih ovim istraživanjem (0,7682, odn. 0,00178) (Tablica 4).

Tablica 4. Usporedba indeksa raznolikosti čigri s područja Njemačke s onima uključenih u istraživanje na područja Hrvatske i Slovenije (Svetličić i sur. 2019).

| <i>Skupina populacija</i> | <i>N</i> | <i>H</i> | <i>Hd</i> | <i>π</i> |
|--|----------|----------|-----------|----------|
| <i>Područje Njemačke</i> | 95 | 23 | 0,7682 | 0,00178 |
| <i>Područje Hrvatske i Slovenije</i> | 60 | 21 | 0,8599 | 0,0025 |

N – broj analiziranih jedinki, H – broj haplotipova, Hd – haplotipska raznolikost, π – nukleotidna raznolikost.

Čigre s područja Njemačke dijele 11 haplotipova s populacijama čigri Hrvatske i Slovenije. U istraživanju koje su proveli Svetličić i sur. (2019), utvrđena je prisutnost 21 haplotipa (Stehi01 - Stehi21), od kojih se 11 pojavljuje i u populacijama čigri iz Njemačke (Tablica 5). Nadalje, kako kod ovog istraživanja, tako i kod istraživanja provedenog od strane Svetličić i sur. (2019), najučestaliji haplotip je Stehi03. Dok se u populaciji crvenokljune čigre s područja Njemačke on javlja u 46% slučajeva (12,63% jezero Neuwarper i 33,68% jezero Lieps), u populaciji s područja Hrvatske i Slovenije taj haplotip se javlja u 35% slučajeva (23,33% kontinentalna populacija i 11,67% morska populacija) (tablica 5). Čigre iz Njemačke pokazuju 12 privatnih haplotipova, dok čigre iz Hrvatske i Slovenije pokazuju 10 privatnih haplotipova, odnosno od 33 ukupno nađena haplotipa, njih čak 2/3 (22) je privatno za pojedino područje.

Tablica 5. Usporedba učestalosti haplotipova između dvaju populacija crvenokljunih čigri s područja Njemačke i dvaju populacija s područja Hrvatske i Slovenije.

| <i>Haplotipovi</i> | <i>Jezero Neuwarper N=35</i> | <i>Jezero Lieps N=60</i> | <i>Populacija rijeka Save i Drave N=51</i> | <i>Populacija sa Sečovlja N=9</i> |
|--------------------|----------------------------------|------------------------------|--|---|
| <i>Stehi01</i> | 2 (2,11%) | 5 (5,26%) | 5 (8,33%) | 1 (1,67%) |
| <i>Stehi02</i> | 1 (1,05%) | 1 (1,05%) | 4 (6,67%) | / |
| <i>Stehi03</i> | 12 (12,63%) | 32 (33,68%) | 14 (23,33%) | 7 (11,67%) |
| <i>Stehi04</i> | 1 (1,05%) | 2 (2,11%) | 3 (5%) | / |
| <i>Stehi05</i> | / | 2 (2,11%) | 4 (6,67%) | / |
| <i>Stehi06</i> | 1 (1,05%) | 5 (5,26%) | 2 (3,33%) | / |
| <i>Stehi07</i> | / | / | 3 (5%) | / |
| <i>Stehi08</i> | / | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi09</i> | / | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi10</i> | / | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi11</i> | 5 (5,26%) | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi12</i> | 2 (2,11%) | 7 (7,37%) | 3 (5%) | / |
| <i>Stehi13</i> | / | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi14</i> | / | 1 (1,05%) | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi15</i> | / | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi16</i> | 1 (1,05%) | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi17</i> | / | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi18</i> | 1 (1,05%) | / | / | 1 (1,67%) |
| <i>Stehi19</i> | / | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi20</i> | / | / | 2 (3,33%) | / |
| <i>Stehi21</i> | / | / | 1 (1,67%) | / |
| <i>Stehi22</i> | 1 (1,05%) | / | / | / |
| <i>Stehi23</i> | 1 (1,05%) | / | / | / |
| <i>Stehi24</i> | 1 (1,05%) | / | / | / |
| <i>Stehi25</i> | 1 (1,05%) | / | / | / |
| <i>Stehi26</i> | 1 (1,05%) | 1 (1,05%) | / | / |
| <i>Stehi27</i> | 1 (1,05%) | / | / | / |
| <i>Stehi28</i> | 1 (1,05%) | / | / | / |
| <i>Stehi29</i> | 2 (2,11%) | / | / | / |
| <i>Stehi30</i> | / | 1 (1,05%) | / | / |
| <i>Stehi31</i> | / | 1 (1,05%) | / | / |
| <i>Stehi32</i> | / | 1 (1,05%) | / | / |
| <i>Stehi33</i> | / | 1 (1,05%) | / | / |

