

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja JELENČIČ

**VARSTVENA GENETIKA VOLKA (*Canis lupus*)
V SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja JELENČIČ

**VARSTVENA GENETIKA VOLKA (*Canis lupus*)
V SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA
Univerzitetni študij

**CONSERVATION GENETICS OF GREY WOLF (*Canis lupus*)
IN SLOVENIA**

DOCTORAL DISSERTATION
University studies

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 20. Seje Komisije za doktorski študij UL z dne 21. 9. 2011 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski študij Bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti na znanstvenem področju biologije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Peter Trontelj.

Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za ekologijo in varstvo okolja in Katedri za zoologijo, obe na Oddelku za biologijo na Biotehnični fakulteti Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Rudi VEROVNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član: prof. dr. Djuro HUBER
Univerza v Zagrebu, Veterinarska fakulteta
Član: doc. dr. Tomaž SKRBINŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 20. 9. 2016

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maja Jelenčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 577.21:599.744.111.1(043.3)=163.6
- KG varstvena genetika/genetska pestrost/križanje volka in psa/ identifikacija povzročiteljev škod/efektivna velikost populacije/ volk/*Canis lupus*
- AV JELENČIČ, Maja, univ.dipl.biol.
- SA TRONTELJ, Peter (mentor)
- KZ SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje biologije
- LI 2016
- IN VARSTVENA GENETIKA VOLKA (*CANIS LUPUS*) V SLOVENIJI
- TD Doktorska disertacija
- OP XI, 111 str., 7 pregl., 20 sl., 14 pril., 216 vir.
- IJ sl
- JI sl / en
- AI Volkovi v Sloveniji so del dinarsko-balkanske populacije na njenem severo-zahodnem robnem delu. Od tu imajo možnost rekolonizacije vzhodnih Alp in srečanja s populacijo, ki se širi iz Apeninov v zahodne Alpe, hkrati pa so kot robni del populacije še posebej občutljivi za stohastične dogodke. Rezultati analiz 34 mikrosatelitnih genetskih markerjev kažejo, da je genetska pestrost obravnavane populacije podobna pestrosti drugih evropskih volčjih populacij. Parjenje poteka približno naključno (koeficient sokrvja $F_{is} = 0,01$), med seboj pa se pariyo volkovi, ki so si v povprečju sorodni nekoliko manj kot bratranci in sestrične (individualni koeficient sokrvja $F = 0,05$). Ocenjena efektivna velikost je majhna ($N_e = 21,7-50,3$). Rezultati analize populacijskega ozkega grla sovpadajo z znanimi zgodovinskimi dejstvi o zmanjšanju številčnosti populacije zaradi preganjanja in iztrebljanja v 18., 19. in večino 20. stoletja. Z uporabljenim naborom markerjev smo volkove uspešno ločevali od psov, lisic in šakalov ter prepoznavali križance med volkom in psom. V Sloveniji, Gorskem Kotarju in Liki križancev praktično nismo zaznali, medtem ko je problem bolj izrazit v Dalmaciji, kjer smo kot povratne križance prepoznali v primeru 26 osebkov in dva potencialna križanca prve oziroma druge generacije. Z analizo vzorcev slin odvzetih s kadavrov pašnih živali na škodnih primerih smo kot eni prvih v svetu raziskali, ali škode, ki so pripisane volkovom, tudi dejansko povzročijo volkovi. Pri šestih odstotkih škodnih primerov z območja stalne prisotnosti volka v Sloveniji smo kot povzročitelja ugotovili psa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 577.21:599.744.111.1(043.3)=163.6
CX conservation genetics/genetic diversity/hybridization of wolf and domestic dog/predator identification at damage cases/effective population size/grey wolf/*Canis lupus*
AU JELENČIČ, Maja, univ.dipl.biol.
AA TRONTELJ, Peter (supervisor)
PP SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: biology
PY 2016
TI CONSERVATION GENETICS OF GREY WOLF (*CANIS LUPUS*) IN SLOVENIA
DT Doctoral dissertation
NO XI, 111 p., 7 tab., 20 fig., 14 ann., 216. ref.
LA sl
AL sl / en
AB Wolves in Slovenia belong to the most north-western part of the Dinaric-Balkan wolf population. From here they have an opportunity to recolonize the Eastern Alps and connect with the wolf population that extends from the Apennines to the Western Alps. At the same time such edge populations are particularly vulnerable to stochastic events. Results from analysis of 34 microsatellite genetic markers show that genetic diversity of the studied population is similar to diversity of other European grey wolf populations. Mating is approximately random ($F_{is} = 0,01$). Individual inbreeding coefficient (F) is estimated at 0,05, meaning that animals that mate are on average less related than full first cousins. Estimated effective population size is low ($N_e = 21,7-50,3$). Results of the population bottleneck test coincide with the historical data of reduction in population size due to persecution and extermination during the 18th, 19th and most of the 20th century. Set of genetic markers used, enabled us to successfully distinguish wolves from dogs, foxes and jackals, and recognize hybrids between wolves and dogs. Hybridization appears to be more frequent in Dalmatia, where we detected 26 backcrosses and two possible first or second generation hybrids. In Slovenia, Gorski Kotar and Lika only few backcrosses were found, possibly originating from Dalmatia as no hybrids of first or second generation were recorded in those three areas. By analyzing saliva samples collected from livestock carcasses at damage cases in the area of wolf permanent presence in Slovenia we found that most of the damages attributed to wolves, were actually caused by wolves. Only in six percent of damage cases dogs were detected.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED LITERATURE	2
2.1 VOLK	2
2.2 VOLKOVI IN VARSTVENA GENETIKA	6
2.2.1 Genetska variabilnost	6
2.2.2 Populacijska ozka grla	8
2.2.3 Parjenje v sokrvju	9
2.2.4 Efektivna velikost populacije	10
2.2.5 Križanje volka in psa	12
2.2.6 Prepoznavanje povzročiteljev škodnih primerov	14
3 OPREDELITEV PROBLEMA	17
3.1 CILJI DOKTORSKE DISERTACIJE	21
4 MATERIAL IN METODE	22
4.1 OBMOČJE VZORČENJA IN ZBIRANJE VZORCEV	22
4.2 SHRANJEVANJE IN IZOLACIJA DNA	24
4.2.1 Tkivni vzorci	24
4.2.2 Neinvazivni vzorci	25
4.2.2.1 Vzorci iztrebkov in urina	25
4.2.2.2 Vzorci dlake	26
4.2.2.3 Vzorci sline	26
4.3 PREPREČEVANJE KONTAMINACIJE IN ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI DELA	27
4.4 GENOTIPIZACIJA	28
4.4.1 Individualno prepoznavanje osebkov in protokoli PCR	28
4.4.2 Napake pri genotipizaciji in zagotavljanje zanesljivosti genotipov neinvazivnih genetskih vzorcev	30
4.4.3 Prepoznavanje vzorcev istih živali	31
4.4.4 Genotipizacija referenčnih vzorcev na dodatnem setu mikrosatelitnih lokusov	33

4.4.5	Ocena pojavljanja ničelnih alelov	33
4.5	DOLOČITEV VRSTE	35
4.5.1	Metoda glavnih komponent	35
4.5.2	Dodelitveni testi z Bayesovimi pristopi v programu STRUCTURE	36
4.6	POPULACIJSKO GENETSKE ANALIZE	37
4.6.1	Genetska pestrost	37
4.6.2	Analiza populacijskega ozkega grla	39
4.6.3	Koeficient sokrvja	40
4.6.4	Efektivna velikost populacije	41
4.7	ANALIZA ŠKODNIH PRIMEROV	45
5	REZULTATI	45
5.1	GENOTIPIZACIJA, NAPAKE PRI GENOTIPIZACIJI IN NIČELNI ALELI	45
5.2	POPULACIJSKO GENETSKE ANALIZE	47
5.2.1	Mere genske raznolikosti in primerjava z drugimi populacijami	47
5.2.2	Vezavno neravnovesje lokusov	49
5.2.3	Populacijsko ozko grlo	51
5.2.4	Ocena koeficienta sokrvja	52
5.2.5	Genetska pestrost štirih časovnih populacij SZ dinarske subpopulacije	53
5.2.6	Efektivna velikost populacije	54
5.3	LOČEVANJE VOLKOV IN PSOV TER PREPOZNAVANJE KRIŽANCEV	57
5.4	ŠKODNI PRIMERI IN UGOTAVLJANJE NJIHOVIH POVZROČITELJEV	61
5.4.1	Škodni primeri, ki so jih povzročili volkovi	66
5.4.2	Škodni primeri, ki so jih povzročili psi	69
6	RAZPRAVA	71
6.1	GENETSKA SLIKA SZ DINARSKE SUBPOPULACIJE VOLKA	71
6.2	PRIMERJAVA GENETSKE PESTROSTI VOLČJIH POPULACIJ V EVROPI	73
6.3	KRIŽANJE MED VOLKOM IN PSOM	76
6.4	ŠKODE NA DROBNICI NA OBMOČJU RAZŠIRJENOSTI VOLKOV	80
6.5	VARSTVENI VIDIKI NAŠIH UGOTOVITEV	82
7.	SKLEPI	86
8.	POVZETEK	88
8.1	POVZETEK	88

8.2	SUMMARY	90
9	VIRI	92
9.1	CITIRANI VIRI	92
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Referenčni vzorci volkov po tipu vzorca in letu vzorčenja.	24
Pregl. 2:	Protokoli PCR za vse štiri uporabljane multiplekse.	30
Pregl. 3:	Kritične vrednosti za redke alele za oceno N_e z metodo LD.	44
Pregl. 4:	Mere genetske raznolikosti za celotno dinarsko populacijo in za SZ dinarsko subpopulacijo za celotno časovno obdobje in za štiri časovne populacije.	47
Pregl. 5:	Primerjava genetske pestrosti SZ dinarske subpopulacije volka z drugimi populacijami.	49
Pregl. 6:	Rezultati testa preživetja ozkega grla SZ dinarske populacije volka po metodi presežka heterozigotov po predpostavkah TPM in SMM ter povprečna vrednost GW indeksa.	52
Pregl. 7:	Predpostavke metode LD in njihove kršitve v primeru obravnavane subpopulacije	56

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Območje stalne in občasne prisotnosti volka v Sloveniji in območja treh potencialnih dinarskih subpopulacij.	3
Sl. 2:	Ocenjena številčnost volkov v SZ Dinaridih v obdobju med 2010 in 2013.	4
Sl. 3:	Teritoriji volčjih tropov, ki so v letih od 2010 do vključno 2013 živeli v Sloveniji in na mejnem območju s Hrvaško.	5
Sl. 4:	Karta lokacij referenčnih vzorcev volkov zbranih med 2003 in 2013 na območju Slovenije in Gorskega Kotarja.	23
Sl. 5:	Število lokusov s katerimi je posamezni lokus v vezavnem neravnovesju.	50
Sl. 6:	Koeficient sokrvja F_{TrioML} za posamezne osebkke na časovni skali.	53
Sl. 7:	Ocena N_e z intervali zaupanja za različna časovna obdobja s tri-(krog) in štiriletnim (trikotnik) drsečim časovnim oknom ter ocena za obdobje intenzivnega spremljanja subpopulacije v Sloveniji in delu Gorskega Kotarja (2010-2013) (kvadrat).	55
Sl. 8:	Lastne vrednosti vektorjev in analiza glavnih komponent.	57
Sl. 9:	Rezultati dodelitvenih testov Structure analize (b) in rezultati metode glavnih komponent (a).	58
Sl. 10:	p vrednosti posameznih vzorcev, da je vzorec volčji.	59
Sl. 11:	Prostorsko razporejanje vzorcev zaznanih križancev.	60
Sl. 12:	Deleži zaznanih vrst v vzorcih (levo) in delež vrst zaznanih v vzorcih na škodnih primerih za katere smo določili povzročitelje oziroma živali, ki se sekundarno prehranjujejo na kadavrih (desno).	61
Sl. 13:	Delež vzorcev odvzetih z različnih delov kadavra (levo), delež vrst zaznanih v vzorcih odvzetih z vratu (desno).	62
Sl. 14:	Deleži uspešno in neuspešno analiziranih škodnih primerov (levo) in deleži škodnih primerov glede na ugotovljenega povzročitelja škode (desno).	63
Sl. 15:	Število zbranih vzorcev od ocenjenega časa nastanka škode do odvzema vzorcev.	64
Sl. 16:	Vrste zaznane na kadavrih glede na čas, ki je pretekel od ocenjenega časa nastanka škode do odvzema vzorcev.	65
Sl. 17:	Število na ZGS zabeleženih škodnih primerov glede na geografsko regijo in sezono spremljanja populacije volka.	66
Sl. 18:	Časovno razporejanje škodnih primerov po volkovih, ki smo jih potrdili z genetskimi metodami, glede na meje znanih teritorijev.	68

Sl. 19:	Prostorski prikaz škodnih primerov v Sloveniji med 2010 in 2013.	70
Sl. 20:	Območja razširjenosti volka v obdobju med 1950 in 1970 (levo) in leta 2011 (desno).	76

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Tipi neinvazivnih vzorcev.
- PRILOGA B: Lokusi uporabljeni v naši študiji.
- PRILOGA C: Frekvence alelov za lokuse v multipleksu ID za razločevanje vzorcev volka, psa, lisice in šakala.
- PRILOGA D: Uspešnost genotipizacije in ocene napak za referenčne vzorce.
- PRILOGA E: Ocena frekvenc pojavljanja ničelnih alelov.
- PRILOGA F: Razmerje med pričakovano in opaženo heterozigotnostjo za 35 lokusov analiziranih za celotno Dinarsko populacijo (A) in za SZ dinarsko subpopulacijo.
- PRILOGA G: Mere genetske raznolikosti za celotno dinarsko subpopulacijo in SZ dinarsko subpopulacijo.
- PRILOGA H: Primerjava genetske pestrosti SZ dinarske subpopulacije z drugimi populacijami.
- PRILOGA I: Vezavno neravnovesje lokusov.
- PRILOGA J: Razmerje med pričakovano in opaženo heterozigotnostjo za posamezno časovno populacijo pred aktivnim spremljanjem volkov in od 2010 do 2013.
- PRILOGA K: Ocena koeficienta sokrvja F .
- PRILOGA L: Ocena efektivne velikosti (N_e) s pripadajočimi intervali zaupanja za posamezne časovne populacije v obdobju od leta 2003 do 2013.
- PRILOGA M: Razlikovanje volkov in psov ter prepoznavanje križancev.
- PRILOGA N: Volkovi, ki smo jih zaznali na škodah.

