

# Obecność haplotypów mtDNA związanych z „klątwą matki” jako jedna z możliwych przyczyn obniżonego potencjału reprodukcyjnego zająca szaraka w Polsce

TOMASZ STRZAŁA, BARBARA KOSOWSKA, MAGDALENA MOSKA, TADEUSZ DOBOSZ\*

Pracownia Biologii Molekularnej i Cytogenetyki, Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt  
Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt UP, ul. Kozuchowska 7, 51-631 Wrocław

\*Zakład Technik Molekularnych Katedry Medycyny Sądowej AM, ul. M. Curie-Skłodowskiej 52, 50-369 Wrocław

Strzała T., Kosowska B., Moska M., Dobosz T.

## Presence of mtDNA haplotypes related to the “mother’s curse” among Polish brown hares as a possible cause of their reduced reproductive success

### Summary

The aim of the study was to identify carriers of the mtDNA sequence related to the “mother’s curse” in the Polish population of the brown hare. Even slight mtDNA mutations inherited from mothers by their sons may diminish sperm cell motility by decreasing the synthesis of ATP and thus reduce the reproductive success of the species. In the literature this phenomenon is referred to as the “mother’s curse” effect. Muscle samples from 103 hares were collected from hunters in central, southern and eastern Poland. In order to identify hares with the “mother’s curse”, an mtDNA control region (CR) was selected, amplified according to (26), sequenced and analyzed phylogenetically along with sequences from the Genbank, using the PhyML program (9). Four animals were eliminated from mtDNA studies because of heteroplasmy. A tree consisting of 4 clades was generated. For the purpose of this study, the most important of them was the PW clade, which included 5 Polish hares (females) with sequences characteristic of the “mother’s curse.” This constitutes 5.05% of the population studied. The geographical origins of the hares with the “mother’s curse” were dispersed over almost the entire area under investigation. Two hares came from the Plock region, and the others from the Konin, Zamość and Nowy Sącz regions. A small fragment of the mtDNA sequence proved sufficient for the identification of an important functional effect of mutation in the mtDNA on the condition of an individual and the whole population. For the first time a screening method proved effective in the identification of hares with “mother’s curse” mtDNA mutations in a population of animals living in the wild. By then this had only been achieved in captive colonies. The identified group of female carriers, constituting 5.05% of the investigated sample, which persists in the population regardless of selection, may through their sons further compromise the effective size of a constantly decreasing and endangered population of the brown hare in Poland.

**Keywords:** brown hare, mtDNA, mother’s curse, reproductive success

Zając szarak (*Lepus europaeus* P.) jest zarówno w Polsce (6), jak i w Europie zagrożony wyginięciem (24). Czynniki zagrażające istnieniu gatunku są wielorakie: zmiany klimatu, rozbudowa sieci autostrad, choroby, drapieżnictwo, nadmierne polowania oraz pogorszenie jakości środowiska (6, 7, 23, 24). W sytuacji zagrożenia wyginięciem optymalna płodność zający jest więc cechą kluczową dla ich przetrwania. Ostatnio u zający europejskich zidentyfikowano mutacje w mitochondrialnym (mt) DNA, które mogą w znaczący sposób obniżać ich sukces reprodukcyjny (25). Plemniki mają nieproporcjonalnie większe zapotrzebowanie na energię niż np. komórki somatycz-

ne bądź oocyty. Mimo wysokiego wskaźnika zużycia energii napędzającej ich ruchliwość, plemniki posiadają tylko ułamek liczby mitochondriów występujących w większości innych komórek (16, 22). Podczas doboru naturalnego z reguły następuje szybkie usuwanie z populacji większości szkodliwych mutacji, ale w genomach osobników (zarówno jądrowym, jak i mtDNA) mogą egzystować nieznacznie szkodliwe mutacje (11, 19). MtDNA koduje podjednostki kompleksów białkowych pochodzenia zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego różnych etapów fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS – Oxidative Phosphorylation) (1, 29). Nawet niewielkie mutacje w mtDNA