F_{ST} vrijednost procijenjena između grupe populacija iz Njemačke i grupe populacija iz Hrvatske i Slovenije iznosila je 0,00512 i nije bila statistički značajna ($p=0,172$). Vrijednosti F_{ST} procijenjene za sve parove populacija iz Njemačke, Slovenije i Hrvatske prikazane su u Tablica 6. Zanimljivo je istaknuti da su one najviše između Sečovlja, koje je morska kolonija,

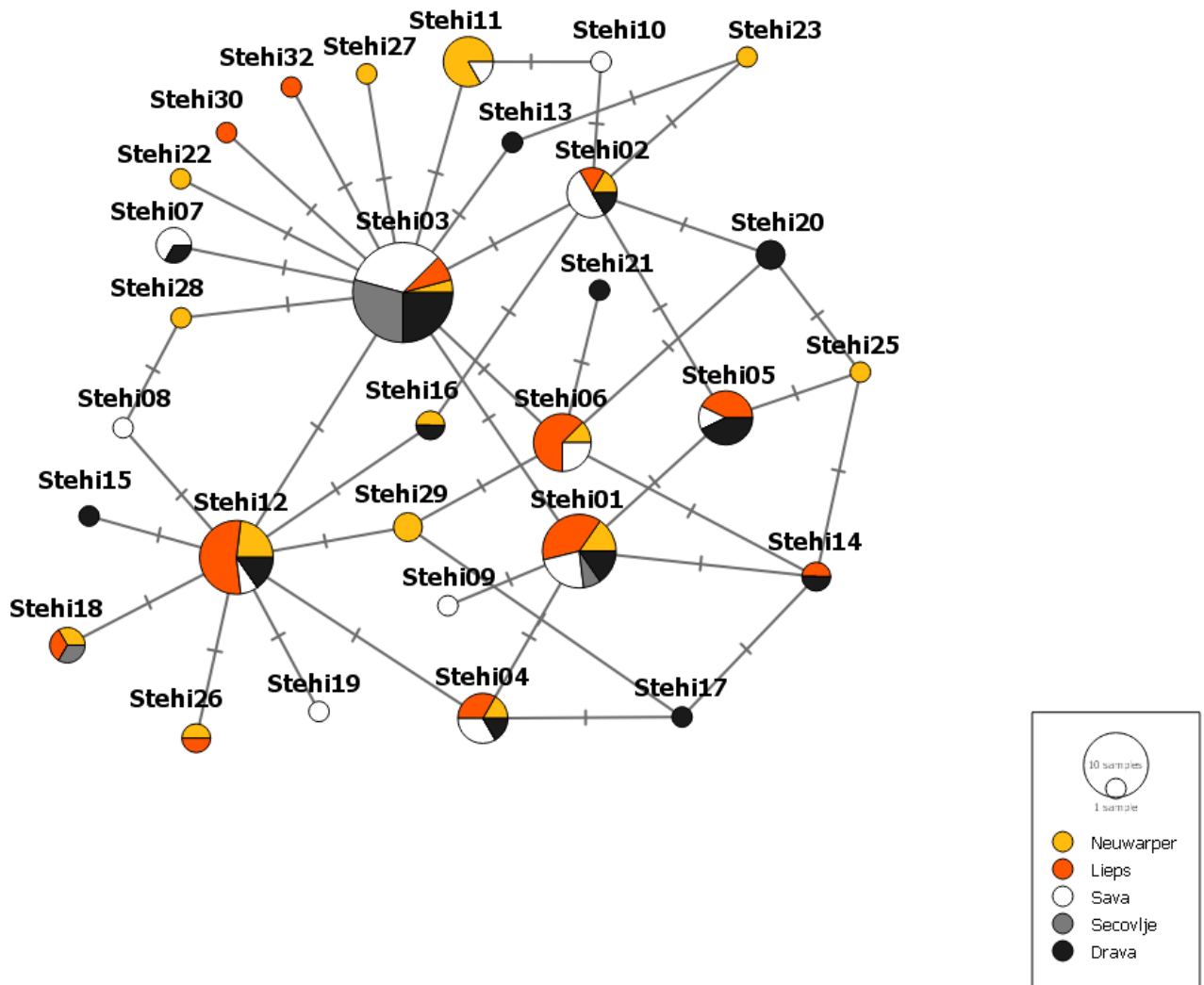
i Save, odnosno Drave (iznose oko 10%), dok su one između Sečovlja i obje njemačke populacije puno niže i statistički nisu značajne. Jedina druga populacija koja pokazuje značajne vrijednosti je populacija s jezera Lieps, koja ima dosta niske vrijednosti kad se uspoređuje sa svim ostalim populacijama, no one su statistički značajne za usporedbu s populacijom Save, Drave i Neuwarper. F_{ST} vrijednost procijenjena između populacije s jezera Neuwarper i one jezera Lieps dosta je niska (iznosi 0,02708), ali je statistički značajna.