1. UVOD

Volk je v odnosu ljudi do narave vedno zavzemal posebno mesto, saj je zaradi socialnega načina življenja, lovnih potreb in tehnik, teritorialnosti ter velike vedenjske in ekološke prilagodljivosti človeku skozi vso zgodovino predstavljal sopotnika in tekmeca (Boitani, 2000). Nekateri ga še danes vidijo kot zlobno zver, ki pleni in ubija domače živali in divjad, drugim pa predstavlja simbol neokrnjene narave in pomemben del naravne dediščine. Vedno nova znanstvena spoznanja pa razkrivajo, kako pomemben vpliv na delovanje ekosistema imajo živalske vrste v vrhu prehranskih spletov, katerih predstavnik je tudi volk (Ray in sod., 2005; Estes in sod., 2011; Ripple in sod., 2014). Hkrati volkovi praktično povsod, kjer sobivajo s človekom, z njim in njegovimi aktivnostmi prihajajo v konflikt. Iskanje kompromisov med življenjskimi potrebami volka in potrebami, pričakovanji ter zahtevami ljudi, ki so potrebni za varstvo in upravljanje populacije, je posledično zahtevno.

Pred petimi leti je ocena številčnosti in sploh poznavanje volka v Sloveniji večinoma temeljilo na opažanjih in ne na znanstveno preverljivih podatkih, ki bi morali biti osnova za varstveno upravljanje populacije. Po drugi strani samo poznavanje velikosti populacije, ki je pri populacijah velikih zveri pogostokrat glavni predmet razprav, ni dovolj za načrtovanje ustreznih ukrepov, tako varstvenih kot upravljavskih. Ker so volkovi v Sloveniji le najbolj severozahodni del dinarsko-balkanske populacije volka in so kot majhen in robni del populacije še posebej občutljivi na stohastične dogodke, je pomembno tudi dobro poznavanje demografskih lastnosti populacije, sprememb v njej in razumevanje vplivov različnih dejavnikov. Poleg tega je pomen genetskih procesov, ki potekajo v populacijah in imajo ključen pomen za njihovo preživetje, vedno bolj prepoznan tudi kot pomemben dejavnik za ohranjanje biodiverzitete (Frankham in sod., 2002). Območje Slovenije predstavlja povezavo med Dinaridi in vzhodnimi Alpami, kar pomeni, da bi volkovi z zahodnega dela Slovenije lahko rekolonizirali alpski prostor in se tam srečali s populacijo volkov, ki se širi preko Apeninov vse do zahodnih Alp. Prvič je bil tak dogodek dokumentiran leta 2011 (Ražen in sod., 2016). Tudi zato je vitalnost slovenskega dela populacije volka pomembna za nadaljnje širjenje vrste v vzhodno Italijo in južno Avstrijo (Adamič in sod., 1998).

V Sloveniji smo volkove s pomočjo metod molekularne genetike začeli proučevati v projektu »Varstvo in spremljanje varstvenega statusa populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji (2010 - 2013) – SloWolf« pod okriljem katerega je nastala tudi pričujoča doktorska disertacija. Cilj našega dela je bil dobiti vpogled v genetsko sliko populacije in postaviti temelje za njeno spremljanje s pomočjo metod molekularne genetike.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 VOLK

V preteklosti so volkovi živeli praktično na celotni severni polobli, v 18., 19. in večino 20. stoletja pa so bili na številnih območjih močno preganjani in iztrebljeni z velikega dela svojega zgodovinskega areala. Preganjani so bili večinoma kot škodljivci ali pa da bi se zmanjšale škode, ki jih volkovi povzročijo na domačih živalih (Boitani, 2000; Randi, 2011). Večje populacije so ostale le na Aljaski, v Kanadi in Rusiji, medtem ko so populacije v južno-centralni Aziji, ZDA in v Evropi upadale vse do 60-ih let prejšnjega stoletja (Boitani, 2000; 2003). V Evropi so takrat ostale le majhne izolirane populacije v Karpatih, na Balkanu, na Iberskem in na Apeninskem polotoku (Breitenmoser, 1998; Boitani, 2003; Randi, 2011). V drugi polovici 20. stoletja se je podeželje izpraznilo, saj se je veliko prebivalstva preselilo v mesta, spremenila se je zakonodaja, ki je volka zdaj zaščitila, prepovedalo se je zastrupljanje volkov, opomogle so si tudi populacije prostoživečih parkljarjev, hkrati pa se je povečala tudi ozaveščenost javnosti. Vse to je prispevalo k povečevanju volčjih populacij in njihovemu širjenju. Nedvomno je k vračanju na območja volkove zgodovinske razširjenosti pripomogla tudi njegova prilagodljivost in sposobnost preživetja v različnih okoljih (Randi, 2011; Chapron in sod., 2014).

Tudi dinarsko-balkansko populacijo, katere del so volkovi v Sloveniji, je doletela podobna usoda. Volkovi v severnih Dinaridih zaradi majhne poseljenosti tega območja z ljudmi in njim nedostopnega terena niso nikoli povsem izumrli, so pa bili v zadnjih 150 letih vsaj trikrat močno zdesetkani (Adamič in sod., 2004; Štrbenac in sod., 2005). Populacija sicer danes poseljuje dinarsko območje od meje z Italijo na zahodu, vzdolž Dinaridov do goratih območij v Grčiji na jugu, na vzhodu pa poseljuje območje Balkana in Rodopov v Bolgariji,

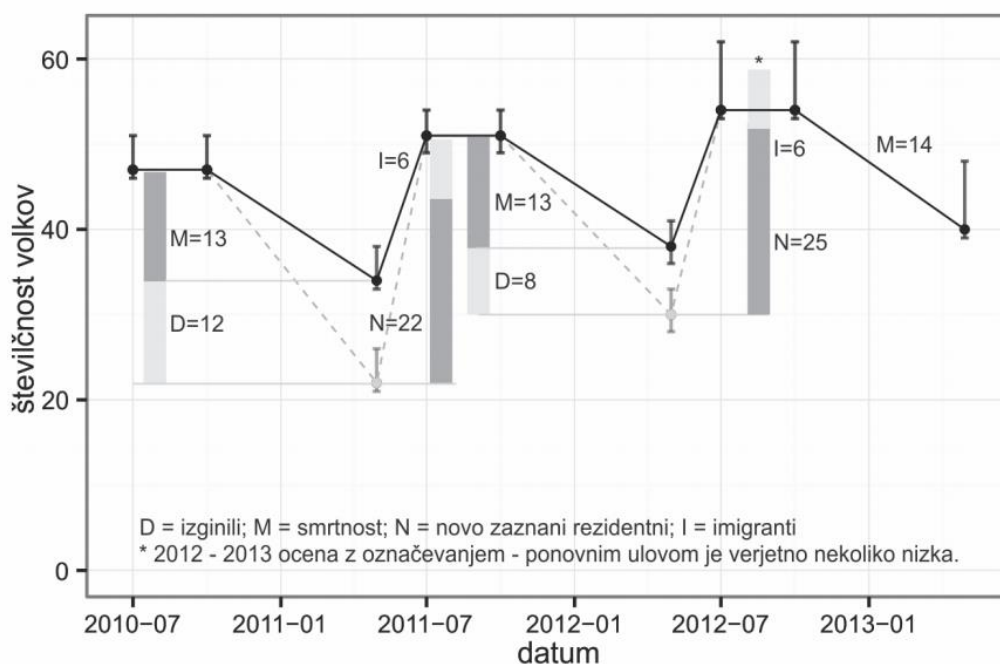
kar pomeni, da se razteza čez kar osem držav (slika 1). Trenutno je to ena največjih populacij v Evropi, ki po ocenah šteje okoli 3900 osebkov (Kaczensky in sod., 2012a; Chapron in sod., 2014). Povezljivost celotne populacije je slabo poznana (Kaczensky in sod., 2012a), v svoji nedavni študiji pa so Fabbri in sod. (2014) ugotovili, da je že dinarski del populacije razdeljen v vsaj dve oziroma tri subpopulacije. Ena se nahaja na območju Dalmacije, druga na območju Like in tretja na območju Gorskega Kotarja (slika 1). Na območju Like prihaja do mešanja volkov iz Dalmacije in z Gorskega Kotarja. Najbolj severnemu delu populacije pa pripadajo tudi volkovi v Sloveniji, saj ima skoraj polovica tropov, ki jih imamo v Sloveniji, čezmejne teritorije. Tudi na območju Slovenije so si volkovi opomogli in se zdaj vračajo tudi v Alpe (Fabbri in sod., 2014; Ražen in sod., 2016).



Slika 1: Območje stalne in občasne prisotnosti volka v Sloveniji (Potočnik in sod., 2014) **in območja treh potencialnih dinarskih subpopulacij** (Fabbri in sod., 2014), ki ustrezajo hrvaškim nacionalnim upravljavskim enotam (Vir: Majić in Bath, 2010; Štrbenac in sod., 2005). Območje Slovenije in Gorskega Kotarja predstavlja območje iste subpopulacije. V zgornjem desnem kotu je zemljevid območja razširjenosti celotne dinarsko-balkanaske populacije volka (Vir: Chapron in sod., 2014).

Figure 1: Area of wolf permanent and occasional presence in Slovenia (Potočnik et al., 2014) and range of the possible three Dinaric subpopulations (Fabbri et al., 2014), which correspond to Croatian national management areas (vir: Štrbenac et al., 2005; Majić and Bath, 2010). Slovenia and Gorski Kotar host a single subpopulation. Distribution map of Dinaric-Balkan wolf population (Source: Chapron et al., 2014) is shown in the right upper corner.

V severno zahodnem delu Dinaridov je v obdobju intenzivnega spremljanja populacije (2010-2013) v približno dvanajstih tropih živelo med 46 in 62 volkov (slika 2). Sedem tropov je imelo teritorije vzpostavljene v Sloveniji, štiri do pet pa jih je imelo čezmejne teritorije (Potočnik in sod., 2014). V istem obdobju je v Gorskem Kotarju živelo še osem do deset tropov (Jeremić in sod., 2013). Povprečna velikost teritorijev volčjih tropov v Sloveniji se je gibala med 259 in 560 km² (Potočnik in sod., 2014), v Gorskem Kotarju je bila povprečna velikost teritorija 350 km², na Velebitu pa 736 km² (Jeremić in sod., 2013). V Dalmaciji pa so teritoriji tropov veliki od 150 do 200 km² (Kusak in sod., 2005).



Slika 2: Ocenjena številčnost volkov v SZ Dinaridih v obdobju med 2010 in 2013. Letno nihanje številčnosti populacije poleg novorojenih volkov (N) in imigrantov (I), vključuje tudi znano smrtnost volkov (M) in izginule volkove (D), ki v naslednji sezoni niso bili več zaznani (migranti in nepoznana smrtnost). Za sezono 2012-2013 je številčnost zaradi slabega vzorčenja čezmejnih tropov morda nekoliko podcenjena (Potočnik in sod., 2014).

Figure 2: Estimated number of wolves in NW Dinaric region between 2010 and 2013. X-axis shows time and Y-axis number of animals. Yearly fluctuation in estimated number includes new residents/newborn animals (N) and immigrants (I), known wolf mortality (M) and disappeared wolves (D), wolves that had dispersed or their death was not documented. *The number for 2012 and 2013 is possibly underestimated due to poor sampling of cross-border packs (Potočnik et al., 2014).



Slika 3: Teritoriji volčjih tropov, ki so v letih od 2010 do vključno 2013 živeli v Sloveniji in na mejnem območju s Hrvaško (Vir: Potočnik in sod., 2014).

Figure 3: Territories of wolf packs living in Slovenia and the border area with Croatia during 2010 and 2013 (Source: Potočnik et al., 2014).

Glede na to, da volkovi spet poseljujejo velika območja in so njihove populacije stabilne, ali pa se prostorsko celo širijo, so v svetovnem merilu na rdečem seznamu obravnavani kot vrsta zunaj nevarnosti (Mech in Boitani, 2010). Vseeno pa so na lokalni ravni številne populacije ogrožene in ne dosegajo kriterijev viabilnih populacij. Ne glede na to, da se tudi v Evropi danes volkovi vračajo na številna območja, ki so jih poseljevali v preteklosti (Chapron in sod., 2014), se populacije soočajo z različnimi dejavniki ogrožanja, kot so slabo sprejetje med ljudmi (ali slab odnos ljudi do volka), izguba habitata zaradi razvoja

infrastrukture, preganjanje, slabi upravljavski načrti in smrtnost v prometu (Kaczensky in sod., 2012a). Visoka smrtnost, ki je posledica različnih dejavnikov ogrožanja, ima velik učinek na populacije, še posebej na delovanje volčjih tropov (Jędrzejewski in sod., 2005; Rutledge in sod., 2010; Borg in sod., 2014), disperzijo, povezljivost znotraj populacije in z drugimi populacijami (Kojola in sod., 2009; Aspi in sod., 2009; Hindrikson in sod., 2013), parjenje v sokrvju ter križanje s psi in drugimi sorodnimi vrstami (Linnell in sod., 2008; Randi, 2011; Rutledge in sod., 2012; Moura in sod., 2013).

2.2 VOLKOVI IN VARSTVENA GENETIKA

Za dolgoročno preživetje populacij so pomembni tako demografski kot genetski dejavniki, ki se med seboj močno prepletajo. Eden od ključnih dejavnikov, ki vplivajo na stanje populacije in stopnjo tveganja za izumrtje, je velikost populacije, pri čemer so majhne populacije bolj podvržene genetski eroziji (Frankham, 2005). Eden od temeljnih problemov, ki jih obravnava varstvena genetika so prav majhne populacije in posledični genetski problemi, ki se v takih populacijah pojavljajo (Bouzat, 2010).

Ne glede na to, da je dinarsko-balkanska populacija trenutno ena večjih evropskih populacij, zaradi potencialne izoliranosti v posamezne subpopulacije v vsaki od njih lahko potekajo in pridejo do izraza učinki procesov, katerih delovanje je močnejše izraženo v majhnih populacijah.

