



SEQUENCE VARIATION IN THE CONTROL REGION OF MITOCHONDRIAL DNA WITHIN A POPULATION SAMPLE OF DOMESTIC CATS *FELIS CATUS* LINNAEUS – IMPLICATIONS FOR DOMESTIC AND WILD CATS DIFFERENTIATION*

Wojciech BRANICKI¹, Agnieszka OLSZAŃSKA², Maciej K. KONOPIŃSKI²

¹ *Institute of Forensic Research, Krakow, Poland*

² *Institute of Nature Conservation, Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland*

Abstract

The aim of this study was to assess the genetic variation of a portion of the mitochondrial control region in *Felis catus* and to check the possibility of using this region for species differentiation between domestic cats and wildcats *Felis silvestris*. Our results indicate that there is low variation among cats within the analysed mitochondrial fragment with one very common (above 70%) and ten rare haplotypes. Analysed wildcat samples revealed rare haplotypes belonging to a separate clade of the constructed phylogenetic tree compared with the most popular haplotype.

Key words

Wildlife forensic; *Felis catus*; *Felis silvestris*; Mitochondrial DNA; Control region; Population genetics.

Received 17 November 2006; accepted 4 December 2006

1. Introduction

Wildlife forensics is a new and fast developing area in forensic science. Typical physical evidence that is subjected to analysis by wildlife forensic laboratories usually comes from illegal hunting and smuggling of products of animal origin as well as other crimes against animals. The United Nations Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) obligates the justice system to protect endangered species. However, a fundamental problem linked to wildlife forensic studies is that a wide range of identification markers compatible with many different spe-

cies is needed. Moreover, sometimes it is necessary to distinguish between closely related species such as wolf and dog or cat and wildcat. The results of research that has been conducted on one endangered species – the European wildcat show that one of the significant threats to the wildcat is hybridisation with the domestic cat (*Felis catus* L.) [1, 3, 13, 16]. Moreover, the existence of “pure” wildcats is often questioned. Some researchers suggest that wildcats and domestic cats had lived in sympatry for thousands of years before the species was described by Schreber in 1775 [1]. Therefore, it is possible that introgression occurred a long time ago in the species history. Sumiński suggested, on the basis of morphological and biological features that pure-blood wildcats no longer exist in Europe, and thus present populations consist only of domestic cat-

* The project was supported by The State Committee for Scientific Research in Poland, No. 6P04A 076 20.

wildcat hybrids [20, 21]. It has been shown, however, that analysis of morphological features is not a reliable tool for wildcat/domestic cat differentiation [1, 3, 20]. Recently, Randi et al. found that wild and domestic cats living in Italy can be genetically distinguished and there is only a limited gene flow between sympatric populations of the domestic cat and wildcat [1].

In Poland, the species has been protected since 1952, but it is still considered a threatened species and included in the Polish Red Data Book of Animals [24]. In a survey carried out recently in Poland by Okarma et al. the occurrence of a putative wildcat was confirmed only for the Bieszczady Mountains, Pogórze Przemyskie, and Beskid Niski Mountains [14].

Taking into consideration the above information, a detailed study of the genetic variation within and between wild and domestic cats living in Poland is very important for wildcat conservation. This paper presents preliminary results of the research conducted.

Mitochondrial DNA (mtDNA) has been widely used as a genetic marker in population and evolutionary studies [e.g. 4, 15, 23]. Analysis of the fast evolving control region (CR) of mtDNA is particularly useful when closely related species are studied [22]. It is known, however, that the unambiguous sequencing of the most variable HV1 segment in felids may be extremely difficult due to repetitive sequences which are responsible for high heteroplasmy as reported by [4, 5]. The main objective of the present study was to assess molecular genetic variation in the *Felis catus* species using a portion of mtDNA control region sequence excluding troublesome repetitive motifs. The possible application of the method to wildcat and domestic cat differentiation useful in wildlife forensic studies is also discussed.

2. Materials and methods

2.1. Samples

We analysed samples from 58 domestic cats: from 29 individuals from the Krakow area and its surroundings collected in veterinary practices and from 29 animals belonging to inhabitants of the area of Pogórze Przemyskie and Beskid Niski. We also analysed blood samples and hairs collected from two wild cats living in Krakow Zoo (two male siblings, 3 years old), from one road killed wildcat (the animal had previously been caught and radio-collared), and one bone sample (tooth) from the Pogórze Przemyskie region. We also collected more samples from wildcat pelts, but due either to DNA extraction problems or contamination

with other DNAs, these data are not presented in this paper. DNA was extracted from blood, saliva, soft tissues, animal hairs and bone using the standard organic method [18]. Bone was crushed in liquid nitrogen using Freezer Mill 6750 apparatus (Glen Creston, UK). Samples were subjected to overnight digestion in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS, 39 mM DTT, 0.5 mg/ml proteinase K, followed by double phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction. DNA was quantified using a fluorimetric dye, PicoGreen (Molecular Probes, Netherlands), and Fluoroskan Ascent FL apparatus (Labsystems, Finland). Samples with a small amount of genetic material were additionally concentrated on Microcon 100 (Millipore, USA) concentrators.