Tablica 6. Vrijednosti F_{ST} procijenjene za parove populacija iz Njemačke, Slovenije i Hrvatske. Statistički značajne vrijednosti su otisnute podebljanim brojevima ($p < 0,05$).

| | <i>Sava</i> | <i>Drava</i> | <i>Sečovlje</i> | <i>Neuwarper</i> |
|------------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|
| <i>Sava</i> | - | - | - | - |
| <i>Drava</i> | -0,01230 | - | - | - |
| <i>Sečovlje</i> | 0,09631 | 0,11969 | - | - |
| <i>Neuwarper</i> | -0,00404 | 0,00669 | 0,07442 | - |
| <i>Lieps</i> | 0,03036 | 0,04555 | 0,00971 | 0,02708 |

3.5. Mreža haplotipova

Pomoću rezultata dobivenih u programima DnaSP i PopART izradila sam mrežu haplotipova koja nam shematski prikazuje njihovu povezanost. U takvoj mreži, veličina kruga proporcionalna je broju pripadajućih haplotipova, a različite boje označavaju različite populacije uključene u ovo istraživanje, a to je bilo svih pet do sada istraženih populacija (Jezero Neuwarper i jezero Lieps iz ovog istraživanja, te Sava, Drava i Sečovlje iz istraživanja Svetličić i sur. (2019)) (Slika 3). Prema tome, kao što je i ranije rečeno, vidimo da najveći broj jedinki ima haplotip Stehi03, te da taj haplotip dijele svih pet populacija. U značajno manjem broju pripadajućih jedinki slijede haplotip Stehi12 (dijele ga sve populacije osim Sečovlja) i Stehi01, koji je također pronađen u svim populacijama. Nadalje, crtice koje presijecaju linije sheme označavaju broj mutacija koje su dovele do raznolikosti između haplotipova, a u ovom slučaju kreću se od jedne do 6 mutacija. Konačno, haplotipovi su raspršeni bez uočljivog udruživanja prema geografskoj lokaciji populacija.