2.2.1 Genetska variabilnost

Genetska variabilnost je v populacijah kratkoročno pomembna z vidika reprodukcijskega fitnesa in na dolgi rok kot evolucijski potencial, saj predstavlja osnovo za selekcijo in sposobnost prilagajanja spreminjanju okolja (Frankham, 2005). Tako je kljub številnim zmanjšanjem populacij večine vrst, ki so posledica antropogenih in ekoloških dejavnikov, vključno z uničevanjem habitata, vnosom eksotičnih vrst, demografsko stohastičnostjo in naravnimi nihanji, dolgoročen obstoj naravnih populacij odvisen predvsem od ohranitve njihove genetske pestrosti (Bouzat, 2010). Kakšna bo genetska pestrost populacije je odvisno od velikosti populacije, pretoka genov, naravne selekcije in od stopnje mutacije

(Frankham, 1996). Ker je stopnja mutacij načeloma nizka, je v praksi njena vloga v krajših časovnih obdobjih majhna. Tako imata glavno vlogo velikost populacije oziroma efektivna velikost in genski pretok. Stopnjo genetske pestrosti v populaciji (npr. število alelov, stopnja heterozigotnosti in polimorfizem) v nekem časovnem obdobju omejuje njena velikost oziroma natančneje efektivna velikost populacije (N_e), ki jo poenostavljeno razumemo kot število osebkov v populaciji, ki se pari. V majhnih populacijah učinek selekcije postane manjši, eden glavnih mehanizmov delovanja pa postane naključni genetski zdrs, mehanizem genetske stohastičnosti (naključja), ki preko naključnega izbora gamet in s tem naključnimi spremembami v frekvencah alelov iz generacije v generacijo, vodi v zmanjšanje heterozigotnosti in genetske pestrosti. Povečana homozigotnost osebkov v visokem sokrvju preko ekspresije večjega števila škodljivih recesivnih alelov in v primerih naddominance (seleksijska prednost heterozigotov pred homozigoti) na posameznih lokusih zmanjšuje njihov fitness. Mutacija in genski pretok pa sta procesa, ki delujeta nasprotno od genetskega zdrsa in tako omogočata pojav novih alelov ter s tem povečujeta genetsko pestrost. Dolgoročno je genetska pestrost najbolje ohranjena v velikih populacijah oziroma v metapopulacijah. Količina genetske pestrosti v populaciji daje vpogled v demografsko strukturo in evlucijsko zgodovino populacije (Allendorf in Luikart, 2007).

Eden od osnovnih parametrov, ki se jih preverja in spremlja pri populacijah prostoživečih živali, je torej tudi genetska pestrost (npr.: (Flagstad in sod., 2003; Aspi in sod., 2006; Fabbri in sod., 2007; Sastre in sod., 2010; Jansson in sod., 2012; Hindrikson in sod., 2013; Caniglia in sod., 2014)). Z vidika razumevanja in ovrednotenja genetskega stanja populacij ter ocene tveganja za depresijo (zmanjšanje fitnesa) zaradi parjenja v sokrvju je primerjava genetske pestrosti populacij z njihovega areala (ali večjega dela območja razširjenosti) pomembna in uporabna. Kljub temu, da je razpoložljiva velika količina podatkov, je zaradi različnih metod, ki se uporabljajo v različnih laboratorijih, primerjava oziroma združevanje podatkov za različne populacije težavno (Swenson in sod., 2011; Skrbinšek in sod., 2012b; De Groot in sod., 2016). Zaradi velike sorodnosti s psi, ki so predmet številnih genetskih raziskav, obstaja širok nabor genetskih markerjev, ki jih je mogoče uporabiti v študijah volkov. Laboratoriji, ki proučujejo sosednje ali celo iste populacije, si tako trenutno izmenjujejo referenčne vzorce, nekateri pa imajo poenoten manjši set markerjev, ki

omogoča npr. prepoznavanje migrantov (De Groot in sod., 2016). Za namen primerjave populacij so Skrbinšek in sod. (2012b) razvili metodo, ki temelji na uporabi referenčne populacije. Slednja mora imeti velik vzorec, veliko število genotipiziranih lokusov in veliko genetsko pestrost. Uporaba metode je podrobneje razložena v poglavju metod, saj smo jo uporabili za primerjavo genetske pestrosti SZ dinarske subpopulacije volka in drugih evropskih populacij.

2.2.2 Populacijska ozka grla

Populacije, ki preživijo drastična številčna zmanjšanja - ozka grla, zaradi delovanja naključnega genetskega zdrsa (ki je v populacijskih ozkih grlih običajno zelo močan) izgubijo genetsko pestrost, kar ima lahko različne učinke na demografske parametre, kot npr. preživetje in reprodukcijsko sposobnost, tako na ravni posameznega osebka kot populacije (Bouzat, 2010). S padcem genetske pestrosti se v takih populacijah viša tudi parjenje v sokrvju. Izid populacijskega ozkega grla ni povsem predvidljiv, saj je odvisen od naključja, selekcije, zgodovine populacije in njene genetske sestave po preživetju ozkega grla (Bouzat, 2010). Velika številčna zmanjšanja vplivajo na variabilnost kvantitativnih lastnosti in posledično na aditivno genetsko variabilnost ter selekcijski potencial (Bouzat, 2010). V genskem skladu populacije pa pustijo znamenje tudi na selekcijsko nevtralnih markerjih, na podlagi katerih jih lahko z molekularno genetskimi metodami zaznamo (Cornuet in Luikart, 1996; Luikart in sod., 1998; Garza in sod., 2001). Enako posledico ima tudi učinek ustanovitelja, kjer populacija izhaja iz majhnega števila osebkov, ki prispevajo svoje gene v genski sklad nove populacije. Kratkotrajna ozka grla imajo lahko relativno majhen učinek na zmanjšanje heterozigotnosti, medtem ko se alelska pestrost lokusov močno zmanjša že v eni generaciji. Če populacija dlje časa ostaja v nizki številčnosti (daljše trajanje populacijskega ozkega grla), se pospešeno zmanjšuje tudi heterozigotnost. Velike spremembe v frekvencah alelov iz generacije v generacijo lahko povzročijo povečanje frekvence škodljivih alelov. Ralls in sodelavci (1988) so na osnovi analize 40 sesalskih populacij ocenili, da je povprečna pogostost škodljivih alelov izraženih s številom letalnih ekvivalentov v posameznem genomu 3,14. To pomeni, da je v vsakem osebku večje število škodljivih (subletalnih) recesivnih alelov, ki se sicer v heterozigotnem stanju fenotipsko ne izrazijo (Allendorf in Luikart, 2007). Migracije in

mutacije sicer lahko sledove ozkega grla zabrišejo že v nekaj generacijah in jih posledično z genetskimi metodami ni mogoče vedno zaznati (Keller in sod., 2001; Busch in sod., 2007).

Zahodnoevropske populacije volkov so bile več stoletij fragmentirane in izolirane. Zaradi delovanja genetskega zdrsa imajo te populacije unikatne mtDNA haplotipe in zmanjšano avtosomalno genetsko pestrost (Randi, 2011). Tudi druge evropske populacije so preživele ozka grla, vendar pa so zaradi medsebojne povezanosti in genetskega pretoka uspele ohraniti večjo genetsko pestrost (npr. (Hindrikson in sod., 2013)). Volkovi lahko v procesu disperzije migrirajo na več kot 800 km dolge razdalje (Wabakken in sod., 2001; Linnell in sod., 2005; Kojola in sod., 2009; Ražen in sod., 2016), večinoma pa si ustvarijo teritorije v razdalji do 200 km od rodnega tropa (Kojola in sod., 2009). To kaže na dobro demografsko in genetsko povezljivost posameznih populacij. Disperzija je torej eden od načinov, ki pri fragmentiranih populacijah volkov zmanjšuje učinek genetskega zdrsa oz. diferenciacijo med lokalnimi populacijami (Pilot in sod., 2006). Po drugi strani pa je zaradi kompleksne socialne organiziranosti, visoke stopnje teritorialnosti in tudi zaradi človekovega poseganja v populacije verjetnost uspešnega prenosa genov posameznega mladega in manj izkušenega volka v novo populacijo zmanjšana (Hindrikson in sod., 2013). Genski pretok med populacijami je posledično kljub imigraciji dostikrat vseeno vprašljiv (Moura in sod., 2013; Hindrikson in sod., 2013; Czarnomska in sod., 2013; Fabbri in sod., 2014).

2.2.3 Parjenje v sokrvju

Ena od posledic zmanjšanja velikosti populacije in njene izoliranosti je parjenje v sokrvju ter s tem povečanje stopnje homozigotnosti. V majhnih in izoliranih populacijah je parjenje v sokrvju praktično neizogibno, saj do njega prihaja tudi kadar je parjenje sicer naključno, ker so si znotraj take populacije praktično vsi osebki sorodni (Allendorf in Luikart, 2007). Učinek zmanjšanja genetske pestrosti na zmanjšanje fitnesa je običajno počasen in je povezan z okoljskim stresom, medtem ko ima parjenje v sokrvju skupaj z depresijo zaradi parjenja v sokrvju takojšen učinek (Frankham, 2005). Pri depresiji zaradi parjenja v sokrvju prihaja do povečanja homozigotnosti in izražanja recesivnih škodljivih alelov ter zmanjšanja frekvence heterozigotnih genotipov z boljšim fitnesom. Osebki v takih

populacijah imajo zmanjšano sposobnost preživetja in nižjo reprodukcijsko sposobnost potomcev. To vodi v zmanjšanje števila živali v populaciji in še večjo možnost parjenja med sorodnimi osebki - torej v vrtinec izumiranja. Zmožnost populacije, da se temu izogne, pa je odvisna od efektivne velikosti populacije (N_e) (Frankham, 2005).

Depresijo zaradi parjenja v sokrvju in njene negativne učinke so potrdili pri dveh izoliranih volčjih populacijah, ki poleg tega izhajata iz zelo majhnega števila osebkov. Gre za skandinavsko populacijo (Liberg in sod., 2005) in za volkove na otoku Isle Royale v Gornjem jezeru Velikih jezer Severne Amerike (Räikkönen in sod., 2009; Adams in sod., 2011). Pri volkovih iz obeh populacij so zabeležili močno povečan koeficient sokrvja (0,81 na Isle Royale (Adams in sod., 2011), 0,41 v Skandinaviji (Liberg in sod., 2005)) in različne prirojene napake kosti, predvsem čeljusti in vretenc, pri skandinavski populaciji pa tudi zmanjšanje preživetja zime pri mladičih.

Parjenje v sokrvju je pri volkovih v naravi sicer redko (Smith in sod., 1997; Liberg in sod., 2005; Von Holdt in sod., 2008), saj imajo razvite različne evolucijske vedenjske vzorce, ki ga preprečujejo, kot npr. disperzija mladih osebkov, hierarhično urejena reprodukcija oziroma parjenje, generacijski obrat v tropih, razpad tropa ob izgubi reproduktivnega osebka (Von Holdt in sod., 2008). Geffen in sod. (2011) pa so v svoji študiji aktivno izogibanje parjenju v sokrvju postavili pod vprašaj. Ugotovili so, da bi stopnja parjenja v sokrvju pri socialnih kanidih lahko bila vezana na bližino bližnjih sorodnikov, ki jih kot člane tropa izključuje kot potencialne partnerje, medtem ko je parjenje izven rodnega tropa naključno - ne glede na sorodnost med potencialnima partnerjema.

2.2.4 Efektivna velikost populacije

Velikost populacije je pomembna z vidika ekoloških procesov, kot so kompeticija, predacija, populacijska rast. Evolucijski procesi, vključno s stopnjo genetskega zdrsa, izgubo genske pestrosti, učinkovitostjo selekcije in pretokom genov pa so primarno odvisni od efektivne velikosti populacije (N_e), ki je, kot posledica razlik med osebki in njihovim prispevkom v naslednjo generacijo, običajno manjša od velikosti populacije (Waples in sod., 2014). Efektivna velikost populacije je posledično eden od temeljnih parametrov v

evolucijski genetiki in varstveni biologiji (Waples, 2002). Definirana je kot velikost Wright-Fisherjeve populacije (Fisher, 1930; Wright, 1931), ki bi izgubljala genetsko pestrost in nabirala sokrvje enako hitro kot naravna populacija, ki jo preučujemo (Crow in Kimura, 1970). Populacije z majhno efektivno velikostjo so večinoma močno izpostavljene genetskemu zdrsu in izgubi evolucijskega potenciala in so tako bolj nagnjene k depresiji zaradi parjenja v sokrvju (Keller in Waller, 2002). Poleg neposrednega učinka na stopnjo genetskih sprememb, efektivna velikost populacije določa tudi relativni pomen migracije in selekcije; ta dva procesa sta prevladujoča v velikih populacijah, v majhnih pa v ospredje pridejo drugi naključni procesi (Waples, 2005). Zato je poznavanje efektivne velikosti populacije in različnih dejavnikov, ki nanjo vplivajo z vidika varstva in upravljanja prostoživečih populacij pomembno (Luikart in sod., 2010). Naravne populacije od predpostavk za idealno populacijo odstopajo z različnih vidikov. Efektivna velikost populacije je običajno veliko manjša od cenzusa (N_c), posledično so tudi razmerja med njima relativno majhna in nestabilna, če so dejavniki, ki vplivajo na efektivno velikost populacije, nestabilni (Palstra in Ruzzante, 2008). Dejavniki, ki imajo velik vpliv na efektivno velikost populacije so nihanja v velikosti populacije, porušeno spolno razmerje in varianca v reprodukcijskem uspehu (Frankham, 1995).

V teoriji populacije heterozigotnost izgublja z $1/2Ne$ na generacijo, hkrati pa se povečuje koeficient sokrvja (Von Holdt in sod., 2008). Za skandinavsko populacijo volka so ugotovili, da je izgubila po 2 % heterozigotnosti na generacijo (Bensch in sod., 2006). Za leta 1997 ponovno naseljeno populacijo v ameriškem nacionalnem parku Yellowstone pa von Holdt in sod. (2008) niso zaznali zmanjšanja heterozigotnosti, niti povečanja koeficienta sokrvja. Razlog je mogoče iskati v dobro načrtovani reintrodukciji, saj je bila efektivna velikost populacije tedaj razmeroma velika, populacija je hitro rasla (kar upočasnjuje genetski zdrs), hkrati pa imajo pomembno vlogo tudi mehanizmi za izogibanje parjenju v sokrvju (Von Holdt in sod., 2008). Tudi reintrodukcija risa v Dinaride je bila dolgo časa prepoznana kot uspešna, vendar pa so Sindičić in sod. (2013) ugotovili porast koeficienta sokrvja (z 0,22 v obdobju med 1979 in 1990 na 0,3 med 1990 in 2010) in manjšanje efektivne velikosti populacije. Možen razlog za upad populacije poleg ilegalnega lova, smrtnosti v prometu in zmanjšanja plenske baze vidijo tudi v depresiji zaradi parjenja v sokrvju.