odziedziczone od matki przez jej synów, obniżając efektywność OXPHOS, mogą ograniczać ruchliwość ich plemników (16, 22). Zmutowane samce produkują plemniki, którym nie starcza energii na dotarcie do oocytów i odnoszą mniejszy sukces reprodukcyjny w stosunku do samców nie zmutowanych. Samce takie mogą ginąć bezpotomnie, ale mutacje będą i tak przechowywane w populacji ze względu na ich dziedziczenie od matek (8, 13, 34). Sytuację taką w bibliografii określa się jako „efekt matczynej klątwy” („mother's curse effect”) (8). Mutacje w mtDNA nie mają wpływu na żywotność komórek jajowych ze względu na ich wymaganą niższą energię (3). Płodność samic pozostaje zatem bez zmian.

Smith i wsp. (25) przeprowadzili w Austrii badania płodności samców i samic 7 pokoleń zajęcy szaraków w powiązaniu z wybranymi sekwencjami mtDNA. Zajęce utworzyły dwie haplogrupy: A oraz B. Stwierdzono, że tylko 47% samców haplogrupy (hg) B wykazywało prawidłową płodność w porównaniu do 90% samców hg A. Samce hg B dziedziczyły po swych matkach zmutowany mtDNA związany z „klątwą matki”. Tak więc efekt klątwy utrzymywał się u zajęcy mimo 7 lat kojarzeń i tworzenia się u potomstwa różnych kombinacji białek pochodzenia mitochondrialnego z białkami pochodzenia jądrowego. Samice przenoszące klątwę nie wykazały różnic w sukcesie reprodukcyjnym w porównaniu do innych samic. Nie stwierdzono, by piętno matki różnicowało średnią wielkość miotu między ojcami zmutowanymi i pozostałymi. Sugeruje to, że skutki energetyczne różnic związanych z mtDNA, ograniczając szansę płodności samca, nie wpływają na wielkość miotu (plenność), bowiem gdy plemniki zdołają dotrzeć do oocytów, formuje się miot o prawidłowej wielkości (25). Dowody na „klątwę matki” stwierdzono także u innych gatunków zwierząt (2, 31) oraz ludzi (1, 18, 29). Dlaczego więc teoretycznie prawdopodobne zjawisko jest tak rzadko identyfikowane? Sugeruje się, iż brak wykrywalności tego zjawiska to skutek oceny niskiej płodności jako jedynie chwilowego przejawu ograniczonej sprawności samców lub/ oraz istnienia mechanizmów kompensacyjnych, które maskują efekty „matczynej klątwy” (5, 8) poprzez interakcje z licznymi genami jądrowymi, zaangażowanymi w syntezę ATP na szlaku OXPHOS (1, 2). W przypadku gdy nastąpi wymieszanie znacznie różniących się od siebie populacji, może ono zakłócić wzajemne adaptacyjne dostosowanie kompleksów genów jądrowych z mitochondrialnymi i ukazać wpływ określonego mtDNA (dodatni bądź ujemny) na płodność samców (2, 5, 18). Taka sytuacja może na przykład wystąpić w zamkniętej hodowli zwierząt (25), gdy osobniki nie mogą bazować na doborze naturalnym. Dużo trudniej takie zjawisko wykryć w populacji zwierząt dziko żyjących. Efekt buforowy, zaciemniający działanie obecnych w mtDNA mutacji może także wywoływać heteroplazmia (4, 30),