2.2. DNA amplification

Using a sequence published in the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov; Ref. No. NC 001700) [10], we designed the following primers spanning a 277 bp fragment of the control region and a 34 bp fragment of gene coding proline t-RNA (between positions 589 and 889 according to the reference sequence):

- primer 1:
5' – CACGCGAACGCTTTAATTTAAG – 3';
- primer 2:
5' – TAGGCATTTTCAGTGCCTTGC – 3'.

The PCR reaction mixture was made up of 1.25 U Taq polymerase, 200 M dNTP, 1.25 M of each of the primers, 2.0 l 10 concentrated PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ (Fermentas, Lithuania or Promega, USA) and usually 1 l 10 ng of DNA for 20 l reactions.

Amplifications were performed in a GenAmp 9700 thermocycler (Applied). The reaction conditions were as follows: 2 min at 94°C – initial denaturation, 32 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 58°C, 40 s at 72°C and final elongation step for 10 min at 72°C. In the case of samples containing low amounts of DNA the number of cycles was increased to 36. The PCR products were verified by standard agarose gel electrophoresis in TBE buffer.

2.3. DNA sequencing

Amplification products were purified using a Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. Sequencing reactions were performed in a GenAmp 9700 thermocycler (Applied) using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 1.1 (Applied Biosystems, UK). 5 Sequencing Buffer (Applied Biosystems, USA) was used for dilution of the BigDye Terminator Ready

Reaction Premix. The reaction mixture consisted of 4 µl Ready Reaction Premix, 2 µl of 5' sequencing buffer, 3.2 pmol of PCR primer and about 30 ng of PCR products. Sequencing reactions were performed at 96°C for 10 s, 50°C for 5 s and 60°C for 2 min for 25 cycles. The sequencing products were analysed with an ABI 3100 capillary genetic analyser using a 36 cm long capillary set (rapid run module). The sequencing data were analysed with ABI Prism DNA sequencing analysis software version 3.7.

2.4. Phylogenetic analyses and statistics

Consensus sequences of all individuals, the GenBank reference sequence and the sequence of nuclear insert occurring in cats were aligned using the ClustalX program [6]. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 2.1 [9]. A phylogenetic neighbour-joining tree was generated by the MEGA program and with Kimura's two-parameter model, which assumes differences in transition/transversion rate. Genetic distances between all pairs of taxa were estimated using the same model.

Analyses of nucleotide variation were performed with the DnaSP, ver. 3.95 package [17]. Variation within a species was described as nucleotide diversity the average number of nucleotide differences be-

tween two sequences. Haplotype frequencies between the two populations of domestic cat were compared with the χ^2 test. Due to the small number of wildcat samples no interspecific analyses were performed. Genetic diversity for the analysed fragment was calculated according to $D = 1 - \sum p_i^2$, where p – frequencies of the observed haplotypes [7].

3. Results and discussion

The objective of this work was to evaluate the level of variation within a fragment of the control region of mitochondrial DNA characteristic for the domestic cat as well as to assess the possibility of differentiation between domestic cats and wildcats by means of sequence analysis of this marker. Table I gives a summary of the polymorphism in the locus studied. Site numbers refer to the reference sequence published in GenBank. The set of primers used in the study failed to amplify DNA of cats belonging to Persian and Siamese breeds (5 individuals). The appropriate PCR products are, however, generated from wildcat DNA. The constructed neighbour-joining tree reveals two distinct clades, one of which includes both analysed wildcat haplotypes. Because there was a risk of amplification of the nuclear insert of mitochondrial DNA which was reported to occur on chromosome D2 in

TABLE I. VARIABLE POSITIONS IN THE ANALYSED MTDNA FRAGMENT IN COMPARISON TO THE REFERENCE DOMESTIC CAT SEQUENCE PRESENT IN GENBANK WITH ACCESSION NUMBER NC_001700. FULL SEQUENCES ARE AVAILABLE IN GENBANK UNDER THE FOLLOWING ACCESSION NUMBERS: H1 – AY212232, H2 – AY212233, H3 – AY212234 and AY212243, H4 – AY212235, H5 – AY 212236, H6 – AY 212237, H7 – AY212238, H8 – AY212239, H9 – AY212240, H10 – 212242, H11 – AY212241