Slika 3. Mreža haplotipova čigri s područja Njemačke (jezero Neuwarper i jezero Lieps) i područja Hrvatske i Slovenije (Sava, Drava, Sečovlje), izrađen u programu PopART. Shematski prikaz povezanosti haplotipova i mutacija koje ih razdvajaju. Veličina kruga proporcionalna je učestalosti haplotipa. Različite boje omogućuju razlikovanje pojedinih populacija. Broj crtica koje presijecaju linije povezanosti označavaju broj mutacija između haplotipova. Na slici nedostaju haplotipovi Stehi24, Stehi31 i Stehi33 jer program zanemaruje pozicije s insercijom/delecijom (u ovom istraživanju to je 41. pozicija).

4. RASPRAVA

Kontrolna regija mtDNA iznimno je koristan izvor informacija o raznolikosti vrste. Obzirom da je nekodirajuća, nije pod utjecajem prirodne selekcije pa nudi podatke vezane uz demografske procese koji su korisni molekularnim ekolozima. Sama genetička raznolikost populacije može donekle biti pokazatelj njezinog adaptivnog potencijala jer se pretpostavlja da populacije s višom genetičkom raznolikošću se lakše nose s izazovima i novim uvjetima u kojima se nađu. Kao jedan od glavnih problema s kojima se suočavaju kopnene populacije crvenokljunih čigri ističe se devastacija njihovih prirodnih staništa. Uzrok tome je antropogeni utjecaj, točnije prilagodba riječnih tokova ljudskim potrebama, pri čemu se u većini slučajeva ne uzimaju u obzir potrebe biljnog i životinjskog svijeta koji nastanjuje ta područja. Na taj način nekontrolirano ispuštena voda putem sustava brana odnosi, ne samo gnijezda i staništa, nego i jaja i mlade ptiće (Becker i Ludwigs 2004, <https://en.m.wikipedia.org/wiki/Lieps>). Uz samu kontrolu sigurnosti i zaštite staništa crvenokljune čigre, potrebno je provesti i genetička istraživanja. Iako je ovo prvo istraživanje raznolikosti kontrolne regije mtDNA na čigramima s područja Njemačke, a tek drugo u cjelini, bilo bi poželjno da ih se u budućnosti provede više.

Istraživanjem provedenim u svrhu izrade ovog diplomskog rada utvrđivala sam raznolikost kontrolne regije mtDNA crvenokljune čigre s područja Njemačke. Svi uzorci prikupljeni su s dva kontinentalna lokaliteta, jezera Neuwarper i jezera Lieps. Od 105 uzoraka s kojima sam započela istraživanje, uspješno je izolirano i sekvencirano njih 95, što nam pokazuje na visoku uspješnost ovog istraživanja koja iznosi 90.48%. Tim više, uzmemo li u obzir da su se u ovom istraživanju koristila pera kao izvor DNA, odnosno neinvazivni uzorci. Za neinvazivno sakupljene uzorke karakteristično je da oni sadrže manju koncentraciju DNA koja je često niske kvalitete i kvantitete. DNA koja potječe od neinvazivno prikupljenih uzoraka može biti fragmentirana, odnosno željeni materijal je često puta djelomično raspadnut. U tom slučaju, nemoguće je uspješno umnožiti fragmentiranu željenu regiju DNA (Freeland i sur. 2011). Stoga ne iznenađuje što kod 6 uzoraka nisu dobiveni elektroferogrami iz kojih bi se jednoznačno mogli iščitati nukleotidni sljedovi te su stoga ti uzorci morali biti izbačeni iz daljnjih analiza. Kod preostala 4 uzorka je daljnjim analizama utvrđena prisutnost duplikacija, no obzirom da nisu pokazivale uniformnost, također sam ih isključila iz daljnjeg tijeka istraživanja. Potencijalne duplikacije kontrolne regije pojavile u niskom stupnju (4,21%) pa nemaju značajan utjecaj na konačne rezultate istraživanja. Uzrok takvim duplikacijama mtDNA mogu biti NumtS (eng. *Nuclear Mitochondrial Sequences*), ili pak pojava heteroplazmije. NumtS-ovi su posljedica procesa prijenosa fragmenata mtDNA u nuklearni genom, odnosno označavaju