związana z obecnością więcej niż jednego rodzaju mtDNA w tej samej komórce. Stanem prawidłowym i powszechnym jest homoplazmia, w którym wszystkie cząsteczki mtDNA pochodzące od matki są identyczne. Przyczyną heteroplazmii u kręgowców są mutacje zachodzące w mtDNA. Wyniki Smitha i wsp. (25) dotyczące identyfikacji w populacji zajęcy austriackich samców z haplotypami mtDNA obciążonymi „klątwą matki” skłoniły do podjęcia badań nad poszukiwaniem zmutowanych zajęcy w aktualnie badanej, wolno żyjącej populacji zajęcy polskich (27). „Matczyzna klątwa” wykryta w populacji zajęcy polskich byłaby chociaż częściowym wyjaśnieniem słabej regeneracji zajęcy krajowych, nawet w regionach, w których od kilku lat rezygnuje się z ich pozyskania. W tym znaczeniu konsekwencje odkrycia Smitha i wsp. (25) dla ochrony przyrody są ważne. Mutacje mtDNA zwane klątwą matki nastąpiły u zajęcy prawdopodobnie na obszarze Włoch w okresie postglacjalnym i stamtąd rozpoczęła się ich migracja (25). W Polsce nie ma dowodów na zakup zajęcy z innych krajów niż Czechy czy Słowacja. Austrię i Polskę dzieli jednak tylko 100 km odległości, zatem istnieje realne prawdopodobieństwo, iż w Polsce żyją zajęce z „klątwą” migrujące drogą naturalną bądź nie, z opisywanych w literaturze refugium np. z północnych Włoch (19, 20), z którego pochodzą „napiętnowane” zajęce zidentyfikowane w Austrii (25) albo z kierunku Europy południowo-wschodniej (12, 26). Zajęć szarak to gatunek, który w Polsce i w całej Europie żyje nie tylko na wolności, ale coraz częściej także w zamkniętych hodowlach, w których uzyskuje się przychówek liczący tysiące osobników rocznie (21, 32). Obecność w nich zajęcy posiadających mtDNA z „klątwą matki”, może być przyczyną uzyskania znacznie gorszych wyników rozrodu. Ponadto, zajęce urodzone w Polsce sprzedaje się do innych krajów Europy, co może umożliwić ich dalsze rozprzestrzenianie na drodze odnotowanej w Austrii (25) lub innej.

Celem badań była identyfikacja w populacji zajęcy polskich osobników obciążonych „klątwą matki”, wskazanie ich lokalizacji oraz ocena skali występowania tego zjawiska w Polsce. Możliwość względnie prostej identyfikacji zajęcy-mutantów mtDNA, pozwoliłaby na eliminację matek przekazujących „klątwę” swym synom oraz ich samych z ośrodków hodowli, a także umożliwiłaby wykrywanie i eliminację samców z „klątwą matki” podczas zakupu materiału hodowlanego z innych krajów Europy.

## Materiał i metody

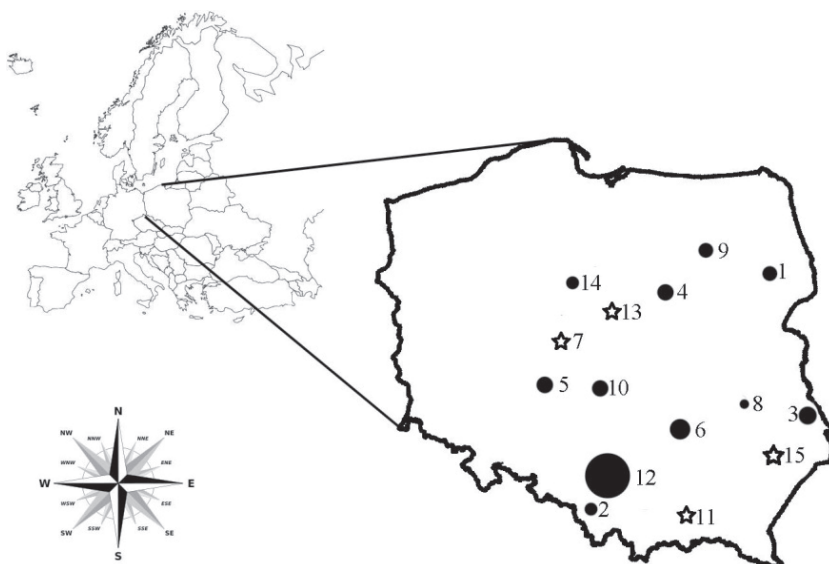
Próbki mięśni pochodzące od 103 zajęcy pozyskano w latach 2005-2008 od myśliwych z terenu Polski centralnej, południowej i wschodniej. Lokalizację i liczebność prób przedstawiono na ryc. 1. Do charakterystyki genetycznej zajęcy wykorzystano region kontrolny (control region – CR) najbardziej zmienny region mtDNA, wybrany do identyfi-