Haplotype	No. of individuals	Polymorphic sites													
		637	658	676	743	744	746	760	802	807	846	850	853	860	863
NC_001700		T	A	C	T	T	T	T	G	G	T	T	G	A	C
H1	39	.	.	A	C	C	C	.	.	.	C
H2	2	.	.	A	C	C	C	.	.	.	C	.	.	G	.
H3	3 + 2 (wildcat)	A	.	A	.	C	C
H4	3	A	.	A	.	C	.	.	.	A	C
H5	1	.	.	A	C	C	C	.	.	.	C	.	A	.	.
H6	1	.	G	A	C	C	C	.	.	.	C	.	.	G	.
H7	1	.	.	A	C	C	C	.	A	.	C
H8	0 + 1 (wildcat)	.	.	A	.	C	C	.	.	.	T
H9	1	.	.	A	.	C	C
H10	1	.	.	A	C	C	C	.	.	.	C	C	.	.	.
H11	1	.	.	A	C	C	C	C	.	.	C

cats [10], we compared our results with its sequence obtained from GenBank (Ref. no. U20754.1). The position of NuMt on the phylogenetic tree as well as minimum Kimura's distance much greater than the maximum distance between obtained sequences (0.0484 and 0.0203 respectively) clearly indicate that the analysed fragment is in fact the mitochondrial control region (Figure 1).

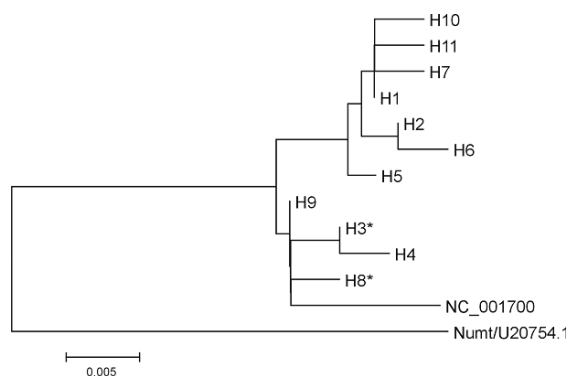


Fig. 1. Neighbour-joining tree of domestic and wildcat haplotypes based on 301 bp mtDNA fragment (277 bp of the control region and 34 bp fragment of a gene for t-RNA Pro). Location of wildcat haplotypes is indicated by an asterisk.

Among analysed domestic cats we found 10 different haplotypes (Figure 1). In *Felis catus* there were 10 nucleotide polymorphic sites (no indels) with 9 transitions and one transversion T → A (Table I). The Kimura distance between sequences ranged from 0.0033 (1 substitution) to 0.0203 (6 substitutions). Interestingly, our study did not reveal a haplotype identical with the reference sequence. The most common mitochondrial haplotype (H1) in the analysed part of mtDNA differs from the reference sequence in 5 nucleotide positions (Table I).

The frequency of haplotype H1 was similarly high for domestic cats from the Krakow area (76%) and for domestic cats from the Pogórze Przemyskie Landscape Park region (71%). The frequency of this haplotype did not differ significantly between the two study areas ($\chi^2 = 1.47$, $p = 0.23$ value calculated against other haplotypes). The summary of variation

within domestic cats populations is presented in Table II. Our results indicate that there is a low variation among cats within the analysed mitochondrial fragment, with one very common and nine rare haplotypes (Table I). The calculated genetic diversity of the marker equals $D = 0.43$.

Sequence analysis of the wildcats from Krakow Zoo revealed an identical haplotype (H8) in both samples, confirming the relation between the two individuals. Samples from Pogórze Przemyskie – both the road-killed wildcat and the skull sample possessed haplotype H3, which was also observed for 2 domestic cats from the Krakow area and 1 individual from the Pogórze Przemyskie region (Table I). The analysed samples collected from wildcats had rare haplotypes; however, we are aware that the very low number of analysed samples does not allow us to draw reliable conclusions. The haplotype identified as H8 is characteristic exclusively of wildcats from Krakow Zoo. The two haplotypes, one unique to wildcats (H8) and one to wild and domestic cats (H3), differ in two nucleotide positions, which indicates their common and close evolutionary ancestor sequence, as shown on the phylogenetic tree (Figure 1).

Research into genetic differentiation of wild and domestic cats has yielded conflicting results. Daniels et al. and Beaumont et al., on the basis of microsatellite data, suggest that the contemporary Scottish population of wildcats is a result of long-term interbreeding between wildcats and feral domestic cats, therefore no diagnostic test of a true wildcat based on genetic data can be proposed [1, 2]. Conversely, according to data published by Randi et al. (2001), all mtDNA haplotypes, with one single exception characteristic for wildcats and domestic cats in Italy, are completely separate for these two species. Data presented by Randi et al. for STR markers support the suggestion that wild and domestic cat species can be identified using genetic markers [16].