prisutnost nuklearnih pseudogena (Arctander 1995). S druge strane, heteroplazmija kao pojava uzrokuje koegzistenciju mutirane mtDNA i one željenog tipa, pri čemu se iste razlikuju u svega jednom ili tek nekoliko nukleotida (Duan i sur. 2018, Gandolfi i sur. 2017). Takve pojave uzrok su odstupanja od pravila postojanja samo jedne željene sekvence, te su problematične prilikom istraživanja.

Istraživanjem je utvrđen velik broj haplotipova, njih 23, što ukazuje na relativno visoku haplotipsku raznolikost u ispitanom uzorku jedinki. To je slična razina raznolikosti nađena u ranije provedenom istraživanju Svetličić i sur. (2019), u kojem je određena prisutnost 21 haplotipa na uzorku od 60 crvenokljunih čigri s područja Hrvatske i Slovenije. S druge strane, haplotipska raznolikost je nešto veća od one određene istraživanjem vrste *Sterna fuscata*, u kojem je uočena prisutnost 18 haplotipa među 89 ispitivanih uzoraka (Peck i Congdon 2004).

Vrijednost ukupne haplotipske raznolikosti određene ovim istraživanjem je 0,7682, što je nešto manje od one zabilježene na istraživanju crvenokljunih čigri Hrvatske i Slovenije (Svetličić i sur. 2019), koja je iznosila 0,8599. Ipak, veća je od haplotipske raznolikosti zabilježene istraživanjem crvenokljune čigre s područja sjeveroistoka SAD - a i Kanade, gdje se raznolikost kretala između 0,21 do 0,77 (Szczyz i sur. 2017).

Nukleotidna raznolikost (π) manja je od one uočene istraživanjem na crvenokljunim čigramama s područja Hrvatske i Slovenija (Svetličić i sur. 2019), koja je iznosila 0,0025. Veća nukleotidna raznolikost zabilježena je i istraživanjem vrste čigre *Gelochelidon nilotica*, tijekom kojega je analizom citokroma b utvrđena njena vrijednost u rasponu od 0,0019 – 0,0035 (Miller i sur. 2013). S druge strane, istraživanje na ranije spomenutoj vrsti čigre *Sterna fuscata* pokazalo je manju vrijednost raznolikosti od one izmjerene u ovom istraživanju, iznoseći 0,0007 – 0,0016 (Peck i Congdon 2004).

Vrijednost k (srednji broj razlika između parova haplotipova) u ovom istraživanju iznosio je 1,34289, što je manje od onog procijenjenog u istraživanju na crvenokljunim čigramama s područja Hrvatske i Slovenije (Svetličić i sur. 2019), pri čemu je taj koeficijent nizak u oba slučaja i ukazuje na mali udio varijabilnih nukleotidnih mjesta između različitih haplotipova.

Najučestaliji haplotip u populacijama čigri iz Njemačke je Stehi03 i pronađen je u čak 46% uzoraka. Također, prisutni su i brojni haplotipovi koji su zabilježeni samo kod jedne jedinke, njih 13. Uzorci prikupljeni s ranije navedena dva lokaliteta međusobno dijele 7 haplotipova (tablica 1). U istraživanju provedenom na crvenokljunim čigramama s područja Hrvatske i

Slovenije utvrđena je prisutnost 21 haplotipa (Stehi01 - Stehi21), od kojih se 11 pojavljuje i u populacijama čigri iz Njemačke (tablica 5).