kacji zajęcy z „kłątwą matki” w Austrii (25). Smith i wsp. dodatkowo przeprowadzili analizę dwóch genów kodujących białka biorące udział w OXPHOS. Były to geny ND2 oraz ATP5, jednakże do konstrukcji drzewa filogenetycznego zawierającego kład osobników obarczonych „kłątwą matki” użyto wyłącznie sekwencji CR, które okazały się wystarczające do identyfikacji tych osobników. Ekstrakcję całego genomowego DNA z limfocytów krwi obwodowej wykonano z użyciem zestawu GenElute Blood Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich), a izolację DNA z tkanki mięśniowej przy użyciu zestawu Sherlock AX firmy A&A Biotechnology. Region kontrolny mtDNA amplifikowano wg (26), następnie zsekwencjonowano na obu niciach i oceniono *by eye*. W niniejszej pracy użyto fragmentu CR o długości 392 pz. Uzyskane sekwencje CR mtDNA przeanalizowano filogenetycznie za pomocą programu Phylml (9) z użyciem modelu substytucji GTR zasugerowanego przez program MrAIC (17).

Drzewo najwyższej wiarygodności zostało oszacowane przy użyciu sekwencji zająca bielaka jako korzenia drzewa. Wartość bootstrap została określona dla 10 000 iteracji. W celu weryfikacji wyników ten sam zestaw sekwencji został zanalizowany także z użyciem metod przyłączenia sąsiada oraz parsymonii.