To conclude, the sequence variation determined in the analysed part of the CR characterising domestic cats is low. The analysed samples collected from wild cats revealed rare (H3) or unique (H8) haplotypes.

TABLE II. A SUMMARY OF VARIATION WITHIN DOMESTIC CAT POPULATIONS

Population	No. of samples analysed	No. of haplotypes	Haplotype diversity	
Kraków and surroundings	24	6	0.500	0.0039
Pogórze and Beskid Niski Mountains	29	7	0.429	0.0034
All	53	10	0.457	0.0036

These haplotypes are included in the common clade in the constructed phylogenetic tree. Evaluation of wildcats and their hybrids with domestic cats using the present mitochondrial marker should be verified by further studies covering a wider population of wildcats. On the basis of data published thus far, one could draw a conclusion that in order to distinguish between the two species more reliably, there is a need to expand the analysed mtDNA sequence as well as to study additional nuclear markers (e.g. STR). We showed, however, that the method is sensitive enough to enable analysis of a single tooth, hence the described methodology can be applied to material accessible in museums and we will be able to compare present and past variations in this locus. As this paper presents only preliminary data, further analysis and research must be performed in order to assess the “genetic picture” of Polish wildcats.

Acknowledgements

The authors would like to thank everyone who helped to collect cat samples analysed in this study. Special thanks in this matter, for providing samples from wildcats, are directed to the Executive of the Local Park and Zoological Garden in Krakow.

References

1. Beaumont M., Barratt E. M., Gottelli D. [et al.], Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat, *Molecular Ecology* 2001, 10, 319–336.
2. Daniels M. J., Balharry D., Kitchener A. C. [et al.], Morphological and pelage characteristics of wild living cats in Scotland: implications for defining the “wildcat”, *Journal of Zoology* 1998, 244, 231–247.
3. Daniels M. J., Beaumont M. A., Johnson P. J. [et al.], Ecology and genetics of wild-living cats in north-east of Scotland and the implications for the conservation of the wildcat, *Journal of Applied Ecology* 2001, 38, 146–161.
4. Eizirik E., Bonatto S. L., Johnson W. E. [et al.], Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, Felidae), *Journal of Molecular Evolution* 1998, 47, 613–624.
5. Fridez F., Rochat S., Coquoz R., Individual identification of cats and dogs using mitochondrial DNA tandem repeats?, *Science and Justice* 1999, 39, 167–171.
6. Higgins D. G., Sharp P. M., Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer, *Bioinformatics* 1989, 5, 151–153.
7. Jones D. A., Blood samples: probability of discrimination, *Journal of Forensic Science Society* 1972, 12, 355–358.
8. Kitchener A., The natural history of the wild cats, Comstock Publishing Associates, Ithaca 1991.
9. Kumar S., Tamura K., Nei M., MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software, *Briefings in Bioinformatics* 2004, 5, 150–163.
10. Lopez J. V., Cevario S., O’Brien S. J., Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (Numt) in the nuclear genome, *Genomics* 1996, 33, 229–246.
11. Menotti-Raymond M. A., O’Brien S. J., Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae, *Journal of Heredity* 1995, 86, 319–322.
12. Murphy W. J., Sun S., Chen Z. [et al.], A radiation hybrid map of the cat genome: implications for comparative mapping, *Genome Research* 2000, 10, 691–702.
13. Nowell K., Jackson P., Wild cats: status survey and conservation action plans, IUCN/SSC Cat Specialist Group, Gland 1996.
14. Okarma H., Śniezko S., Olszańska A., The occurrence of wildcat in the Polish Carpathian Mountains, *Acta Theriologica* 2002, 47, 499–504.
15. Pesole G., Sbisa E., Preparata G. [et al.], The evolution of the mitochondrial D-loop region and the origin of modern man, *Molecular Biology and Evolution* 1992, 9, 587–598.
16. Randi E., Pierpaoli M., Beaumont M. [et al.], Genetic identification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*) and their hybrids using Bayesian clustering methods, *Molecular Biology and Evolution* 2001, 18, 1679–1693.
17. Rozas J., Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis, *Bioinformatics* 1999, 15, 174–175.
18. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Press, New York 1989.
19. Stahl P., Artois M., Status and conservation of the wildcat (*Felis silvestris*) in Europe and around the Mediterranean rim. Council of Europe, Nature and Environment Series 1994, 69, 1–76.
20. Sumiński P., Badania nad formą krajową żbika (*Felis silvestris* Schreber) na tle jego rozmieszczenia geograficznego, *Folia Forestalia Polonica (A)* 1962, 8, 5–81.
21. Sumiński P., Zur Problematik der Unterschiede zwischen der Wildkatze, *Felis silvestris* Schreber, 1777 und der Hauskatze *Felis catus* Linné, 1758, *Säugetierkundliche Mitteilungen* 1977, 40, 236–238.
22. Vila C., Savolainen P., Maldonado J. E. [et al.], Multiple and ancient origins of the domestic dog, *Science* 1997, 276, 1687–1689.
23. Vila C., Amorim M., Leonard J. A. [et al.], Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*, *Molecular Ecology* 1999, 8, 2089–2103.