Uspoređujemo li međusobno samo uzorke prikupljene s jezera Neuwarper i jezera Lieps, iako ih je brojčano manje prikupljeno s jezera Neuwarper (35), oni pokazuju znatno veću raznolikost. Prateći veći trend raznolikosti, primjerice broj haplotipova među uzorcima s jezera Neuwarper iznosi 17 u odnosu na 13 s jezera Lieps, i svi ostali parametri bili su veći među populacijom s jezera Neuwarper (tablica 2). Nadalje, u uzorku populacije s jezera Neuwarper nađeno je sedam privatnih haplotipova (jedinstvenih za to područje, odn. nisu nađeni u drugim populacijama), dok su na jezeru Lieps nađena samo četiri privatna haplotipa. S obzirom da postoji mala, ali statistički značajna diferencijacija između populacija jezera Neuwarper i jezera Lieps (procijenjena vrijednostima F_{ST} , tablica 6), te uzimajući u obzir prisutnost jedinstvenih haplotipova karakterističnih samo za jedan od lokaliteta, možemo zaključiti da rezultati ukazuju na izvjesnu strukturiranost istraživanih populacija. Odnosno, jedinke s jezera Neuwarper i jezera Lieps donekle su genetički diferencirane. Iako udaljenost između te dvije kolonije iznosi svega 60 - ak kilometara, uzrok njihovih razlika potencijalno leži u različitim ekološkim uvjetima dvaju staništa. Lokalitet jezera Neuwarper bliži je Baltičkom moru te obalnim kolonijama, dok je jezero Lieps smješteno više u unutrašnjem, kontinentalnom dijelu Njemačke.

Također, obzirom da uzorci crvenokljunih čigri korištenih u ovom istraživanju dijele čak 11 haplotipova s istoimenom vrstom ispitivanom na području Hrvatske i Slovenije (Svetličić i sur. 2019), te vrijednost F_{ST} procijenjena između tih dvaju grupa populacija koja je izuzetno niska (iznosila je svega 0,00512) i nije bila statistički značajna, možemo zaključiti da postoji potencijalni protok gena i između ovih prostorno udaljenijih kolonija. Na to ukazuje i dobivena mreža haplotipova (slika 3) u kojoj je vidljivo da su haplotipovi raspršeni bez uočljivog prostornog udruživanja prema geografskoj lokaciji populacija. Razlog tomu može biti miješanje jedinki prilikom migracija i zimovanja u subtropskim i tropskim područjima.

Ovim istraživanjem utvrđena je visoka raznolikost kontrolne regije mtDNA crvenokljune čigre s područja Njemačke. Pri tome, izmjerena je viša razina raznolikosti među sjevernijom kolonijom s jezera Neuwarper, dok je među onom s jezera Lieps utvrđena nešto manja raznolikost. Te, ukupno gledano, visoke razine genetičke raznolikosti ukazuju na potrebu održavanja slatkovodnih staništa i šljunčanih sprudova koji predstavljaju glavna obitavališta slatkovodnih kolonija.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem biti će korisni u daljnjem proširivanju spoznaje o raznolikosti crvenokljune čigre. Nadalje, do sada provedenim istraživanjima genetičke raznolikosti crvenokljune čigre trebalo bi dodati i istraživanja nekih od nuklearnih markera, poput mikrosatelitnih lokusa, koji bi mogli biti pogodniji za istraživanja strukturiranosti populacija kao posljedice zbivanja u nedavnoj prošlosti. Pored istraživanja genetičke raznolikosti vrste koju smo proveli ovim istraživanjem, potrebno je pratiti i druge potencijalne razloge ugroženosti crvenokljunih čigri. Redovitim i pravilnim praćenjem bioloških, ali i genetičkih ugroza vrste osigurava se pravovremena mogućnost reagiranja i otklanjanja istih.