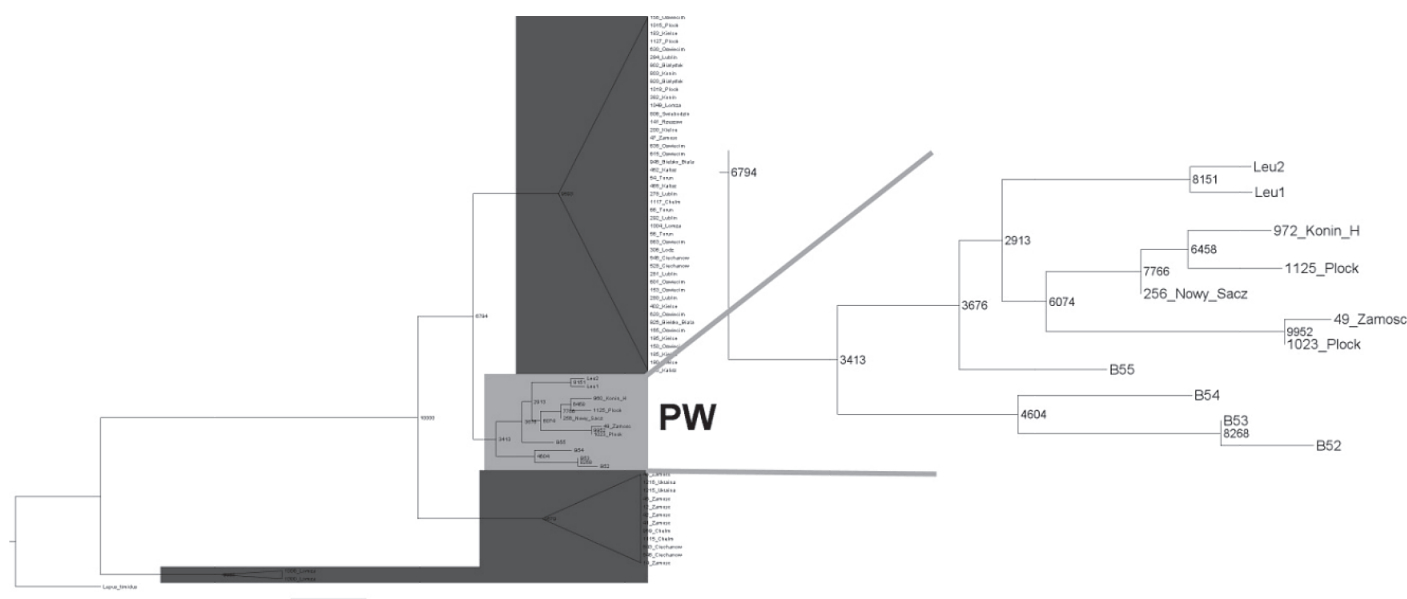
## Wyniki i omówienie

Na 392 pz. CR uzyskane w wyniku sekwencjonowania u 99 zajęcy, 122 miejsca w sekwencji okazały się być zmienne. Do konstrukcji drzewa wzięto pod uwagę sekwencje CR mtDNA pochodzące od 99 zajęcy (u 4 wykryto heteroplazmię) (numery akcesyjne Genbank GU452838-GU452946). Przyrównane mię-



Ryc. 1. Mapa miejsc odłowu zajęcy (wielkość punktów oznaczających pochodzenie próby jest skorelowana z liczbą osobników): (1) Białystok (5 osobników), (2) Bielsko-Biała (4 os.), (3) Chełm (7 os.), (4) Ciechanów (6 os.), (5) Kalisz (6 os.), (6) Kielce (8 os.), (7) Konin (8 os.), (8) Lublin (3 os.), (9) Łomża (6 os.), (10) Łódź (7 os.), (11) Nowy Sącz (4 os.), (12) Oświęcim (18 os.), (13) Płock (6 os.), (14) Toruń (4 os.), (15) Zamość (11 os.). Gwiazdkami oznaczono miejsca, w których stwierdzono obecność osobników z „kłątwą matki”

dzy sobą oraz do sekwencji pobranych z Genbanku, pozwoliły na wygenerowanie drzewa złożonego z 4 kładów (ryc. 2), z których najważniejszy dla realizacji celu badań okazał się kład PW (północne Włochy). W kładzie tym znalazło się 5 zajęcy (wyłącznie samic) mających sekwencje markerowe związane z „kłątwą matki”. Sekwencje CR mtDNA pięciu polskich zajęcy znalazły się w kładzie PW wraz z sekwencjami Leu1 i Leu2 (20) oraz z sekwencjami B-52 do B-55 (12), do których odniósł się Smith i wsp. (25) identyfikując zajęc z „kłątwą matki” w Austrii. Lokalizacja zajęcy,



Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne 99 sekwencji CR zająca szaraka oraz sekwencji CR zająca bielaka – służącej do ukorzenia drzewa, z wyszczególnieniem kładu PW. Przy węzłach podano wartości bootstrap

których sekwencje mtDNA zidentyfikowano jako przenoszące „kłątwę matki” (oznaczone zostały gwiazdkami na mapie), objęła prawie cały badany obszar Polski (ryc. 1). Dwa zajęcia pochodziły z okolic Płocka, po jednym zlokalizowano w okolicach Konina, Zamościa oraz Nowego Sącza.

Dzięki markerowej sekwencji CR mtDNA zidentyfikowano w populacji zajęcy dziko żyjących 5 osobników – samic przenoszących kłątwę matki (na 99 osobników), co stanowi 5,05% badanej populacji. Dotychczas podobna identyfikacja udawała się jedynie u zwierząt żyjących w zamkniętych koloniach. Okazało się, że niewielki fragment sekwencji mtDNA może mieć ważne znaczenie diagnostyczne dla stwierdzenia funkcjonalnego efektu mutacji w mtDNA w odniesieniu do kondycji osobniczej oraz populacji. Przodkowie zajęcy wykrytych przez Smitha i wsp. (25) w Austrii, dziedziczący po swych matkach zmutowane sekwencje CR mtDNA zwane „kłątwą”, pochodzili najprawdopodobniej z refugium północnych Włoch (25). Z tego powodu na drzewie zajęcy polskich, najważniejszym był kład PW (płn. Włochy), który okazał się tożsamy z subkladem B-III z pracy Smitha i wsp. (25). Na tożsamość kładów wskazał wynik porównania uzyskanych sekwencji mtDNA pięciu polskich zajęcy do sekwencji zajęcy zwanych Leu1 i Leu2 z centralnych i północnych Włoch (20) oraz do sekwencji B52, B53, B54 zajęcy ze wschodniej Macedonii i B55 z Lefkada Island (12), ponieważ określił ich najwyższe i istotne (w porównaniu z innymi) podobieństwo.

Czy sekwencje CR wykryte w niniejszych badaniach u 5 polskich samic zajęcia szaraka są rzeczywiście markerowymi dla zmutowanych genów mitochondrialnych odpowiedzialnych za obniżenie potencjału reprodukcyjnego ich synów? Dotychczasowa wiedza na temat mtDNA dostarcza dowodów na ścisłe dziedziczenie mtDNA od matki, prawidłową i powszechną w związku z tym homoplazję oraz brak rekombinacji w obrębie haplotypów mtDNA. Mimo tej ogólnej prawidłowości, nawet w niniejszych badaniach zidentyfikowano 4 zajęcia obciążone heteroplazmą, czyli obecnością u jednego osobnika różnych wzorców haplotypów mtDNA. Przyczyną heteroplazmii są najprawdopodobniej mutacje zachodzące w mtDNA, ale nie można wykluczyć rekombinacji z ojcowskim mtDNA, której możliwość zajścia ostatnio wykazano (14, 15). Ojcowski mtDNA może dostać się do oocytu na drodze wycieku z mitochondriów oplatających plemnik i uniknąć planowej eliminacji. To jest najbardziej prawdopodobna droga od heteroplazmii do rekombinacji w obrębie mtDNA (33), jednakże dotychczas nie udokumentowano żadnego przykładu rekombinacji mtDNA w jakiegokolwiek populacji wolno żyjących kręgowców lądowych (28). Poznano jedynie pośrednie efekty śladów rekombinacji u niższych kręgowców (28). Bardzo rzadko pojawiają się informacje

opisujące historyczne ślady rekombinacji w obrębie mtDNA ludzi (10). Należy zatem uznać, iż wykryte w niniejszych badaniach sekwencje markerowe CR są trwale sprzężone ze zmutowanymi *loci* mtDNA zwane „kłątwą matki”.

Pozostaje kwestia, czy zidentyfikowany w badanej populacji zajęcy odsetek osobników z „kłątwą matki” może być przyczyną słabej regeneracji populacji zajęcy krajowych? Dziesiątki lat temu, gdy populacja krajowa zajęcy była wielokrotnie większa (6) i nieznacznie zagrożona antropopresją, ta niewielka grupa osobników (5,05%) była zapewne artefaktem bez istotnego znaczenia. Jednakże w warunkach trwałego spadku liczebności zajęcy, rozbiciu populacji na mniejsze, przerwaniu ciągłości między subpopulacjami (które już nie mogą wymieniać ze sobą genów), niska płodność lub wręcz bezpłodność części samców rozsianych na terenie prawie całej Polski jest znaczącym i niekorzystnym czynnikiem, zdecydowanie pogarszającym sytuację, a być może nawet przesądzającym o braku możliwości zwiększenia liczebności populacji do granic gwarantujących jej przetrwanie. Zatem ta niewielka stawka zajęcy z „kłątwą matki”, która utrzymuje się w dużej mierze niezależnie od selekcji (29), może jeszcze bardziej zmniejszyć efektywny rozmiar małych populacji w porównaniu do liczebności oczekiwanej na podstawie spisu liczby zwierząt. Zastanawiającym jest fakt wykrycia w badanej populacji jedynie samic nosicielek „kłątwy”. Niestety, na obecnym etapie badań istnieje zbyt mała ilość informacji koniecznych do wyjaśnienia tego intrygującego zjawiska. Konkludując, potrzebne są dalsze badania monitorujące zarówno zajęcia rozmnażające się w niewoli, jak i populacje wolno żyjące, w celu zebrania informacji o rzeczywistej liczbie zajęcy z „kłątwą matki” oraz rozpoznania wiedzy o jej efektach, jako czynnika potencjalnie odpowiedzialnego za słabą regenerację zagrożonych populacji.

## Piśmiennictwo

1. Amaral A., Ramalho-Santos J., St John J.: The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum. Reprod.* 2007, 22, 1585-1596.
2. Arnqvist G., Dowling D., Eady P., Gay L.: Genetic architecture of metabolic rate: environment specific epistasis between mitochondrial and nuclear genes in an insect. *Evolution*, 2010, 64, 3354-3363.
3. Chan C., Liu V., Lau L., Yeung W., Ng E., Ho P.: Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 2005, 11, 843-846.
4. Chinnery P., Thorburn D., David C., Samuels D., Sarah L., White S., Dahl H., Doug M., Turnbull D., Lightowlers R., Howell N.: The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet.* 2000, 16, 500-505.
5. Dowling D., Friberg U., Lindell J.: Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends Ecol. Evol.* 2008, 23, 546-550.
6. Dziedzic R., Kamieniarz R., Dziedzic B., Wójcik M., Beeger S., Flis M.: Przyczyny spadku populacji zajęcia szaraka w Polsce. Monografia. Wyd. Ministerstwo Środowiska. Warszawa 2000, 12-29.
7. Edwards J., Fletcher M., Beryn P.: Review of the factors affecting the decline of the European brown hare, *Lepus europaeus* (Pallas, 1778) and the use of wildlife incident data to evaluate the significance of paraguay. *Agricult. Ecosys. Environ.* 2000, 79, 95-103.

8. Gemmell N., Victoria J., Metcalf V., Allendorf F.: Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends Ecol. Evol.* 2004, 19, 238-244.
9. Guindon S., Gascuel O.: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *System. Biol.* 2003, 52, 696-704.
10. Hagelberg E., Goldman N., Lió P., Whelan S., Schiefelhöel D.: Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proc. Royal Soc.* 1999, 266, 485-492.
11. Horn S., Durka W., Wolf R., Ermala A., Stubbe A., Stubbe M.: Mitochondrial Genomes Reveal Slow Rates of Molecular Evolution and the Timing of Speciation in Beavers (*Castor*), One of the Largest Rodent Species. *Public Library of Science ONE* 2011, 6, 14622-14631.
12. Kasapidis P., Suchentrunk F., Magoulas A., Kotoulas G.: The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Mol. Phylog. Evol.* 2005, 34, 55-66.
13. Korpelainen H.: Genetic Maternal Effects on Human Life Span through the Inheritance of Mitochondrial DNA. *Hum. Hered.* 1999, 49, 183-185.
14. Ladoukakis E., Theologidis I., Rodakis G., Zouros E.: Homologous Recombination between Highly Diverged Mitochondrial Sequences: Examples from Maternally and Paternally Transmitted Genomes. *Mol. Biol. Evol.* 2011, 28, 1847-1859.
15. Ladoukakis E., Zouros E.: Direct Evidence for Homologous Recombination in Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 2001, 18, 1168-1175.
16. Nakada K., Sato A., Kayo K., Morita T., Tanaka H., Inoue S., Yonekawa H., Hayashi J.: Mitochondria-related male infertility. *PNAS.* 2006, 103, 15148-15153.
17. Nylander J.: MrModeltest v2.2. Program distributed by the author. *Evol. Biol. C.*, Uppsala University 2004.
18. Parsch J.: Evolution. The cost of being male. *Science* 2011, 332, 798-799.
19. Pierpaoli M., Riga F., Trocchi V., Randi E.: Hare populations in Europe: intra and interspecific analysis of mtDNA variation. *Biologie* 2003, 326, 80-84.
20. Pierpaoli M., Riga F., Trocchi V., Randi E.: Species distinction and evolutionary relationship of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Ecol.* 1999, 8, 1805-1817.
21. Pietrzak A.: Organizacja w Polsce ośrodków hodowli zajęcy typu otwartego. Praca magisterska. Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wrocław 2008.
22. Ruiz-Pesini E., Lapeña A., Díez-Sánchez C., Pérez-Martos A., Montoya J., Alvarez E., Díaz M., Urriés A., Montoro L.: Human mtDNA Haplogroups Associated with High or Reduced Spermatozoa Motility. *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 67, 682-696.
23. Schmidt N., Asferg T., Forchhammer M.: Long-term patterns in European brown hare population dynamics in Denmark: effect of agriculture, predation and climate. *BMC Ecology* 2004, 4, 15-24.
24. Smith R., Jennings N., Harris S.: A quantitative analysis of the abundance and demography of European hares *Lepus europaeus* in relation to habitat type, intensity of agriculture and climate. *Mammal Rev.* 2005, 35, 1-24.
25. Smith S., Turbill C., Suchentrunk F.: Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Mol. Ecol.* 2010, 19, 36-43.
26. Stamatis C., Suchentrunk F., Moutou K. A., Giacometti M., Haerer G., Djan M., Vapa L., Vukovic M., Tvrković N., Sert H., Alves P., Mamuris Z.: Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia? *J. Biogeography* 2009, 36, 515-528.
27. Strzala T., Kosowska B., Stamatis C., Moska M., Marszałek-Kruk B., Mamuris Z.: Genetic diversity of the Polish brown hare (*Lepus europaeus*) based on PCR-RFLP mtDNA analysis (preliminary results), *EJPAU Med. Vet.* 2008, 11, On line.
28. Ujvari B., Downton M., Madsen T.: Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. *Biol. Lett.* 2008, 3, 189-192.
29. Wade M., Brandvain Y.: Reversing mother's curse: selection on mitochondrial fitness effects. *Evolution* 2009, 63, 1084-1089.
30. Wai T., Ao A., Zhang X., Cyr D., Dufort D., Shoubridge E.: The Role of Mitochondrial DNA Copy Number in Mammalian Fertility. *Biol. Reprod.* 2010, 83, 52-62.
31. Wolff J., White D., Woodhams M., White H., Gemmell N.: The Strength and Timing of the Mitochondrial Bottleneck in Salmon Suggests a Conserved Mechanism in Vertebrates. *Public Library of Science ONE* 2011, 6, 20522-20526.
32. Wójcicki P.: Charakterystyka ośrodków hodowli zajęcy typu budkowego. *Wyd. Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.* Wrocław 2008.
33. Yu X., Huang Y.: Animal Mitochondrial DNA Recombination. *Chin. J. Zoology* 2008, 2, 31-35.
34. Zeh J., Zeh D.: Maternal inheritance, sexual conflict and the maladapted male. *Trends Genet.* 2005, 21, 281-286.

**Adres autora: dr Tomasz Strzala, ul. Koźuchowska 7, 51-631 Wrocław;**  
**e-mail: tomasz.strzala@up.wroc.pl**