24. Wolsan M., Okarma H., Felis silvestris Schreber, 1775.
Zbik. [in:] Polish red data book of animals, Vertebrates,
Głowaciński Z. [red.], Państwowe Wydawnictwo
Rolnicze i Leśne, Warszawa 2001.

Corresponding author

Wojciech Branicki
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: wbranicki@ies.krakow.pl

ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA REGIONU KONTROLNEGO MITOCHONDRIALNEGO DNA W PRÓBIE POPULACYJNEJ KOTA DOMOWEGO (*FELIS CATUS* LINNAEUS) – PERSPEKTYWA ZASTOSOWANIA DO RÓŻNICOWANIA KOTA DOMOWEGO I ŻBIKA*

1. Wstęp

Badania sądowe prowadzone w celu ochrony przyrody to nowa, szybko rozwijająca się dziedzina wiedzy, włączana do szeroko rozumianych nauk sądowych. Typowy materiał dowodowy podlegający badaniom w laboratoriach sądowych powołanych dla potrzeb ochrony przyrody zazwyczaj pochodzi z nielegalnych polowań, handlu produktami pochodzenia zwierzęcego lub też z innego typu przestępstw wobec zwierząt. Firmowane przez Organizację Narodów Zjednoczonych porozumienie w sprawie międzynarodowego handlu towarami pochodzącymi z gatunków zagrożonych nakłada na wymiar sprawiedliwości obowiązek ochrony gatunków zagrożonych. Podstawowa trudność badań prowadzonych w celu ochrony przyrody związana jest z koniecznością stosowania wielu markerów identyfikacyjnych specyficznych dla odmiennych gatunków roślin i zwierząt. Ponadto nie rzadko istnieje potrzeba różnicowania pomiędzy gatunkami o dużym stopniu pokrewieństwa, jak na przykład wilk i pies czy też kot i żbik. Wyniki badań przeprowadzonych nad jednym z gatunków zagrożonych – żbikiem – pokazują, że jednym z istotnych zagrożeń dla tego gatunku jest hybrydyzacja jego przedstawicieli z kotem domowym (*Felis catus* L.) [1, 3, 13, 16]. Istnienie „czystych” genetycznie żbików jest poddawane w wątpliwość. Niektórzy wskazują, że żbiki i koty domowe żyły obok siebie przez tysiące lat, zanim gatunek żbika został opisany przez Schrebera w 1775 roku [1]. Niewykluczone zatem, że do przepływu genów pomiędzy tymi dwoma gatunkami zwierząt doszło bardzo dawno temu. Sumiński, opierając się na danych morfologicznych oraz cechach biologicznych, sugerował, że w Europie nie ma czystej krwi żbików, a obecne populacje składają się z hybryd kota domowego i żbika [20, 21]. Jednak z drugiej strony udowodniono, że analiza cech morfologicznych nie jest wiarygodnym narzędziem do różnicowania żbika i kota [1, 3, 20]. Ostatnio Randi i in. stwierdzili, że żbiki i koty żyjące na terenie Włoch mogą być różnicowane za pomocą testów genetycznych. W swojej pracy wykazali, że przepływ genów pomiędzy zajmującymi te same tereny populacjami żbika i kota domowego należy uznać za nieznaczący [1].

W Polsce gatunek żbika jest pod ochroną od 1952 roku, ale mimo to wciąż jest uznawany za gatunek zagrożony, umieszczony w Polskiej Czerwonej Księdze Zwierząt [24]. Niedawno przeprowadzone badania wykazały, że występowanie domniemyanych przedstawicieli gatunku żbika ograniczone jest do terenów Bieszczad, Pogórza Przemyskiego oraz Beskidu Niskiego [14]. Mając na względzie powyższe dane, wydaje się, że dla ochrony żbika istotne znaczenie posiadają szczegółowe badania nad zmiennością genetyczną w obrębie gatunków żbika i kota domowego, zamieszkujących tereny Polski. Niniejsza praca przedstawia wstępne wyniki badań podjętych nad tym zagadnieniem.