5. ZAKLJUČAK

U istraživanju provedenom na 95 jedinki crvenokljune čigre (*Sterna hirundo*) s područja Njemačke utvrđena je prisutnost od ukupno 23 haplotipa, pri čemu je haplotipska raznolikost iznosila 0,7682. Pronađena je niska nukleotidna raznolikost od 0,00178. Ona ukazuje na visoku sličnost haplotipova, odnosno da se isti razlikuju u svega nekoliko nukleotida.

Najučestaliji haplotip kojeg dijele obje populacije čigri iz Njemačke je Stehi03 i pronađen je u čak 46% uzoraka. Deset haplotipova je jedinstveno za područje jezera Neuwarper, a 6 za jezero Lieps, dok je 7 haplotipova zajedničko. Također, prisutni su i brojni haplotipovi koji su zabilježeni samo kod jedne jedinke, njih 13.

Postoji mala, ali statistički značajna diferencijacija između populacija jezera Neuwarper i jezera Lieps. Za razliku od toga, diferencijacija između grupe populacija iz Njemačke i grupe populacija iz Slovenije i Hrvatske izuzetno niska i nije statistički značajna, što ukazuje na međusobnu povezanost tih skupina populacija. Na to ukazuje i dobivena mreža haplotipova na kojoj je vidljivo da su haplotipovi raspršeni bez uočljivog prostornog udruživanja.

6. LITERATURA

- Arctander, P. (1995) Comparison of a Mitochondrial Gene and a corresponding Nuclear Pseudogene. *Biological Sciences* 2: 13-14.
- Becker, P. H., Ludwigs, J. D. (2004) Common Tern (*Sterna hirundo*). *BWP Update* 6: 9-137.
- Beebe T., Rowe G. (2008) *An introduction to molecular Ecology*. 2nd Edition, Oxford University Press.
- Bridge, E. S., Jones, A. W., Baker, A. J. (2005) A phylogenetic framework for the terns (Sternini) inferred from mtDNA sequences: implications for taxonomy and plumage evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 459-469.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2004) *Stanica - Molekularni pristup: Osnove molekularne biologije*. Medicinska naklada, Zagreb.
- Diez – Juan, A., Marin, C. (2018) *Mitochondria and Embryo Viability: Genetics and Epigenetics*. Elsevier Inc. 9: 222-230.
- Duan, M., Tu, J., Lu, J. (2018) Recent Advances in Detecting Mitochondrial DNA Heteroplasmic Variations. *Molecules* 4: 1-4.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 564-567.
- Freeland, J. R., Kirk, H., Petersen, S. D. (2011) *Molecular Genetics in Ecology*. *Molecular Ecology*. Drugo izdanje. Wiley - Blackwell, Oxford, str. 244-245.
- Freeland, J. R., Kirk, H., Petersen, S. D. (2007) *Molecular Markers in Phylogeography*. *Molecular Ecology*. Drugo izdanje. Wiley - Blackwell, Oxford, str. 225-230.
- Gandolfi, A., Crestanello, B., Fagotti, A., Simoncelli, F., Chiesa, S., Girardi, M., Giovagnoli, E., Marangoni, C., Di Rosa, I., Lucentini, L. (2017) New Evidences of Mitochondrial DNA Heteroplasmy by Putative Paternal Leakage between the Rock Partridge (*Alectoris gracea*) and the Chukar Partridge (*Alectoris chukar*). *Plos One* 2: 1-2.