2.2.5 Križanje volka in psa

Križanje s sorodnimi domačimi vrstami je problematično predvsem z vidika posledic intenzivne umetne selekcije pri domačih pasmah, da bi te ustrezale zahtevam ljudi, hkrati pa je mogoče pričakovati, da se je pri tem povečala verjetnost akumulacije škodljivih alelelov in izguba prilagoditev, potrebnih za preživetje v divjini. Križanje in introgresija genov lahko, zlasti v obdobjih populacijskega ozkega grla oziroma v majhnih populacijah, rušita prilagoditve lokalne populacije, kar lahko vodi v nadaljnje zmanjšanje populacije in v izgubo genetske pestrosti (Allendorf in sod., 2001; Randi, 2008). V skrajnih primerih lahko intenzivno križanje vodi do genetskega izumrtja populacije (Allendorf in sod., 2001).

Volk je prednik psa (Vilà in sod., 1997), vrsti sta si zelo sorodni, imata identičen kariotip in se lahko med seboj parita ter imata plodne potomce (Mengel, 1971; Vilà in Wayne, 1999). Psi so prisotni na celotnem območju razširjenosti volka, na svetu pa jih živi okoli 700 milijonov do 1 milijarde, pri čemer je do 75 % vseh psov potepuških (free-ranging) (Hughes in Macdonald, 2013). Med volkom in psom obstaja vsaj pet oblik interakcij, ki so pomembne z vidika ohranjanja volka: i) pse se uporablja za varovanje pašnih živali pred napadi volkov, ii) volkovi lahko psa ubijejo, iii) psi lahko na volkove prenašajo bolezni, iv) potepuški psi so volkovom lahko tekmeci za hrano in v) med njimi prihaja do križanja (Linnell in sod., 2008). Podatkov o vedenju prostoživečih križancev ni (Linnell in sod., 2008; Lescureux in Linnell, 2014), pričakovati pa je, da križanci, v primerjavi z volkovi, zaradi prilagoditev, povezanih z udomačitvijo, večkrat kažejo neželena vedenja, kot npr. da imajo v primerjavi z volkovi imajo manj strahu pred ljudmi in večjo tendenco za plenjenje drobnice (Linnell in sod., 2008; Randi, 2011).

Do križanja med volkovi in psi v naravnih in stabilnih volčjih populacijah prihaja redko (Wayne in Vilà, 2003), saj je verjetnost takega dogodka zmanjšana zaradi razmeroma zaprtega socialnega načina življenja volkov in njihovega načina parjenja, pri katerem je vez med reproduktivnim parom razmeroma trajna. Možnost križanja dodatno zmanjšuje izrazito teritorialno vedenje volkov, pri čemer na svojem teritoriju ne trpijo tujih osebkov. Križanci so se sicer večinoma pojavljali na robnih območjih razširjenosti volka (bližje človeških bivališč) ali na območjih, kamor so se volkovi ne dolgo nazaj vrnili, kjer je torej

populacijska gostota volkov manjša, potepuških psov pa lahko večja (Wayne in Vilà, 2003). Do križanja lahko prihaja tudi kjer vrsta obstaja kot majhna populacija (primer etiopskega volka (*Canis simensis*)), ali ko mlad še ne-teritorialen volk ne najde primerne družice (Leonard in sod., 2013). Verjetnost križanja je večja tudi v volčjih populacijah s porušeno socialno strukturo, ki je lahko posledica velikega poseganja v populacijo (visok odstrel oziroma drugi dejavniki povečane smrtnosti). Ob odstreli ali poginu dominantne, reproduktivne živali v tropu obstaja velika verjetnost, da bo trop razpadel, ob pogostem razpadanju tropov pa se poveča verjetnost parjenja med člani razpadlega tropa in psi. Prav tako pa se poveča verjetnost parjenja med preostalim dominantnim, reproduktivnim volkom, in enim izmed njegovih potomcev, ter tako dopušča večjo možnost parjenja v sokrvju (Linnell in sod., 2008).

V glavnem velja asimetričen vzorec križanja, saj se v večini primerov volkulja pari s psom (Andersone in sod., 2002; Vilà in sod., 2003b; Verardi in sod., 2006; Randi, 2008; Godinho in sod., 2011). V dveh primerih je bilo zabeleženo križanje med psico in volkom (Muñoz-Fuentes in sod., 2009; Hindrikson in sod., 2012). Za razliko od volka pa je npr. pri etiopskem volku situacija ravno obratna, saj samica v času parjenja zapusti trop in se lahko takrat spari s potepušskimi psi (Gottelli in sod., 1994).

Križance med volkom in psom je zaradi sorodnosti taksonov in posledične velike genetske podobnosti tudi s pomočjo molekularno genetskih metod težavno ločevati (Von Holdt in sod., 2013). Kot markerje se v ta namen uporablja predvsem mikrosatelite (npr. (Randi, 2008; Godinho in sod., 2011; Moura in sod., 2013)), za proučevanje vloge obeh spolov v procesu križanja pa se uporablja mtDNA (npr. (Randi, 2008; Godinho in sod., 2011; Moura in sod., 2013) in markerje na kromosomu Y (Vilà in sod., 2003b; Godinho in sod., 2011). V zadnjih letih pa se tudi v te namene uporablja točkovne polimorfizme (SNP) (Von Holdt in sod., 2013). V študijah križancev se večinoma uporablja tkivne vzorce volkov oziroma potencialnih križancev, ki jih je včasih razmeroma težko pridobiti, saj gre večinoma za poginule živali. Pridobljeni podatki tako dejansko pokažejo sliko za nekaj časa nazaj in ne tisti trenutek, kar pomeni, da gledamo stanje populacije z nekaj časovnega zamika, hkrati pa lahko veliko živali pri vzorčenju tudi zgrešimo (migracije, ne najdemo trupla, krivolov). Glede na veliko uporabnost neinvazivnih genetskih vzorcev, njihovo

priljubljenost v študijah spremljanja populacij in vedno boljše laboratorijske metode je uporaba teh vzorcev, kljub njihovi slabši kvaliteti, prav tako smiselna za detekcijo križancev, hkrati pa bi to omogočilo skrajšanje zamude v upravljaljskih prizadevanjih za reševanje problematike križanja (Godinho in sod., 2015).

Križance med psi in volkovi so potrdili v več predelih Evrope: v Bolgariji (potrdili tudi križanje s šakali (*Canis aureus*) (Moura in sod., 2013)), baltskih državah (Andersone in sod., 2002; Hindrikson in sod., 2012), Nemčiji in zahodni Poljski (Linnell in sod., 2008), Italiji (Randi in Lucchini, 2002; Verardi in sod., 2006), Skandinaviji (Vilà in sod., 2003b) in na Iberskem polotoku (Godinho in sod., 2011; Godinho in sod., 2015). Križanci so v evropskih populacijah predstavljali od 3 do 6 % osebkov, ki so bili zajeti v vzorčenjih (Godinho in sod., 2011; Hindrikson in sod., 2012; Caniglia in sod., 2014). Dolgo časa ni kazalo, da bi bila introgresija pasjih genov v te populacije zelo pogost pojav (Randi, 2008) oziroma se je predvidevalo, da je zaradi delovanja naravne selekcije omejena (Randi, 2011). V nedavni študiji pa so Randi in sod. (2014) ugotovili, da je frekvenca osebkov v apeninski populaciji, ki imajo pasje gene, veliko večja (87,5 %) od frekvence pojavljanja križancev prve in druge generacije (12,5 %).

2.2.6 Prepoznavanje povzročiteljev škodnih primerov

Škode na drobnici po volku, enako kot na drugih območjih, ki jih poseljujejo volkovi in ljudje na njih redijo drobnico (Kaczensky, 1999; Sundqvist in sod., 2007), tudi v Sloveniji predstavljajo enega glavnih upravljaljskih izzivov (Akcijski načrt za trajnostno upravljanje populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji 2013 – 2017, 2013). Takšna škoda lahko lokalnemu prebivalstvu predstavlja precejšnje finančno breme in vodi v težnje po uravnavanju velikosti populacije ter hkrati vpliva na slabše sprejemanje volka med ljudmi ali celo vodi v nezakonito ubijanje (Černe in sod., 2010).

Znano je, da tudi psi povzročajo škode na domačih živalih in da napadajo tudi druge prostoživeče živali, ki so včasih tudi endemne ali ogrožene (pregled v (Bergman in sod., 2009; Echegaray in Vilà, 2010; Young in sod., 2011). Na območjih, kjer volkov ni pa naj bi imeli z vidika škode v kmetijstvu tudi precejšen ekonomski vpliv ((Lescureux in Linnell,

2014). Tako je povsem verjetno, da je volkovom del škod pripisan »po krivici«, saj povzročitelja ob pregledu kadavra na terenu ni vedno mogoče določiti (Sundqvist in sod., 2007; Echegaray in Vilà, 2010). O obsegu tega pojava ni objavljenih relevantnih podatkov (Lescureux in Linnell, 2014). Zaradi zahtevnosti problema prispevek psov k škodam na živini in k slabšanju ugleda volkov ni ovrednoten in v javnosti ostaja neprepoznan (Echegaray in Vilà, 2010). Aplikacija genetskih metod v prepoznavanju vrste in osebkov odgovornih za plenjenje domačih živali lahko prispeva k razvoju celovitega sistema za preprečevanje škod in kompenzacijskega programa (Echegaray in Vilà, 2010). Z uporabo forenzičnega pristopa, ki omogoča pridobitev slin z ugriznih ran, bi fenomen plenjenja (potepuških) psov na drobnico v prihodnosti lahko bolje razumeli (Sundqvist in sod., 2007; Caniglia in sod., 2013) in pokazali upravljavcem pomen kontrole potepuških psov (Echegaray in Vilà, 2010). Zmanjšanje tovrstnih konfliktov bi lahko zmanjšalo finančno breme, povečalo politično naklonjenost in na splošno prispevalo k varstvu redkih velikih zveri (Wydeven in sod., 2004).

Ena od metod, ki so jo uporabili Echegaray in Vilà (2010), je identifikacija vrste in osebkov iz iztrebkov, pri katerih so potem pregledali še njihovo vsebino. Pomanjkljivost metode je, da se na podlagi iztrebkov ne da ugotoviti, ali gre dejansko za povzročitelja škode, ali samo za mrhovinarja (Blejwas in sod., 2006), slina odvzeta z ubojnih ran pa nam takšno razločevanje omogoča. Do pred nekaj leti sta bila za take raziskave primerna opazovanje in radiotelemetrija. Prva metoda je bila primerna le za dnevne plenilce v odprtih habitatih, ob tem da je časovno zamudna in je običajno tudi velikost vzorca manjša. Radiotelemetrija je bolj učinkovita, vendar pa omogoči pridobitev podatkov le za z ovratnicami opremljene živali. Tako npr. za kojote, ki so jih imeli na ovratnici, niso mogli vedeti, ali je škodo povzročil le reproduktivni samec, ali pa mu je pomagala tudi samica (Blejwas in sod., 2006).

Do sedaj objavljena literatura s problematiko identifikacije povzročitelja s pomočjo DNA analize vzorcev slin s škodnih primerov obravnava manjše število škod oziroma vzorcev slin z ugriznih ran (Williams in sod., 2003; Blejwas in sod., 2006; Sundqvist in sod., 2007; Caniglia in sod., 2013). Na enak način pa se raziskovalci lotevajo tudi problematike odnosov med plenilcem in plenom (Mumma in sod., 2014; Wengert in sod., 2014).

Enako kot je značilno za vse ostale tipe neinvazivnih genetskih vzorcev, ima tudi slina odvzeta s kadavra majhno količino DNA, ki je zaradi izpostavljenosti vremenskim vplivom tudi slabe kvalitete. Zanje je tako enako značilna velika stopnja napak pri genotipizaciji, kot sta izpad alelov in pojav lažnih alelov (Taberlet in sod., 1999). Harms in sod. (2015) so v nadzorovanem poskusu ugotovili, da se uspešnost genotipizacije vzorcev že po dveh dneh drastično zmanjša. Poleg tega se z daljšanjem časa, ki preteče od nastanka škode do odvzema vzorca, poveča možnost, da se na kadaver pridejo hraniti tudi mrhovinarji. Tudi zato je treba zagotoviti čim prejšnji odvzem vzorcev in prilagoditi laboratorijske protokole, ki omogočajo prepoznavanje vrst, katerih DNA bi lahko v PCR namnožili s primerji, ki so sicer vrstno specifični, pomnožujejo pa tudi DNA nekaterih sorodnih vrst npr. lisice, šakala in psa (Harms in sod., 2015).

V Sloveniji je število škod, ki jih povzročijo volkovi, od leta 1995 do 2010 precej naraslo. V zadnjih letih se je ustalilo na okoli 400 do 600 škodnih dogodkov letno. Povečevanje števila škodnih primerov je povezano z razmahom ovčereje kot panoge in s povečanjem populacije volka, lahko pa gre tudi za boljšo obveščenost rejcev o odškodninskem sistemu in neustrezno varovanje rejnih živali (Akcijski načrt za trajnostno upravljanje populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji 2013 – 2017, 2013). Ne glede na to, da volkovi raje plenijo jelenjad in srnjad, jim več priložnosti za uplenitev domačih živali nudijo večkrat slabo varovani pašniki, ki so zaradi mozaičnosti krajine pogosto v bližini gozda, volkovega glavnega življenjskega prostora. Verjetnost za plenjenje drobnice se v splošnem veča z večanjem števila ovac in površine kmetijskega gospodarstva, vendar pa je verjetnost za plenjenje večja kjer je večje število ovac na manjši površini (Černe in sod., 2010). Od leta 1994 se za vzdrževanje sociološke nosilne kapacitete v primerih škod izplačuje odškodnine, od leta 1999 pa se je za preprečevanje škod skušalo uporabljati predvsem odstrel volkov (Černe in sod., 2010). Za zmanjševanje števila škodnih primerov na rejnih živalih od leta 2010 dalje lahko rejci drobnice v okviru različnih projektov, ki so sofinancirani iz državnega proračuna ali v obliki kmetijskih subvencij, v uporabo dobijo različna varovalna sredstva (Akcijski načrt za trajnostno upravljanje populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji 2013 – 2017, 2013).

Volkovi večinoma raje plenijo naravni plen (Meriggi in Lovari, 1996), načeloma se, kjer so v naravi prisotni parkljarji, najraje prehranjujejo z njimi (Meriggi in Lovari, 1996; Jędrzejewski in sod., 2000; Gazzola in sod., 2005). Verjetno pa na območjih, kjer so volkovi prisotni, ni veliko vrst ustrezne velikosti, ki je volk ne bi pokončal. Načeloma plenijo osebke katerih koli živalskih vrst, ki so dovolj ranljivi, za volkove pa predstavljajo čim manjše tveganje poškodbe med lovom. Volkovi naj bi po mnenju nekaterih avtorjev med obhodi svojega teritorija v spremenljivih pogojih nenehno preverjali ranljivost svojega potencialnega plena (Mech in Peterson, 2003).

Tudi v Sloveniji volkovi v največji meri plenijo jelenjad in srnjad (57 %), sledi divja svinja (30 %), drobnica (10 %) in ostalo (3 %). Delež uplenjene živalske vrste pa se razlikuje med tremi večjimi slovenski regijami, kjer volkovi živijo. Tako je na Primorskem delež uplenjene drobnice največji in predstavlja kar 20 %, na Notranjskem 2 % in na Kočevskem 4 % plenskih vrst (Potočnik in sod., 2014). Potočnik in sod. (2014) so ugotovili, da je v prehrani volka pri nas pomembna jelenjad, njen delež v prehrani pa se z večjo populacijsko gostoto jelenjadi povečuje tudi v prehrani volka, medtem ko je delež srnjadi v prehrani neodvisen od njene populacijske gostote v okolju. Delež divjega prašiča pa se ob povečani populacijski gostoti jelenjadi zmanjša. Daleč največji vpliv na verjetnost prehranjevanja z drobnico pa je imela relativna populacijska gostota jelenjadi. Enako so ugotovili tudi za vzhodno Evropo, kjer se je frekvenca plenjenja drobnice po povečanju populacijske gostote jelenjadi močno zmanjšala, saj so volkovi v večji meri spet začeli loviti jelenjad (Jędrzejewski in sod., 2010).

3. OPREDELITEV PROBLEMA

Volkovi na območju Dinaridov in Balkana so bili enako kot drugje po Evropi in drugih koncih sveta v 18., 19. in večino 20. stoletja močno preganjani in zdesetkani. Kadar so populacije majhne postanejo bolj občutljive za okoljske, demografske in genetske stohastičnosti, kar pomeni, da se jim zmanjša tudi sposobnost preživetja - viabilnost. Z vidika genetike je v majhnih populacijah eden ključnih procesov naključni genetski zdrs, ki spreminja frekvence alelov - viša delež homozigotov in s tem vrejetnost, da se v zigoto združita dva heterozigotno neugodna alela. Dinarsko-balkanska populacija volka je sicer v

Evropi trenutno ena največjih in po ocenah šteje okoli 3900 osebkov (Kaczensky in sod., 2012a; Chapron in sod., 2014). Fabbri in sod. (2014) so ugotovili, da je že dinarska populacija razdeljena v vsaj dve ali tri subpopulacije, ki so sicer med seboj vsaj občasno povezane oziroma med njimi obstaja omejen genski pretok. Povezljivost celotne populacije je trenutno še slabo poznana. Lahko sklepamo, da je bila v preteklosti povezljivost zaradi izgube habitata, fragmentacije in preganjanja ter iztrebljanja volkov še manjša kot je danes. Iz zgodovine populacije tako izhajajo problemi, ki vplivajo na genetsko pestrost, ta pa je z vidika dolgoročnega preživetja populacije ključnega pomena.

Kljub temu, da imajo volkovi dobro razvite vedenjske mehanizme za preprečevanje parjenja v sokrvju, kot npr. disperzija na dolge razdalje, so pri nekaterih populacijah (npr. skandinavska in na otoku Isle Royale) zaznali depresijo zaradi parjenja v sokrvju v kombinaciji z osiromašenjem genetske pestrosti. V obeh primerih je parjenje v sokrvju nastopilo kot posledica učinka ustanovitelja populacije, ki sta ju omenjeni populaciji preživel (Liberg in sod., 2005; Rääkkönen in sod., 2009). Parjenje v sokrvju pa je problem tudi v majhnih in izoliranih populacijah. Ker je SZ dinarska subpopulacija majhna in vsaj deloma izolirana, je pričakovati, da bomo v njeni genetski sliki opazili znake parjenja v sokrvju. Stopnja parjenja v sokrvju pa gotovo ni tako visoka kot pri populacijah volkov, ki izhajajo iz le nekaj posamičnih osebkov, kot v prej omenjenih populacijah.

Eden najboljših populacijskih parametrov za spremljanje populacije je efektivna velikost populacije, ki opisuje stopnjo parjenja v sokrvju, izgubo koristnih alelov in fiksacijo škodljivih alelov ter s tem tveganje izumrtja populacije (Allendorf in Luikart, 2007). Ker efektivne velikosti SZ dinarske subpopulacije nismo poznali, je njena ocena eden pomembnejših delov te naloge.

Pereč varstven problem volčjih populacij v svetovnem merilu predstavlja križanje vrst, do katerega prihaja zaradi človekovega vpliva, kot so npr. vnos sorodnih vrst in podvrst, krčenje in fragmentacija habitata (Allendorf in sod., 2001; Mallet, 2005; Stronen in sod., 2012) in preganjanje (Rutledge in sod., 2012). Križanje lahko ruši prilagoditve lokalne populacije, kar lahko vodi v nadaljnje zmanjšanje populacije in izgubo genetske pestrosti (Randi, 2008). Ker volkovi v Sloveniji živijo v okolju, kjer se gozdovi prepletajo s

kmetijsko krajino in manjšimi urbanimi območji, so izpostavljeni stiku z domačimi in potepuški psi. Za enkrat ni znano, da bi se v naravnem okolju pojavljali prostoživeči psi, tako da potencialno nevarnost s tega vidika predstavljajo predvsem preko noči prosto spuščeni psi, zlasti v obdobju parjenja (gonitve) mladih volkulj. Pričakovati pa je, da se je od leta 1998 dalje s prepovedjo odstrela potepuških psov (Etični kodeks slovenskih lovcev (1998, 18. člen) in Zakon o zaščiti živali (Ur. l. RS, št. 98/1999, 15. člen)), v naravnem okolju povečala njihova prisotnost. Posledično se je povečalo tudi tveganje za stik med volkovi in psi ter s tem verjetnost križanja. O primerih križanja na osnovi genetskih analiz med volkovi in psi so v zadnjih letih poročali tudi na Hrvaškem (Štrbenac in sod., 2005) in v Italiji v neposredni bližini meje s Slovenijo (Lapini in sod., 2010). Povsem mogoče je, da se križanci pojavljajo tudi v Sloveniji. Zaradi velike fenotipske raznolikosti psov je po fenotipskih značilnostih prepoznavanje križancev relativno zahtevno in razmeroma nezanesljivo že v prvi generaciji (F1), prepoznavanje naslednjih generacij pa praktično nemogoče. Zanesljivo prepoznavanje pa omogočajo molekularno genetske metode. V primeru intenzivnega križanja posameznih populacij z udomačenimi oblikami lahko prihaja do naravovarstvenih dilem o statusu in varovanju takšnih populacij. Zato je poznavanje stopnje križanja in spremljanje sprememb v populaciji volka ena izmed pomembnih zakonskih in naravovarstvenih prioriteta in pomemben del genetskega spremljanja populacije volka v Sloveniji.

Največji izziv upravljanja volčje populacije v Sloveniji so škode, ki jih volkovi povzročijo v kmetijstvu, še posebej na drobnici (Akcijski načrt za trajnostno upravljanje populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji 2013 – 2017, 2013). Na območju, kjer se v Sloveniji danes pojavljajo volkovi, se je v zadnjih dveh desetletjih znatno povečala reja drobnice (Černe in sod., 2010). S tem se pojavlja več priložnosti za plenjenje domačih živali, tako za volkove (Černe in sod., 2010) kot tudi za pse, saj lahko tudi ti brez težav ubijejo ovco ali kozo (Bergman in sod., 2009). S pregledom trupla ubite živali na terenu ni vedno mogoče določiti, ali je povzročitelj škode volk, pes, ali celo križanec. Tako je povsem mogoče, da vseh škod na drobnici ne povzročijo volkovi, ampak so jim nekatere pripisane »po krivici«. Z odvzemom in genetsko analizo vzorca slin z ugrizne rane lahko povzročitelja prepoznamo.

Varstvo te velike zveri nam nalaga tudi zakonodaja. V Sloveniji je volk strogo zavarovana vrsta z Uredbo o zavarovanju ogroženih živalskih vrst (Ur. l. RS, št. 57/93). Pristojno Ministrstvo za okolje in prostor lahko na osnovi podatkov o številčnosti volkov, opažanjih in realizaciji odstrela v preteklem obdobju, škodah na živini in drugih podatkih izda odločbo o izrednem odstrelu določenega števila volkov. Po Bernski konvenciji, Dodatek II, spada volk med strogo zavarovane živalske vrste (Ur. l. RS št. 17/1999). V Direktivi o ohranjanju naravnih habitatov ter prostoživečih živalskih in rastlinskih vrst je v Dodatku II opredeljen kot vrsta za katero je treba izločiti posebna varstvena območja in v Dodatku IV kot vrsta s striktnim varstvom. Po Washingtonski konvenciji (CITES), Dodatek II (Ur. l. RS št. 31/1999) pa med vrste, ki niso nujno ogrožene do meje izumrtja, lahko pa to postanejo, če se trgovina z njimi ne omeji oz. kontrolira. Na Rdečem seznamu ogroženih sesalcev Slovenije je volk uvrščen v IUCN kategorijo Prizadeta vrsta (E) (Ur. l. RS, št. 82/2002). To pomeni, da obstaja nevarnost izumrtja, če se bo ogrožanje nadaljevalo in njegova številčnost zmanjšala na kritično stopnjo.

Za uspešno varovanje in upravljanje vrst oziroma populacij je treba poznati in spremljati njihove demografske in ekološke značilnosti. V primeru velikih zveri, kamor uvrščamo tudi volkove, je to zaradi njihovega skrivnega načina življenja na velikih teritorijih in v majhnih populacijskih gostotah, razmeroma težko (Johnson in sod., 2001). Teoretski in tehnološki napredek v telemetriji, načinu pridobivanja ocen velikosti populacij, statistični obdelavi podatkov in modeliranju omogočajo celostne in nepogrešljive metodologije pri njihovem varstvu. Z vidika deležnikov, ki so vključeni v varstveno upravljanje, so za učinkovitost pridobivanja in povezovanje raziskav in zaključkov ter transparentnosti upravljanja pomembne tudi obsežne javno dostopne baze podatkov. Največji napredek pa se je zgodil na področju molekularne genetike. Razvoj populacijske genetike, sodobnih analitičnih metod in filogenetske teorije pa ne le da omogoča vpogled v trenutno stanje populacij, ampak tudi v evolucijsko preteklost vrst ter napovedovanje dogajanja z njimi v prihodnosti (Johnson in sod., 2001). Metode varstvene genetike tako danes omogočajo učinkovito spremljanje populacij in vpogled v njihov varstveni status, tako z vidika demografskih kot s populacijsko genetskih značilnosti. S kvalitetnimi, zanesljivimi in z znanostjo podprtimi podatki, ki jih te metode ponujajo, lahko upravljavci dobro utemeljijo ukrepe v prostoru in posege v populacijo ter tako v družbi pridobivajo oziroma ohranjajo

kredibilnost, kar je pri upravljanju in varovanju tako karizmatične in kontroverzne vrste, kot je volk, nujno potrebno.

3.1 CILJI DOKTORSKE DISERTACIJE

Naloga je del prve obsežnejše genetske študije volkov v Sloveniji oziroma v severnih Dinaridih. Deloma so bile analize narejene v okviru projekta Varstvo in spremljanje varstvenega statusa populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji (2010-2013) – SloWolf, tekom katerega je nastajala tudi pričujoča naloga. Glavni cilj naloge je bil dobiti vpogled v genetsko sliko populacije in postaviti temelje spremljanju populacije volka pri nas s pomočjo molekularno genetskih metod. Glede na problematiko predstavljeno v uvodnem delu, smo si v nalogi postavili naslednje cilje:

1. Oceniti genetsko pestrost SZ dinarske subpopulacije in jo primerjati z genetsko pestrostjo drugih populacij.
2. Preveriti, ali so številčna zmanjšanja (ozka grla) pustila sled v genetski sliki populacije.
3. Oceniti stopnjo sokrvja in efektivno velikost populacije.
4. S pomočjo genetskih metod preveriti, ali se v Sloveniji pojavljajo križanci med volkom in psom ter ugotoviti v kakšnem obsegu.
5. Ugotoviti, ali vse škode, ki so pripisane volku, res povzročijo volkovi, in raziskati v kakšnem obsegu škode povzročajo psi.

4. MATERIAL IN METODE

4.1 OBMOČJE VZORČENJA IN ZBIRANJE VZORCEV

Genetske tkivne vzorce poginjenih, odstreljenih ali s telemetrično ovratnico opremljenih volkov že od leta 2003 zbira Zavod za gozdove Slovenije (ZGS), hranimo pa jih na Oddelku za biologijo ($n = 76$). Volkovom, ki so bili spremljani v telemetrični študiji in mladičem najdenim v brlogih, smo odvzeli vzorec krvi ali bris ustne sluznice. V letih 2010 do 2013 je potekalo intenzivno zbiranje neinvazivnih genetskih vzorcev. Da bi o volkovih pridobili čim več podatkov in da bi zmanjšali heterogenost ulovljivosti, smo zbirali različne tipe vzorcev, in sicer iztrebkov, urina, dlake ter sline s kadavrov naravnega plena (večinoma jelenjad) in domačih živali, ki naj bi jih pokončali volkovi. Vse skupaj smo tekom intenzivnega vzorčenja pridobili 1610 neinvazivnih genetskih vzorcev (priloga A), 17 pa jih je bilo zbranih in analiziranih še pred letom 2010. V analiziranih vzorcih smo poiskali najboljše vzorce posameznih zaznanih živali (referenčni vzorci; več o postopku je v poglavju 4.4.2). V preglednici 1 je število referenčnih vzorcev volkov, ki smo jih uporabili v naših analizah. Vzorčenje je potekalo na območju stalne in občasne prisotnosti volka v Sloveniji, in sicer je bila večina vzorcev zbrana na območju Primorske, Notranjske in Kočevske (slika 4).