Mitochondrialny DNA jest szeroko stosowany w charakterze markera genetycznego w badaniach populacyjnych i nad ewolucją gatunków [4, 15, 23]. W badaniach nad gatunkami blisko spokrewnionymi szczególnie użyteczna jest analiza regionu kontrolnego (CR) mtDNA, który podlega szczególnie szybkiej ewolucji [22]. Wiadomo jednak, że uzyskanie sekwencji DNA dla najbardziej zmiennego segmentu HV1 mtDNA kotów może być sprawiać ogromne trudności w związku z obecnością sekwencji powtarzalnych, odpowiedzialnych za opisywaną w literaturze znaczną heteroplazmię [4, 5]. Podstawowym celem pracy było więc oszacowanie zmienności genetycznej fragmentu regionu kontrolnego mtDNA (z wyłączeniem problematycznych regionów powtarzalnych) charakterystycznej dla gatunku *Felis catus*. Przedyskutowany został również problem zastosowania tej metody analizy w badaniach nad ochroną przyrody do różnicowania osobników należących do dwóch gatunków – żbika i kota domowego.

2. Materiały i metody

2.1. Próbkki

Badaniu poddano 58 osobników należących do gatunku kota domowego: 29 kotów z regionu Krakowa i okolic (próbki zebrano w zakładach weterynaryjnych) i 29 zwierząt należących do mieszkańców Pogórza Przemyskiego i Beskidu Niskiego. Analizie poddano również próbki krwi i sierść pobraną od dwóch żbików z krakowskiego ogrodu zoologicznego (3-letnie rodzeństwo płci męskiej), od żbika zabitego na drodze (zwierzę było wcześniej złapane i śledzone za pomocą odbiornika ra-

* Badania zostały sfinansowane ze środków Komitetu Badań Naukowych w Polsce, numer grantu 6P04A 076 20.

diowego) oraz jedną próbkę kostną (zęb) od osobnika z regionu Pogórza Przemyskiego. Zebrano również próbki z futer żbików, lecz w związku z problemami z ekstrakcją DNA lub prawdopodobną kontaminacją współczesnym DNA, dane te nie zostały zaprezentowane w niniejszej pracy. Izolację DNA z krwi, śliny, tkanek miękkich, sierści i zębów prowadzono z zastosowaniem standardowej metody organicznej [18]. Tkanek kostną kruszono w ciekłym azocie z zastosowaniem aparatu Freezer Mill 6750 (Glen Creston, Wielka Brytania). próbki poddawano całonocnemu trawieniu w buforze o składzie: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS, 39 mM DTT, 0,5 mg/ml proteinazy K, a następnie podwójnej ekstrakcji mieszaniną fenol-chloroform-alkohol izoamylowy. Pomiar stężenia DNA prowadzono z zastosowaniem barwnika fluorymetrycznego PicoGreen (Molecular Probes, Holandia) i aparatu Fluorescan Ascent FL (Labsystems, Finlandia). próbki zawierające niskie stężenia DNA były dodatkowo zagęszczane na kolumnkach Microcon 100 (Millipore, Stany Zjednoczone).

2.2. Amplifikacja DNA

Startery reakcji PCR pozwalające na amplifikację fragmentu regionu kontrolnego o długości 277 pz i fragmentu genu kodującego t-RNA dla proliny o długości 34 pz zaprojektowano w oparciu o sekwencję opublikowaną w bazie GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) o numerze referencyjnym NC 001700 (fragment pomiędzy pozycjami 589 a 889 zgodnie z sekwencją referencyjną) [10]. Sekwencje starterów były następujące:

- starter 1: 5' – CACGCGAACGCTTTAATTTAAG – 3';
- starter 2: 5' – TAGGCATTTTCAGTGCCTTGC – 3'.

Mieszanina reakcyjna złożona była z 1,25 U Taq polimerazy, 200 μM dNTP, 1,25 μM każdego z starterów, 2,0 μl 10-stężonego buforu do PCR, 1,5 mM MgCl₂ (Fermentas, Litwa lub Promega, Stany Zjednoczone) i zazwyczaj 1–10 ng matrycowego DNA w całkowitej objętości 20 μl. Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze GenAmp 9700 firmy Applied. Stosowano następujące warunki amplifikacji: 2 min/94°C – denaturacja wstępna, 32 cykle: 20 s/94°C, 30 s/58°C, 40 s/72°C i wydłużanie końcowe 10 min/72°C. W przypadku próbek zawierających niskie stężenia DNA liczbę cykli reakcji PCR podnoszono do 36. Produkty PCR sprawdzano poprzez standardową elektroforezę w żelach agarozowych i buforze TBE.

2.3. Sekwencjonowanie DNA

Produkty amplifikacji oczyszczano z zastosowaniem zestawu Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen, Niemcy) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Reakcje sekwencjonowania prowadzono w termocykle-

rze GenAmp 9700 (Applied), stosując zestaw BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 1.1 (Applied Biosystems, Wielka Brytania). Bufor rozcieńczający (5-bufor do sekwencjonowania) stosowano w celu rozcieńczenia mieszaniny sekwencyjnej (BigDye Terminator Ready Reaction Premix). Mieszanina reakcyjna złożona była z 4 μl mieszaniny sekwencyjnej, 2 μl buforu rozcieńczającego, 3,2 pmole startera reakcji PCR i około 30 ng oczyszczonego produktu PCR. Sekwencjonowanie prowadzono z zastosowaniem profilu temperaturowego: 96°C/10 s, 50°C/5 s i 60°C/2 min przez 25 cykli. Produkty sekwencjonowania analizowano z zastosowaniem analizatora genetycznego ABI 3100 i zestawu kapilar o długości 36 cm (szybki moduł elektroforezy). Uzyskane wyniki sekwencjonowania analizowano z zastosowaniem oprogramowania ABI Prism, wersja 3.7.

2.4. Analizy filogenetyczne i statystyczne

Sekwencje uzyskane dla badanych osobników, sekwencję referencyjną z bazy danych GenBank oraz odpowiednią wstawkę z DNA jądrowego charakterystyczną dla kotów złożono z zastosowaniem programu ClustalX [6]. Przeprowadzone analizy z zakresu filogenetyki i ewolucji molekularnej przeprowadzono, stosując program MEGA, wersja 2.1 [9]. Do utworzenia drzewa filogenetycznego metodą przyłączania sąsiada z zastosowaniem programu MEGA wybrano dwuparametryczny model Kimury, który zakłada różnice w tempie zmian typu tranzycje i transwersje. Dystanse genetyczne pomiędzy poszczególnymi parami taksonomicznymi oszacowano z zastosowaniem tego samego modelu. Analizę zmienności nukleotydowej przeprowadzono, używając pakietu programów DnaSP, wersja 3.95 [17]. Zmienność wewnątrzgatunkowa została opisana jako zróżnicowanie nukleotydów – średnia liczba różnic nukleotydowych pomiędzy dwiema sekwencjami. Frekwencje haplotypów charakterystyczne dla dwóch populacji kota domowego porównano za pomocą testu χ^2 . W związku z niewielką liczbą próbek pochodzących od żbików nie przeprowadzono analiz pomiędzy gatunkami. Zmienność genetyczną charakteryzującą badany fragment DNA była oszacowana za pomocą wzoru $D = \sqrt{p_i^2}$, gdzie p – częstości obserwowanych haplotypów [7].

3. Wyniki i ich dyskusja

Celem niniejszej pracy była ocena poziomu zmienności fragmentu regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA kota domowego oraz oszacowanie możliwości zastosowania analizy sekwencji tego markera do różnicowania kota domowego i żbika. Tabela I przedstawia dane na temat polimorficznych pozycji oznaczonych w badanym locus. Numery pozycji nukleotydowych określono

względem referencyjnej sekwencji opublikowanej w bazie GenBank. Zaprojektowane startery reakcji PCR nie pozwalały na amplifikację próbek pochodzących od kotów perskich oraz syjamskich (5 osobników). Prawidłowe produkty PCR uzyskiwano dla żbika. Utworzone metodą przyłączania sąsiada drzewo filogenetyczne posiada dwa odrębne kłady. W jednym z nich znalazły się obydwie haplotypy należące do żbików. W związku z ryzykiem amplifikacji jądrowej wstawki mitochondrialnego DNA (tzw. nuclear mitochondrial DNA – Numt), która została opisana dla gatunku kota na chromosomie D2 [10], dokonano również porównania z odpowiadającą temu regionowi DNA sekwencją uzyskaną z bazy GenBank (nr referencyjny U20754.1). Pozycja zajmowana przez sekwencję DNA Numt na drzewie filogenetycznym oraz wartość tzw. minimalnego dystansu Kimury znacznie większa niż maksymalny dystans pomiędzy uzyskanymi sekwencjami DNA (odpowiednio 0,0484 i 0,0203) wskazują, że analizowany fragment DNA jest w rzeczywistości fragmentem regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA (rycina 1).

W analizowanej populacji kotów stwierdzono obecność 10 różnych haplotypów (rycina 1). Dla gatunku *Felis catus* wykazano obecność 10 polimorficznych pozycji nukleotydowych (nie stwierdzono obecności insercji, ani delecji), w tym 9 tranzycji i jedną transwersję T → A (tabela I).

Dystans Kimury pomiędzy sekwencjami zawierał się pomiędzy 0,0033 (1 podstawienie) a 0,0203 (6 podstawień). Co ciekawe, badania nie ujawniły haplotypu zgodnego z haplotypem charakterystycznym dla sekwencji referencyjnej. Najczęstszy haplotyp mitochondrialnego DNA oznaczony dla badanych próbek (H1) różnił się względem sekwencji referencyjnej w 5 pozycjach nukleotydowych (tabela I). Częstość haplotypu H1 była równie wysoka dla populacji kotów z rejonu Krakowa (76%), jak i dla populacji z rejonu parku krajobrazowego Pogórza Przemyskiego (71%). Częstość tego haplotypu nie różniła się znacząco pomiędzy dwoma badanymi rejonami geograficznymi ($\chi^2 = 1,47$, $p = 0,23$ – wartość liczona względem pozostałych haplotypów). Dane na temat zmienności genetycznej charakterystycznej dla badanych populacji kota zebrano w tabeli II. Uzyskane wyniki wskazują, że zmienność analizowanego fragmentu mitochondrialnego DNA jest niska. Wykazano obecność jednego bardzo częstego oraz dziewięć rzadkich haplotypów (tabela I). Wartość współczynnika zmienności genetycznej dla badanego markera była równa $D = 0,43$.

Analiza sekwencji DNA żbików z krakowskiego ogrodu zoologicznego wykazała obecność takiego samego haplotypu (H8) w obu próbkach, co potwierdziło pokrewieństwo pomiędzy dwoma osobnikami. Próbkę pochodzącą od dwóch żbików z regionu Pogórza Przemyskiego (od osobnika zabitego na drodze oraz z czaszki) posiadały haplotyp H3, który był również obserwo-

wany u 2 kotów domowych z populacji krakowskiej oraz u 1 osobnika z rejonu Pogórza Przemyskiego (tabela I). Poddane analizie próbki pochodzące od żbików miały rzadkie haplotypy; należy jednak pamiętać, że mała liczba analizowanych próbek nie pozwala na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków. Haplotyp oznaczony jako H8 jest specyficzny dla żbików z krakowskiego ogrodu zoologicznego. Dwa haplotypy, jeden unikatowy dla żbików (H8), a drugi charakterystyczny dla żbików i kotów domowych (H3), różnią się w zaledwie dwóch pozycjach nukleotydowych. Jak wynika z drzewa filogenetycznego (rycina 1), haplotypy te posiadają wspólną, ewolucyjnie bliską sekwencję DNA.

Badania nad zmiennością genetyczną żbika i kota domowego doprowadziły do sprzecznych wyników. Niektórzy autorzy, polegając na danych z analizy mikrosatelitarnego DNA, sugerują, że współczesna szkocka populacja żbików stanowi wynik trwającego wiele lat krzyżowania się pomiędzy żbikami a dziko żyjącymi kotami domowymi, co sprawia, że nie jest możliwe opracowanie testu genetycznego pozwalającego na różnicowanie tych dwóch gatunków [1, 2]. Dane opublikowane przez innych autorów wskazują z kolei, że z jednym wyjątkiem haplotypy mitochondrialnego DNA są całkowicie specyficzne dla gatunku żbika i kota domowego [16]. Również dane uzyskane dla markerów STR wskazują, że te dwa gatunki mogą być identyfikowane za pomocą testów genetycznych [16].

Podsumowując, należy stwierdzić, że zmienność genetyczna charakterystyczna dla analizowanego fragmentu regionu kontrolnego mtDNA jest niska. Analizowane próbki żbików posiadały rzadkie (H3) lub unikatowe haplotypy (H8). Haplotypy te zlokalizowane są we wspólnym kładzie w utworzonym drzewie filogenetycznym. Możliwość różnicowania żbików oraz mieszańców żbika i kota domowego poprzez zastosowanie analizowanego fragmentu mitochondrialnego DNA powinno podlegać dalszym badaniom większej liczby próbek pochodzących od żbików. Analizując dotychczas opublikowane dane, należy stwierdzić, że w celu wiarygodnego różnicowania tych dwóch gatunków zwierząt należałoby poszerzyć obszar analizy mitochondrialnego DNA, jak również sięgnąć po dodatkowe markery DNA jądrowego (np. STR). Jak wykazano, opracowana metoda jest wystarczająco czuła, aby umożliwić analizę pojedynczego zęba, a zatem możliwe jest jej zastosowanie do analizy materiału o charakterze muzealnym. Pozwoli to na dokonanie porównania pomiędzy współczesnym i przeszłym poziomem zmienności w analizowanym locus. Niniejsza praca prezentuje wstępne dane, natomiast w celu uzyskania pełnego „obrazu genetycznego” polskich żbików konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań.

Podziękowania

Autorzy składają podziękowania wszystkim, którzy pomogli w zbieraniu próbek dla potrzeb przeprowadzonych badań. Szczególne wyrazy wdzięczności za udostępnienie materiału pochodzącego od żbików kierowane są do dyrekcji Ogrodu Zoologicznego w Krakowie.