- Hall, T. (2011) BioEdit: An important software for molecular biology, GEF Bulletin of Biosciences 2: 60-61.
- Köppen, U. (2001) Brutbestände der Küstenvögel in Schutzgebieten Mecklenburg-Vorpommerns in den Jahren 1999 und 2000. Seevögel 38, 24-61.
- Kumar, S., Srecher, G., Li M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular Biology & Evolution 35 (6): 1547-1549.
- Miller, M., P., Mullins, T., D., Haig, S., M. (2013) Genetic Structure Diversity and Subspecies Status of Gull-billed Terns (*Gelochelidon nilotica*) from the United States. Waterbirds 36: 310-318.
- Peck, D., R., Congdon, B., C. (2004) Reconciling historical processes and population structure in the sooty tern *Sterna fuscata*. Journal of Avian Biology 35: 327-335.
- Seitz, J., Dallmann, K., Kuppel, T. (2003): Die Vögel Bremens und der angrenzenden Flussniederungen – Fortsetzungsband 1992-2002. BUND-Bremen 38: 24-61.
- Sudmann, S. R., Boschert, M., Zintl, H. (2003) Hat die Flusseeeschwalbe (*Sterna hirundo*) an Flüssen noch eine Überlebenschance? Charadrius 10: 48-57
- Sruoga, A., Butkauskas, D., Prakas, P., Paulauskas, A. (2006) Evaluation of the genetic structure of the breeding Common Tern (*Sterna hirundo*) population by means of microsatellite markers. -Biologija 6: 47-52.
- Szczys, P., Oswald S. A., Arnold, J. M. (2017) Conservation implications of long-distance migration routes: Regional metapopulation structure, asymmetrical dispersal, and population declines. -Biological Conservation 209: 263-272.
- Svetličić, I., Kralj, J., Martinović, M., Tome, D., Basle, T., Božić, L., Škornik, I. Jurinović, L., Galov, A. (2019) Mitochondrial DNA control region diversity in Common Terns *Sterna hirundo* from Slovenia and Croatia. Acrocephalus 40: 69-78.
- Van Dyke, F. (2008) Genetic diversity – Understanding Conservation at Genetic Levels. Conservation Biology 32: 153-184.
- Vrezec, P. V., Kralj, J., Martinović, M. (2018) Čigra. Svijet ptica 43: 3-21.

Weber, M., Mammen, U., Dornbusch, G., Gedeon, K. (2003): Die Vogelarten nach Anhang I der Europäischen Vogelschutzrichtlinie im Land Sachsen-Anhalt. – Naturschutz im Land Sachsen-Anhalt. Sonderheft 4: 59-62

WEB IZVORI

https://www.allaboutbirds.org/guide/Common_Tern/id

<https://www.slideshare.net/aurelianalexander/organelle-dna>

https://en.wikipedia.org/wiki/Common_tern

<https://en.m.wikipedia.org/wiki/Lieps>

ŽIVOTOPIS

Marija Grgurević

Obrazovanje

- 2015. godine završila sam srednjoškolsko obrazovanje u Općoj gimnaziji Matija Mesić, Slavonski Brod
- 2018. godine završila sam preddiplomski studij Biologije, modul Kemije na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i stekla titulu Sveučilišnog prvostupnika (*baccalaurea*) biologije
- 2018. godine upisala sam Diplomski studij Eksperimentalna biologija, modul Fiziologija i imunobiologija, na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu u Zagrebu

Profesionalno iskustvo

- Potvrda o položenom tečaju za osposobljavanje osoba koje rade s laboratorijskim životinjama, A kategorija, dodjeljuje Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno - matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Potvrda o aktivnom sudjelovanju na Tjednu mozga, dodjeljuje Medicinski fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera
- Sudjelovanje na simpoziju studenata bioloških usmjerenja, Zagreb

Ostala znanja i vještine

Računalne vještine

- Vješta u svim Microsoft Office™ programima (Word™, Excel™ and PowerPoint™)
- BioEdit Sequence Alignment Editor
- Vješta u internetskom pretraživanju

Radne osobine

- Odgovorna, pouzdana, dobrih organizacijskih sposobnosti, komunikativna, pedantna, spremna raditi u timu kao i preuzeti inicijativu onda kada je to potrebno, uvijek voljna naučiti nešto novo, bez problema se prilagođavam novim uvjetima rada.

Jezici

- Hrvatski

Materinski jezik

- Engleski

Čitanje i razumijevanje C1 kategorija, govor B2 kategorija

- Njemački

Dobro znanje, učen 9 godina tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja