



Hrvatsko biološko društvo 1885  
SOCIETAS BIOLOGORUM CROATICA 1885  
Croatian Biological Society

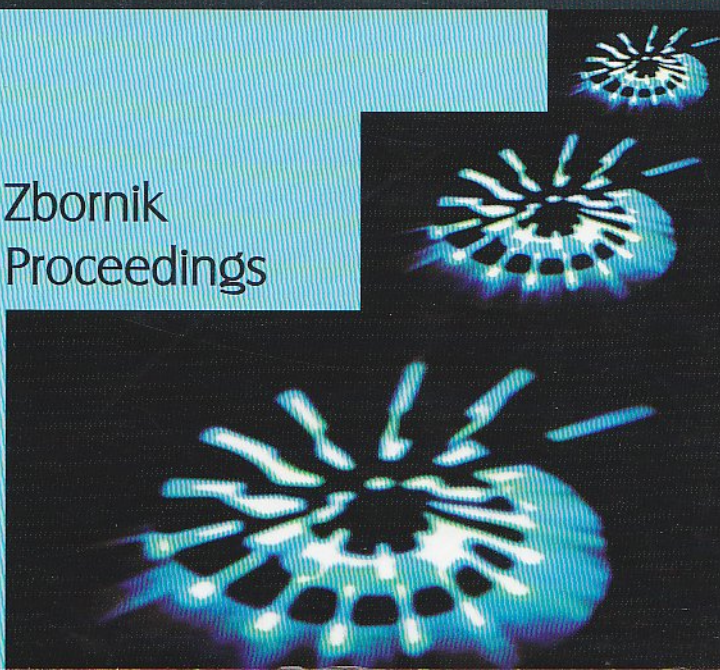
## 8. HRVATSKI BIOLOŠKI KONGRES

s međunarodnim sudjelovanjem  
Zagreb, 27. rujna - 2. listopada 2003.

## 8<sup>th</sup> CROATIAN BIOLOGICAL CONGRESS

with International Participation  
Zagreb, September 27 - October 2, 2003

Zbornik  
Proceedings



P-11

IZOLACIJA I UMNAŽANJE STARE DNA IZ MUZEJSKIH PREPARATA  
ZA GENETIČKA ISTRAŽIVANJA CRVENOKLJUNE GALICE

(Aves: Corvidae: *Pyrrhonorax pyrrhonorax*)

L. Tomašković<sup>1</sup>, Z. Tadić<sup>1</sup> i M. Bruford<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Rooseveltov trg 6, HR-10000 Zagreb, Hrvatska (ivna@biol.pmf.hr, ztadic@public.srce.hr), <sup>2</sup>Cardiff University School of Biosciences, Main Building, Museum Avenue, PO Box 915, Cardiff CF10 3TL, UK (Bruford MW@cardiff.ac.uk)

Muzejski preparati predstavljaju izuzetno vrijedan izvor podataka za populacijsko-genetička istraživanja s vremenskog stanovišta. Svrha ovog istraživanja jest ispitati upotrebljivost metode za izolaciju i umnažanje DNA iz kože muzejskih ptica za daljnje genetičke analize, posebice za sekvenciranje mtDNA. Istraživanjem su obuhvaćena 24 muzejska primjerka iz muzeja The Natural History Museum, Velika Britanija, od kojih su 22 primjerka bile jedinke vrste crvenokljuna galica (*Pyrrhonorax pyrrhonorax*), a dva primjerka su pripadala vrsti žutokljuna galica (*P. graculus*). Najstariji primjerak potječe iz 1874. godine, a najmlađi iz 1946. Laboratorijski dio istraživanja proveden je u laboratoriju namijenjenom isključivo za rad sa starom DNA kako bi se izbjegla moguća kontaminacija uzoraka današnjom DNA ili proizvodima reakcije PCR. DNA je izolirana iz komadića kože uzetog s ventralne strane nožnog prsta. Dio kontrolne regije mtDNA umnožen je reakcijom PCR u prisustvu specifičnih DNA klica. Proizvodi reakcije PCR razdvajani su elektroforezom u agaroznom gelu i bojani etidij-bromidom. Proizvodi reakcije dobiveni su iz 22 uzorka. Dva uzorka nisu dala proizvod, vjerojatno uslijed uznapredovale razgradnje DNA ili uslijed prisustva inhibitora reakcije PCR. Naknadnim sekvenciranjem proizvoda reakcije PCR utvrđeno je postojanje 6 haplotipova. Slijepa proba i negativna kontrola potvrdile su da niti u jednom slučaju nije došlo do kontaminacije uzoraka. DNA je uspješno izolirana iz uzoraka kože i umožena reakcijom PCR u gotovo 92 % uzoraka. Ovim istraživanjem pokazalo se da se uz primjerene metode može postići vrlo dobar uspjeh pri radu sa starom DNA. Kvaliteta ovako dobivene DNA dovoljno je visoka za primjenu u zahtjevnijim laboratorijskim postupcima kao što je sekvenciranje.

EXTRACTION AND AMPLIFICATION OF ANCIENT DNA FROM  
MUSEUM SKINS FOR USE IN GENETIC STUDIES OF THE CHOUGH

(Aves: Corvidae: *Pyrrhonorax pyrrhonorax*)

L. Tomašković<sup>1</sup>, Z. Tadić<sup>1</sup> and M. Bruford<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Physiology, Faculty of Science, University of Zagreb,

Rooseveltovej trg 6, 10000 HR-10000 Zagreb, Croatia (ivna@biol.pmf.hr, ztadic@public.srce.hr), <sup>2</sup>Cardiff University School of Biosciences, Main Building, Museum Avenue, PO Box 915, Cardiff CF10 3TL, UK (Bruford MW@cardiff.ac.uk)

Museum skins represent an invaluable source of data for temporal population genetic studies. Here we evaluate a DNA extraction and amplification protocol from avian museum skins for further use in genetic analysis, namely sequencing of mtDNA. Twenty-four museum specimens from the Natural History Museum, UK, were included in this study, 22 of which were choughs (*Pyrrhonorax pyrrhonorax*) and two were alpine choughs (*P. graculus*). The oldest specimen had been collected in 1874, and the most recent in 1946. All laboratory work was carried out in an ancient DNA lab following stringent standards to avoid contamination with recent DNA or PCR products. DNA was extracted from small pieces of footpad skin and mtDNA control region was amplified by means of PCR with a pair of specific primers. PCR products were resolved in agarose gel and stained with ethidium-bromide. Products were yielded from 22 samples. Two samples did not yield products, either due to DNA degradation or the presence of inhibitor substances. Subsequent sequencing of PCR products revealed six different haplotypes. The blank and the negative control confirmed that there was no contamination of the samples in either step of the process. In all, DNA was successfully extracted and amplified from almost 92 % of the samples. Our study shows that a high success rate in working with ancient DNA can be achieved by following adequate laboratory standards and procedures. The DNA obtained in this way can be of good enough a quality for use in more sensitive procedures such as sequencing.

P-12

## MOLEKULARNI BILJEZI U POPULACIJSKO-GENETIČKIM ISTRAŽIVANJIMA CRVENOKLJUNE GALICE (Aves: Corvidae: *Pyrrhonorax pyrrhonorax*)

I. Tomašković<sup>a</sup>, I. Bašić<sup>a</sup> i M. Bruford<sup>b</sup>

<sup>1</sup>Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska (ivna@biol.pmf.hr, ibasic1@yahoo.com), <sup>2</sup>Cardiff University School of Biosciences, Main Building, Museum Avenue, PO Box 915, Cardiff CF10 3TL, UK (Bruford MW@cardiff.ac.uk)

Populacije crvenokljune galice (*Pyrrhonorax pyrrhonorax*) u svijetu su fragmentirane i u opadanju. Smanjenje britanske populacije bilo je vrlo snažno, te se ona danas procjenjuje na svega 340 parova. Poznavanje genetske raznolikosti populacija neophodno je prilikom odabira načina upravljanja populacijama u svrhu njihova očuvanja i očuvanja vrste. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati primjenjivost dva tipa molekularnih biljega u populacijsko-genetičkim istraživanjima crvenokljune galice: kontrolnu regiju mtDNA i postojeće mikrosatelitske lokuse. DNA je izolirana