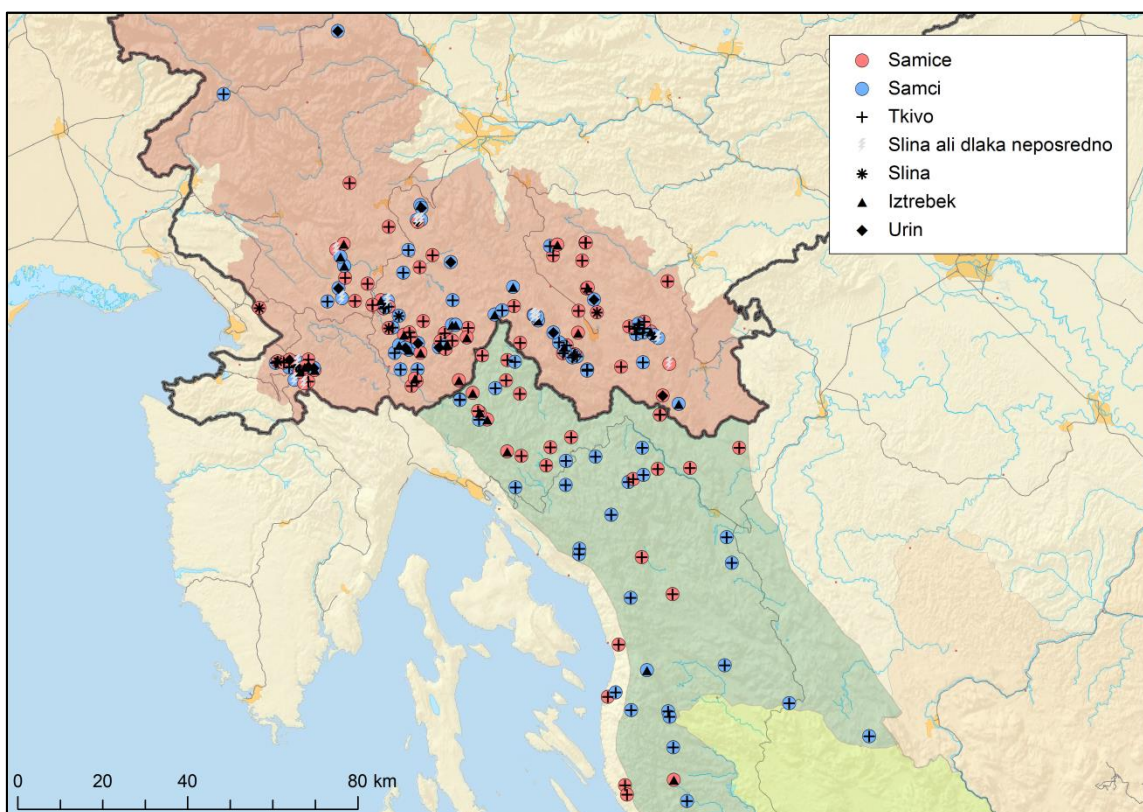
V severno zahodnem delu dinarske populacije je v času poteka študije živelo okoli 50 volkov (Potočnik in sod., 2014). Ker imajo vsaj štirje volčji tropi čezmejne teritorije, smo v študijo vključili tudi genetske vzorce, ki so jih v istem časovnem obdobju zbrali kolegi s Hrvaške. V času trajanja aktivnega zbiranja vzorcev v Sloveniji pa so tudi v Gorskem Kotarju zbirali neinvazivne genetske vzorce (preglednica 1 in priloga A).

Pri analizah prepoznavanja križancev med volkovi in psi smo uporabili tudi vzorce volkov iz Like ($n = 42$) in Dalmacije ($n = 101$).

Pri vzorčenju je sodelovalo veliko ljudi - lovci, gozdarji, prostovoljci in terenski sodelavci. Vsak vzorec smo ob sprejemu v laboratorij označili z dvo-dimenzionalno črtno kodo in ga

s pripadajočimi podatki vnesli v relacijsko bazo podatkov MisBase (Skrbinšek, 2007 neobjavljeno).

V Sloveniji smo uporabljali standardno prepoznane regije oziroma teritorije volčjih tropov, kot so bili prepoznani v triletnem spremljanju populacije (2010-2013) (Potočnik in sod., 2014), delitev Hrvaške na tri regije (Gorski Kotar, Lika in Dalmacija) pa ustreza hrvaškim nacionalnim upravljavskim enotam, kot so opredeljene v Načrtu upravljanja volka na Hrvaškem (Štrbenac in sod., 2005; Majjić in Bath, 2010).



Slika 4: Karta lokacij referenčnih vzorcev volkov zbranih med 2003 in 2013 na območju Slovenije in Gorskega Kotarja.

Figure 4: Map of wolf reference samples collected between 2003 and 2013 in Slovenia and Gorski Kotar.

Preglednica 1: Referenčni vzorci volkov po tipu vzorca in letu vzorčenja.**Table 1: Reference samples of wolves collected in Slovenia and Gorski Kotar by year and sample type.**

	SLOVENIJA							GORSKI KOTAR				SLOVENIJA IN GORSKI KOTAR		
	tkivo	iztrebek	kri	urin	slina	ustne sluznice	dlaka	SKU.	tkivo	iztrebek	kri		razpadajoče truplo	SKU.
2003	9							9	1				1	10
2004	2							2	1		1		2	4
2005	4							4			1		1	5
2006	9							9	3				3	12
2007	7	1						8	3		2		5	13
2008			1					1	3		3		6	7
2009	8	1						9	4		1		5	14
2010	9	6	1	3	2		2	23	12	3	2		17	40
2011	10	9		2	1	5		27	7				7	34
2012	12	10		4	3	3		32	7	3	1		11	43
2013	6	4		5	1	5		21					0	21
SKU.	76	31	2	14	7	13	2	145	41	6	3	8	58	203

4.2 SHRANJEVANJE IN IZOLACIJA DNA**4.2.1 Tkivni vzorci**

Vse skupaj smo zbrali 94 vzorcev poginulih volkov (izredni ali redni odstrel, prometne nesreče in v naravi najdeni kadavri). Za vsakega smo odvzeli košček tkiva (mišica, jetra, koža) in ga do analize shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 96 % čistem etanolu. Vzorce krvi živih živali odlovljenih za telemetrične študije smo odvzeli v Vacutainer epruvete z antikoagulantom (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA) in jih prav tako shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DNA iz tkiv smo izolirali v laboratoriju, v katerega je prepovedan vnos in delo s produkti PCR velikih zveri. Izolacijo smo naredili z GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), pri čemer smo sledili navodilom proizvajalca.

4.2.2 Neinvazivni vzorci

Gre za vzorce materiala, kot so iztrebki, urin, slina, dlaka ipd., ki jih živali pustijo v okolju, pri njihovem zbiranju pa živali ne vznemirjamo in motimo pri njihovem vsakdanu. Zaradi zelo nizke vsebnosti (v velikostnem razredu 10^{-12} g) in slabe kvalitete DNA, ki je zanje značilna, smo pri delu z njimi upoštevali zelo striktna pravila, ki so ključna za preprečevanje kontaminacije. Držali smo se predhodno vzpostavljenega protokola (Skrbinšek in sod., 2010), ki narekuje strogo ločitev materiala za neinvazivno vzorčenje, samih vzorcev, aparaturo in prostorov, v katerih se dela z neinvazivnimi vzorci in s produkti PCR. Vse izolacije DNA iz neinvazivnih vzorcev in priprava za PCR so bile narejene v laboratoriju, ki je posebej namenjen delu s tovrstnimi vzorci in je fizično ločen od laboratorija, v katerem delamo s tkivnimi vzorci in pa od sobe, ki je namenjena delu s produkti PCR (amplifikacija DNA in priprava produktov PCR za elektroforezo oziroma analizo na sekvenatorju).

4.2.2.1 Vzorci iztrebkov in urina

Vzorci iztrebkov smo zbirali tekom celega leta. Pri vzorcih z nizko vsebnostjo in slabo kvaliteto DNA je pomembno, da so sveži, saj je tako uspešnost genotipizacije večja (Piggott, 2004; Murphy in sod., 2007). Zato smo zbirali le vzorce, ki niso bili videti starejši od petih dni, pri čemer nam je bilo glavno vodilo njihov vonj - močnejši kot je bil, bolj svež je bil vzorec. Shranili smo jih v 50 mL centrifugirke napolnjene s ~ 35 mL čistega 96 % etanola.

Vzorci urina v snegu je mogoče pridobiti le v zimskem času, in še to le na območjih, kjer je bil prisoten sneg. Sneg poškopljeno z urinom (~ 30 mL) smo shranili v mešanico 96 % čistega etanola (15 mL) in 0,5 M EDTA (3,2 mL).

Za izolacijo DNA iz obeh tipov vzorcev smo uporabili Qiagen QIAmp™ DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Pred samo izolacijo smo vzorce iztrebkov pripravili tako, da smo delčke (po možnosti površino) vsakega iztrebka, razporedili po petrijevki in počakali, da je etanol izhlapljal. Večje dele iztrebka (npr. drobne kosti plena, trave) smo zavrgli, ostali material (~

200 mL) pa prenesli v pufer ASL ter nadaljevali po navodilih proizvajalca, pri čemer smo podaljšali korak homogenizacije vzorcev v ASL pufru na vortex-u (20-45 min), homogenizacije s tableto InhibitorEX, ki zavre delovanje inhibitorjev PCR (5-10 min), in digestije s proteinazo K (20-30 min) (Skrbinšek in sod., 2010).

Izolacija DNA iz vzorcev urina je potekala v dveh korakih, pri čemer smo sledili protokolu, ki so ga 2007 objavili Hausknecht in sod. (2007). Vzorce smo najprej odtalili, jih dobro zmešali in potem počakali, da se je EDTA usedel na dno centrifugirke. Supernatant smo odlili v centrifugirko, ki je vsebovala 10 mL 96 % čistega etanola in 1,5 mL 3 M natrijevega acetata (pH 5,2). Da smo centrifugirke z različnimi vzorci uravnotežili na enak volumen (~ 45 mL), smo dodali še destilirano vodo. Tako tretirane vzorce smo čez noč inkubirali pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. DNA smo naslednji dan oborili s hladno centrifugo (8500 g, 30 min, $6\text{ }^{\circ}\text{C}$), v naslednjem koraku pa smo supernatant zavrgli, oborjeni material (~ 200 μL) pa prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko z pufrom ASL, od kjer smo s postopkom izolacije nadaljevali enako kot za vzorce iztrebkov.

4.2.2.2 Vzorci dlake

Dlake z mešički so bile odvzete živalim odlovljenim za telemetrično spremljanje ali pa so bile najdene ob plenu, brlogih in dnevnih počivališčih volkov. Do laboratorijske obravnave so bile shranjene v papirantih kuvertah in nato skupaj s silika gelom zapakirane v polivinilastih vrečkah ter shranjene pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kadar je bilo mogoče, smo po približno 10 mešičkov dlak uporabili za izolacijo DNA. V prvem koraku smo jih dali v pufer Lysis T (GeneElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)), dodali proteinazo K ter jih čez noč inkubirali pri $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Od tega koraka dalje smo sledili navodilom proizvajalca.

4.2.2.3 Vzorci sline

Tretji tip vzorcev, ki smo ga jemali živalim odlovljenim za telemetrične študije pa so bili brisi ustne sluznice. Odvzeli smo jih z bombažnimi vatiranci, ki smo jih shranili v plastično epruveto z desikantom (ForensiX DNA sample storage tubes, Prionics), kar je zagotovilo

hitro in popolno osušitev vzorca. Ob prihodu v laboratorij smo jih do izolacije shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Drugi tip vzorcev slin pa je forenzičen. Na škodnih primerih, ki jih tekom celega leta popisujejo pooblaščenca ZGS, so le-ti z vatirancem predhodno pomočenim v 96 % čisti etanol, podrgnili ob smrtnih ranah kadavrov domačih živali. Vzorce slin smo odvzeli tudi na naravnem plenu volkov. Pri odvzemu vzorcev smo se izogibali krvi poginjene živali (Sundqvist in sod., 2007). Vzorci so bili v večji meri odvzeti s predela smrtne rane na vratu, kjer je najbolj verjetno, da bomo v vzorcu dobili DNA volka. V času optimizacije vzorčenja slin na škodnih primerih smo jemali tudi vzorce z drugih predelov kadavrov. Z enim vatirancem smo odvzeli vzorec samo z ene rane, saj smo na ta način poskušali zmanjšati število mešanih genotipov, ki bi jih lahko dobili v posameznem vzorcu.

Izolacijo DNA smo naredili s kitom QIAmp DNA Investigator Kit (Qiagen). Vatirance smo v pufru ATL čez noč inkubirali pri $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za boljši izkoristek smo lizat pred dodajanjem drugih pufrov in vezavo DNA na kolono homogenizirali še s pomočjo kolon Qiashredder (Qiagen). Inkubacijo pri $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo podaljšali na 20 minut, sicer pa smo pri izolaciji sledili navodilom proizvajalca.

4.3 PREPREČEVANJE KONTAMINACIJE IN ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI DELA

Za zmanjšanje možnosti napak zaradi človeškega faktorja in kontaminacije, smo pri delu tako s tkivnimi kot neinvazivnimi vzorci tekom laboratorijskih analiz upoštevali stroga pravila in protokol dela. Vsi podatki so bili zapisani na flaškah, kuvertah ali vrečkah z vzorci. Ob prejemu vzorca v laboratorij smo vse vzorce označili z dvo-dimenzionalno črtno kodo, ki smo jo pred začetkom izolacije oz. priprave PCR prebrali s čitalcem črtnih kod ali s skenerjem. Na ta način smo zmanjšali možnost napake pri vnašanju vzorcev v bazo, izolacijsko ali predlogo za PCR, saj smo ročno vpisovanje imen vzorcev povsem izključili. Izolacije smo delali v majhnih serijah po največ 23 vzorcev, vedno pa smo vzporedno naredili tudi negativno kontrolo, ki smo jo analizirali tudi v nadaljnjih

analitičnih korakih. Pri pipetiranju smo v vseh korakih uporabljali pipetirne nastavke z aerosolno bariero. Vse ekstrakte DNA smo do PCR shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 GENOTIPIZACIJA

Pri delu smo uporabili mikrosatelite, trenutno ene izmed najboljših markerjev, ki so na voljo, zlasti pri analizah neinvazivnih genetskih vzorcev. Gre za kratke ponavljajoče se sekvence v nekodirajočih delih DNA. Aleli na posameznem mikrosatelitnem lokusu se med seboj razlikujejo po številu ponovitev motiva, ki ga sestavlja od dva do šest baznih parov. Amplifikacija mikrosatelitov poteka v PCR, pri čemer smo uporabili pare specifičnih začetnih oligonukleotidov, kjer je bil eden od para označen s fluorescentnim barvilom. Da smo lahko v isti PCR amplificirali čim več mikrosatelitov, smo za označevanje začetnih oligonukleotidov uporabili pet-barvno kemijo: 6-FAM (modra), VIC (zeleno), NED (rumeno), PET (rdeča) in LIZ (oranžna). V LIZ barvi je bil dolžinski standard, v ostalih barvah pa od dva do pet mikrosatelitnih lokusov, ki so se nahajali v dolžinah od 70 do 300 baznih parov. V študiji smo vse skupaj v začetni fazi uporabili 39 mikrosatelitov (nekateri smo pozneje sicer izločili) in dva spolna lokusa, pri čemer smo 11 mikrosatelitov uporabljali za individualno prepoznavanje živali, ostale pa še dodatno pri vseh ostalih analizah (genetska pestrost, populacijsko ozko grlo, analiza sorodnosti in za prepoznavanje križancev). Uporabljeni markerji s sekvencami začetnih oligonukleotidov, ki smo jih poiskali v literaturi, in protokoli so predstavljeni v nadaljevanju in v prilogi B.

4.4.1 Individualno prepoznavanje osebkov in protokoli PCR

Za individualno prepoznavanje osebkov smo razvili učinkovit multipleks (MP_{id}), kjer smo v eni PCR vsak vzorec amplificirali na 10 mikrosatelitnih lokusih (C09.250, C20.253 (Ostrander in sod., 1993), CPH12, CPH5, CPH7, CPH8, CPH9 (Fredholm in Winterø, 1995), Cxx.121 (Holmes in sod., 1995), FH2010, FH2145 (Francisco in sod., 1996)) in na lokusu za določanje spola (SRY (Bellemain in Taberlet, 2004)). Na začetku študije smo v MP_{id} amplificirali še lokus Cxx.103 (Holmes in sod., 1995), ki pa smo ga zaradi nečitljivosti rezultatov izločili iz multipleksa in vseh poznejših analiz.

Za PCR smo uporabili Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany). Na eni plošči za PCR smo amplificirali do 94 vzorcev naenkrat in vedno vsaj po dve negativni kontroli. Pripravo PCR za tkivne vzorce smo naredili v nadtladni komori, za neinvazivne vzorce pa v neinvazivnem genetskem laboratoriju. Za lažje pipetiranje smo si predhodno pripravili mešanice začetnih oligonukleotidov z ustreznimi koncentracijami. Reakcije so imele 10 μL , vsebovale pa so: 5 μL Qiagen Mastermix-a, 1 μL Q solution-a, 1 μL matrice tkivnih vzorcev oziroma 2 μL neinvazivnih vzorcev ter 3 μL mešanice primerjev in vode (da smo dobili želeno koncentracijo) za PCR tkivnih vzorcev in 2 μL za PCR neinvazivnih vzorcev. Po štirih različnih protokolih PCR smo v končni fazi amplificirali 35 lokusov. Protokoli se razlikujejo le po številu ciklov v PCR in po temperaturi pri kateri se začetni oligonukleotidi vežejo na matrico. Koncentracije primerjev z vsemi pripadajočimi informacijami so predstavljene v prilogi B, protokoli PCR pa so povzeti v preglednici 2.

Po končani PCR smo po 1 μL produkta PCR prenesli v mešanico formamida (8,75 μL) (Applied Biosystems) in dolžinskega standarda (0,25 μL) (Applied Biosystems) ter nato na 16 kapilarnem sekvenatorju ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) določili natančno dolžino uspešno pomnoženih fragmetov. V procesu kapilarne elektroforeze smo uporabljali 36 cm kapilare in polimer POP7 (Applied Biosystems). Elektroferograme (izpise sekvenatorja) smo analizirali s programskim orodjem GeneMapper V.4 (Applied Biosystems). V primerih nejasnih amplifikacij za posamezen lokus smo analizo vzorca ponovili.

Tkivne vzorce smo v prvem koraku enkrat amplificirali za vse lokuse. Neinvazivne vzorce pa smo v prvem koraku v dveh ponovitvah amplificirali za MP_{id} . V kolikor vzorec ni deloval smo ga zavrgli, sicer pa smo ga do zanesljivega genotipa dodatno amplificirali do osemkrat. Če še po osmih ponovitvah nismo dobili zanesljivega genotipa, smo vzorec zavrgli.

Preglednica 2: Protokoli PCR za štiri uporabljane multiplekse. V levem delu preglednice so protokoli za tkivne vzorce, v desnem pa za neinvazivne.

Table 2: PCR protocols for the four multiplexes. On the left side of the table are the protocols for tissue samples and on the right for noninvasive samples.

PCR korak/multipleks	Temperatura	Čas	PCR korak/multipleks	Temperatura	Čas
začetna denaturacija	95°C	15 min	začetna denaturacija	95°C	15 min
multipleks	število ciklov		multipleks	število ciklov	
MP _{id}	38		MP _{id}	55	
MPA	30		MPA	47	
MPB	31		MPB	44	
MPC	31		MPC	50	
denaturacija	94 °C	30 s	denaturacija	94 °C	30 s
vezava začetnih oligonukleotidov	temperatura	čas	vezava začetnih oligonukleotidov	temperatura	čas
MP _{id}	55 °C		MP _{id}	55 °C	
MPA	61,9 °C	90 s	MPA	61,9 °C	90 s
MPB	49,5 °C		MPB	49,5 °C	
MPC	60 °C		MPC	60 °C	
elongacija	72°C	1 min	elongacija	72°C	1 min
končna elongacija	60°C	30 min	končna elongacija	60°C	30 min
	4°C	10 min		4°C	10 min
	14°C	∞		14°C	∞

4.4.2 Napake pri genotipizaciji in zagotavljanje zanesljivosti genotipov neinvazivnih genetskih vzorcev

Pri genotipizaciji neinvazivnih genetskih vzorcev je zaradi slabe kvalitete DNA pričakovati nižjo uspešnost amplifikacij in večjo frekvenco pojavljanja napak, kot sta izpad alelov (ADO = allelic dropout) in pojav lažnih alelov (FA = false alleles) (Taberlet in sod., 1999). Dostikrat pa so aleli videni na elektorforegramu nejasni ali nečitljivi. Zato smo pri označevanju in potrjevanju nejasnih alelov in napak v zapisih iz sekvenatorja sledili algoritmu, ki so ga razvili Skrbinšek in sod. (2008). Za sprejemanje genotipov oziroma potrditev, da alelom vidnim v več amplifikacijah lahko verjamemo, smo sledili drugemu algoritmu, ki so ga prav tako razvili Skrbinšek in sod. (2008). V tem primeru gre za

nadgradnjo »multi-tube« pristopa (Taberlet in sod., 1996) in modifikacijo algoritma, ki so ga predlagali (Frantz in sod., 2003; Adams in Waits, 2007). Za sprejemanje genotipa smo uporabljali metodo največjega verjetja (maximum likelihood), kot je implementirana v programu Reliotype (Miller in sod., 2002), pri čemer smo mejo zanesljivosti postavili na 98 % (Skrbinšek in sod., 2008).

Napakam pri genotipizaciji (ADO in FA) se v laboratorijskih postopkih ne da izogniti in jih je zato treba v posamezni študiji kvantificirati (Broquet in Petit, 2004). Za oceno napak pri genotipizaciji smo uporabili metode, ki jih priporočata Broquet in Petit (2004) (Broquet in Petit, 2004), indeks kvalitete vzorcev (Q_i) pa smo izračunali po Miquel in sod. (2006). V primerih, ko se je genotip vzorca skladal z genotipom že znanega, zanesljivo genotipiziranega vzorca, smo genotip sprejeli, čeprav zanesljivost njegove genotipizacije še ni ustrezala navedenim kriterijem. Zaradi velikega števila lokusov in specifik napak genotipizacije (izjemna redkost lažnih alelov in pogostost izpada alelov) je verjetnost, da bi bila dva vzorca enaka zaradi napak v genotipizaciji, praktično nična (Skrbinšek in sod., 2008). Za oceno napak pri genotipizaciji smo uporabili različne tipe referenčnih vzorcev za posameznega prepoznanega volka z območja Slovenije in Hrvaške.

4.4.3 Prepoznavanje vzorcev istih živali

Za prepoznavanje vzorcev istih živali smo torej uporabljali set desetih markerjev zbranih v multipleksu MP_{id} . Pri prepoznavanju vzorcev istih živali obstaja možnost, da pride do dveh tipov napak: i) vzorca dveh različnih živali zaradi uporabe premalo informativnih lokusov prepoznamo kot vzorca iste živali ali ii) vzorca iste živali prepoznamo kot vzorca dveh različnih živali, ker smo pri genotipizaciji naredili napako. Prvi tip napake lahko odpravimo z uporabo dovolj velikega seta genetskih markerjev, medtem ko napaka, s katero »ustvarjamo« nove živali, predstavlja resen problem in pri analizah zahteva precejšnjo previdnost (Mills in sod., 2000; Waits in Leberg, 2000; Mckelvey in Schwartz, 2004). Z večanjem števila analiziranih markerjev postaja verjetnost, da bi imeli dve živali enak genotip, zanemarljiva, medtem ko verjetnost, da bo vsaj na enem od lokusov napaka, raste. Pri desetih lokusih, kolikor smo jih v naši študiji uporabili za individualno

prepoznavanje, verjetnost te napake že postane kritična (Waits in Leberg, 2000; Skrbinšek in sod., 2008).

V izogib drugemu tipu napake se v literaturi priporoča uporabo čim manjšega še zadovoljivega števila markerjev (5-7), da je verjetnost »ustvarjanja« novih živali zaradi napak čim manjša (Waits in Leberg, 2000; Paetkau, 2004). Vendar pa si tako zmanjšamo količino informacij in prožnost analiz, saj kljub uspešni amplifikaciji za posamezen lokus pogostokrat ne dobimo zanesljivega genotipa (Skrbinšek in sod., 2008).

Ker smo analizirali tudi veliko število tkivnih vzorcev, smo verjetnost, da bi imela dva volka genotip za deset lokusov enak, preverili empirično, kar smo potem upoštevali pri preverjanju ujemažočih vzorcev (Skrbinšek in sod., 2008). Zaradi slabe kvalitete genotipov neinvazivnih vzorcev smo kot možna ujemanja med dvema vzorcema dopuščali razlike na do treh lokusih, in sicer smo dopuščali možnost pojava izpada dveh alelov (ADO) in pojav enega lažnega alela (FA). Pri pregledu možnih ujemanj smo pri parih vzorcev preverjali, ali smo kakšnega od alelov videli le enkrat in posledično ni bil potrjen kot zanesljiv alel (ADO) oziroma ali smo kot alel potrdili lažni alel. Take alele smo glede na ujemažoči vzorec nato potrdili oziroma jih prepoznali kot napake pri genotipizaciji. Da smo dva vzorca končno prepoznali kot vzorca iste živali, sta morala imeti identičen genotip na devetih lokusih, dopuščali pa smo le izpad enega alela. Če sta imela vzorca na vseh lokusih enak genotip, na enem pa smo videli različne alele (nekompatibilnost), smo ju prepoznali kot vzorca dveh različnih živali in smo oba amplificirali na dodatnih 28 lokusih ter njuno ujemanje ponovno preverili.

Za vse kritične vzorce smo ponovno preverili elektroferograme in po potrebi ponovili genotipizacijo obeh vzorcev za multipleks MP_{id} . Večinoma je bila vsaka žival v okolju zaznana z več vzorci in smo bili lahko prepričani, da ta žival dejansko obstaja. Za živali, ki smo jih v neinvazivnih genetskih vzorcih »ujeli« le enkrat, smo morali biti v zanesljivost genotipa 98 % prepričani, da smo jo smatrali kot dejansko žival. V praksi je bilo takšnih primerov zelo malo. V kolikor vzorec ni bil dovolj zanesljiv smo ga pustili v bazi in njegovo ujemanje preverjali z vzorci, ki smo jih dobili v naslednjih letih. Kot dodatna

referenca za obstoj posameznih živali dobljenih v neinvazivnih vzorcih so nam služile tudi kasnejše analize sorodnosti.

4.4.4 Genotipizacija referenčnih vzorcev na dodatnem setu mikrosatelitnih lokusov

Za vsako žival smo določili referenčni vzorec, torej najbolj kvaliteten vzorec, ki smo ga pridobili za posameznega volka. V kolikor je bil to neinvaziven vzorec smo ga dodatno genotipizirali na 28 lokusih (AHT137 (Holmes in sod., 1995), AHTh171, AHTh260 (Breen in sod., 2001), AHTk211, AHTk253 (Thomas in sod., 1997), CPH2, CPH4, CPH6 (Fredholm in Winterø, 1995), CPH22 (Dolf in sod., 2000), Cxx.123, CXX279 (Ostrander in sod., 1993), FH2004, FH2054, FH2079, FH2088, FH2096, FH2137 (Francisco in sod., 1996), FH2848 (Breen in sod., 2001), INRA21 (Mariat in sod., 1996), INU005, INU030, INU055 (ISAG, 2005), REN162C04, REN169D01, REN169O18, REN247M23, REN54P11 (Guyon in sod., 2003) in VWF (Shibuya in sod., 1994)) in na amelogeninu za dodatno preverjanje spola. V 57,9 % so bili referenčni vzorci tkivni, ki smo jih na teh lokusih amplificirali že v prvi fazi. Kljub optimizacijam se je na koncu izkazalo, da genotipi na treh dodatno amplificiranih lokusih (FH2079, AHTh171 in INU005) niso zanesljivi in smo jih izločili iz nadaljnjih analiz.

Vzorci, ki so bili neuspešno amplificirani na kateremkoli lokusu, smo ponovili za vse lokuse v posameznem multipleksu. V povprečju smo vsak vzorec genotipizirali 2,3-krat, vendar pa se je dejansko število amplifikacij razlikovalo glede na kvaliteto vzorcev: neinvazivni vzorci so bili ponovljeni 3,9-krat, tkivni ter vzorci krvi in ustne sluznice pa 1,8-krat (priloga D). Bonin in sod. (2004) priporočajo, da se za prepoznavanje napak pri tkivnih vzorcih naključno ponovi 10 % vzorcev. Za vsakega volka, ki smo ga uspeli zajeti v naši študiji, smo imeli na koncu genotipiziranih 35 zanesljivih lokusov, kar nam je dalo na voljo bazo z veliko količino genetskih informacij.

4.4.5 Ocena pojavljanja ničelnih alelov

Tako ničelni aleli kot parjenje v sokrvju se pri genetskih analizah pokažejo kot presežek homozigotov (Van Oosterhout in sod., 2006; Chybicki in Burczyk, 2009). V primeru

prisotnosti ničelnih alelov lahko podcenimo delež heterozigotov, kar ima lahko znaten učinek pri oceni populacijskih parametrov, ki temeljijo na deležu heterozigotov, še posebej pri izračunu koeficienta sokrvja F , kjer ostaja nejasno kdaj le-ta odraža parjenje v sokrvju in kdaj gre dejansko za posledico prisotnosti ničelnih alelov (Chybicki in Burczyk, 2009). Nasprotno lahko v primerih, ko je v populaciji prisotno parjenje v sokrvju in pride do presežka homozigotov, to vodi v precenitev frekvence pojavljanja ničelnih alelov (Van Oosterhout in sod., 2006).

Zato smo stopnjo parjenja v sokrvju in morebitno prisotnost ničelnih alelov preverili z dvema metodama, ki hkrati upoštevata oba pojava. Obe metodi temeljita na istem populacijsko genetskem modelu, glavna razlika med njima pa je v uporabi koeficienta sokrvja za opis parjenja v sokrvju v neki populaciji. Model PIM (population inbreeding model) deluje na osnovi metode največjega verjetja in za oceno uporablja algoritem EM (Expectation of Maximization), koeficient sokrvja pa obravnava kot povprečje koeficienta sokrvja v populaciji. Model IIM (individual inbreeding model) pa deluje na osnovi Bayesovega pristopa, koeficient sokrvja pa vzame za vsak posamezen osebek, kar upodablja stopnjo parjenja v sokrvju vsakega osebk v populaciji posebej. Ocena frekvence ničelnih alelov pridobljena s tem modelom ne temelji na absolutni ocenjeni vrednosti in je statistično značilna le, kadar lokus odstopa od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (Chybicki in Burczyk, 2009). Oba modela sta implementirana v programu INEst 2.0 (Chybicki in Burczyk, 2009). Pri uporabi metode PIM smo naredili 1000 ponovitev in imeli 1×10^{-5} stop kriterij. Za oceno standardne napake smo uporabili Jackknife metodo. Z metodo IIM smo preverjali šest modelov, ki so vključevali kombinacije treh različnih spremenljivk (ničelni aleli, parjenje v sokrvju in napake pri genotipizaciji). Naredili smo 50.000 burn-in korakov in 500.000 korakov v Markovski verigi. Oceno frekvence pojavljanja ničelnih alelov za posamezen lokus smo izračunali kot povprečje vsakega petstotege koraka v markovski verigi.

Prisotnost ničelnih alelov smo preverili tudi s programom Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout in sod., 2004), ki jo program zazna kot presežek homozigotov v populaciji.

4.5 DOLOČITEV VRSTE

Na območju stalne in občasne prisotnosti volka živijo še trije predstavniki iz družine psov, katerih DNA genetski markerji v PCR uporabljeni v naši študiji prav tako pomnožujejo. Za razločevanje vzorcev smo zato za vsako od vrst s setom za individualno prepoznavanje volkov analizirali še set referenčnih vzorcev tkivo, dlak ali sline za šakale (*Canis aureus*) ($n = 27$), lisice (*Vulpes vulpes*) ($n = 11$) in pse (*Canis familiaris*) ($n_{\text{bris ustne sluznice}} = 8$, $n_{\text{dlaka}} = 39$, $n_{\text{slina,tkivo,kri}} = 5$). Vzorce psov smo pridobili na veterinarskih klinikah z območja Dinaridov. Preferenčno smo vzorčili večje pasme in mešance. Za namene prepoznavanja potencialnih križancev volka in psa smo vzorce psov nadalje analizirali še na 28 mikrosatelitnih lokusih. Vzorce netarčnih vrst smo glede na tip vzorca obravnavali enako kot vzorce volka.

Že na osnovi pojavljanja alelov, ki so značilni le za posamezno vrsto (priloga C), smo lahko takoj izločili vzorce lisic in šakalov. Razločevanje volkov, psov in križancev pa smo dodatno raziskali z dodelitvenimi testi, in sicer z metodo glavnih komponent (PCA) in z Bayesovimi pristopi, kot so implementirani v programu STRUCTURE (Pritchard in sod., 2000).

4.5.1 Metoda glavnih komponent

Metoda glavnih komponent (Principal Component Analysis oz. krajše PCA) se uporablja za predstavitev več-razsežnostnih podatkov s pomočjo zmanjševanja dimenzionalnosti v glavne komponente. Le-te pojasnijo največ variabilnosti in niso več izvorne komponente, ampak so linearna kombinacija vseh izvornih komponent (Jombart in sod., 2009; François in sod., 2010). Na ta način je v podatkih lažje prepoznati specifične vzorce razporejanja. V primeru analize genetskih markerjev gre za iskanje razmerja med objekti (genotipi oz. populacijami) na osnovi alelov. Osnovo za iskanje glavnih komponent predstavlja variabilnost med podatki. Slednji so prikazani kot oblak n točk in so postavljeni v p dimenzionalni prostor, pri čemer je vsaka dimenzija definirana z alelom. Smeri v tem prostoru (lastni vektorji z lastnimi vrednostmi), ki odražajo največjo variabilnost med objekti so *glavne osi (axis)* ali *faktorji* analize. Vsaka os je znotraj p -dimenzionalnega

prostora definirana s p koordinatami, kar predstavlja *utež* alelov. Vsaka komponenta ima svojo lastno vrednost, ki kvantificira količino njene variabilnosti. Grafikon po velikosti urejenih lastnih vrednosti je osnova za izbiro števila glavnih komponent za interpretacijo (Jombart in sod., 2009).

4.5.2 Dodelitveni testi z Bayesovimi pristopi v programu STRUCTURE

Za dodelitev osebkov v dve skupini (volk in pes) in za prepoznavo križancev smo uporabili STRUCTURE V.2.3 (Pritchard in sod., 2010), ki osebke razdeli v skupine glede na alelne frekvence, tako da čim bolj ustrezajo načelom Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Ker ima vsak posamezen osebek lahko mešan izvor, smo za analizo uporabili *admixture model*. V analizo nismo vključili predpostavk o izvoru posameznih osebkov.

Za pridobitev mejnih vrednosti za identifikacijo vseh šestih možnih skupin osebkov (križanci prve ($F1$) in druge ($F2$) generacije, povratni križanci volk-križanec in pes-križanec, čisti volk, čisti pes) smo structure analizo najprej naredili s simuliranimi podatki. V programu HYBRIDLAB (Nielsen in sod., 2006) smo simulirali križanje psov ($n = 51$) in volkov ($n = 82$). Kot čiste volkove smo za simulacijo križancev zaradi večje verjetnosti za sorodnost med volkovi, ki smo jih povzorčili v Sloveniji med leti 2010 in 2013, vzeli samo volkove s Hrvaške, ter vzorce, ki so zagotovo pripadali volkovom in so imeli PCA vrednosti višje od vrednosti mediane PCA ($Me = 1,33$). Pri simulaciji genotipov HYBRIDLAB predvideva vezavno ravnovesje in nevtralnost markerjev ter naključno parjenje. Simulacija poteka po preprostem principu, kjer program na osnovi individualnih multilokusnih genotipov najprej oceni frekvence alelov za posamezen lokus v vsaki od starševskih populacij opredeljenih v vhodnem dokumentu. Nato križance ustvari z naključnim izborom po enega alela na vsakem lokusu kot funkcijo izračunane distribucije frekvenc alelov iz vsake od starševskih populacij. Simulirali smo po 50 križancev prve ($F1$) in druge ($F2$) generacije ter prvo generacijo povratnih križancev volk-križanec in pes-križanec (*križanec $F1$ + volk oziroma križanec $F1$ + pes*).

V obeh primerih structure analize smo uporabili nastavitve: burn in = 100.000 in št. korakov markovske verige (MCMC) = 1.000.000. Glede na to, da smo preverjali

pripadnost samo dvema različnima skupinama (volk in pes) smo K (število skupin) nastavili na 2. Test smo nato desetkrat ponovili. S pomočjo programa Structure Harvester (Dent in von Holdt, 2012), smo preuredili podatke, da smo v program CLUMPP (Jakobsson in Rosenberg, 2007) lahko pridobili povprečne p vrednosti za dodelitev posameznega osebka v eno od skupin (volk ali pes). Pri tem smo uporabili "fullsearch" algoritem, ki najde optimalne rešitve za mnogokratne ponovitve.

Za potrebe te analize smo uporabili tudi podatke volkov s Hrvaške, tako smo imeli večji vzorec čistih volkov, kar nam je omogočilo bolj natančno razločevanje med tema dvema skupinama.

Rezultate, ki smo jih dobili z opisanimi analizami, smo uporabili za tri namene: i) vse pse in (potencialne) križance, ki so bili zbrani kot volčji vzorci, smo izločili iz populacijsko genetskega dela analiz, v katerem smo se ukvarjali z genetskimi parametri populacije volka, preživetjem ozkega grla in oceno efektivne velikosti populacije, ii) podatke smo prostorsko obdelali in preverili, kje smo zaznali križance in iii) preverili smo na koliko škodnih primerih smo dobili pse oz. križance.

4.6 POPULACIJSKO GENETSKE ANALIZE

4.6.1 Genetska pestrost

Za urejanje podatkov, izračun indeksov genetske pestrosti in večino analiz smo uporabljali statistično okolje R (R Development Core Team, 2011) in R paket »adegenet« (Jombart, 2008). Genetski polimorfizem na lokusih smo ocenili s številom alelov (A), opaženo heterozigotnostjo (H_o) in pričakovano heterozigotnostjo (H_e). Preverili smo tudi efektivno število alelov (A_e) (Frankham in sod., 2002). Statistično značilna odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja smo raziskali z MCMC metodo (Guo in Thompson, 1992), za korekcijo mnogoterih primerjav pa smo uporabili Holm-Bonferronijevo metodo (Holm, 1979). V programu GenAlEx 6.5 (Peakall in Smouse, 2006; Peakall in Smouse, 2012) smo ocenili verjetnost, da imata dva osebka enak genotip na posameznem lokusu (verjetnosti identičnosti; PI) in verjetnost, da imata enak genotip na posameznem lokusu potomca istih

staršev (verjetnost identičnosti bratov in sester; PI_{sib}) (Waits in sod., 2001). Vezavno neravnovesje lokusov (Linkage disequilibrium) smo testirali v programu Arlequin 3.5.2 (Excoffier in Lischer, 2010), ki za analizo uporablja algoritem EM (expectation maximization) (Excoffier in Slatkin, 1998). Naredili smo 16000 permutacij.

Za primerjavo genetske pestrosti evropskih populacij volka smo iz literature pridobili podatke o indeksih njihove genetske pestrosti (A , H_o , H_e). Populacije, za katere smo uspeli pridobiti indekse objavljene za posamezne lokuse, in v primerih populacij z opaženo strukturo, za posamezne subpopulacije, smo lahko primerjali po metodi umeritvene referenčne populacije ("yardstick" reference population method) (Skrbinšek in sod., 2012b). Ker imamo za SZ dinarsko subpopulacijo volka analiziranih razmeroma veliko vzorcev ($n = 201$) na velikem setu mikrosatelitnih lokusov ($n = 35$), smo jo lahko uporabili kot referenčno populacijo. Glede na to, da je v Sloveniji in v Gorskem Kotarju na Hrvaškem približno enako število volčjih tropov, bi z obeh območij pričakovali približno enako število zbranih vzorcev. Vendar pa smo v Sloveniji tekom intenzivnega spremljanja populacije (2010-2013) zbrali skoraj tri-krat več vzorcev kakor na Hrvaškem. Zaradi neenakomernega vzorčenja smo iz slovenskega dela vzorcev za to obdobje naključno izbrali enako število vzorcev, kot jih je bilo zbranih na Hrvaškem. Končno število vzorcev v referenčni subpopulaciji je bilo posledično na koncu nekoliko manjše ($n = 135$). Za primerjane populacije, ki so imele v vzorcu več osebkov, smo indekse genetske pestrosti brez vzorčenja iz referenčne populacije preračunali na lokuse, ki so bili skupni obema populacijama in nato izračunali relativno genetsko pestrost (A_r , H_{or} , H_{er}).

Za primerjavo indeksov genetske pestrosti vsake populacije z referenčno smo v programskem okolju R (R Development Core Team, 2011) z uporabo R paketa »resampleddiversity« (Skrbinšek in sod., 2012c) po metodi zankanja naredili 1000 naključnih podvzorcev in iz njih ocenili vrednosti indeksov in standardno napako primerjave.

4.6.2 Analiza populacijskega ozkega grla

Hipotezo ozkega grla smo preverjali za SZ dinarsko subpopulacijo. Za analize ozkega grla smo izločili lokuse (CPH2, CPH4, CPH6, FH2137, AHTh260, FH2145) pri katerih se je verjetno zaradi mutacije spremenil vzorec pojavljanja alelov, ki posledično ne sledi SMM (Stepwise Mutation Model = stopnjasti model), ki je sicer prevladujoč mutacijski model obeh izbranih metod.

Analizo smo naredili z metodo zaznavanja presežka heterozigotnosti (Cornuet in Luikart, 1996) ter z ugotavljanjem razmerja med številom alelov na lokusu in razponom velikosti lokusa v številu ponovitev motivov (Garza Williamsonov indeks; GW indeks) (Garza in sod., 2001). Pri obeh metodah smo uporabili TPM (Two Phase Mutation Model ali dvofazni mutacijski model), kjer nad več-motivnimi mutacijami IAM (Infinite Alleles Model ali model neskončno alelov) prevladujejo eno-motivne mutacije SMM. TPM je pri mikrosatelitih verjetno najbolj realističen model mutacij (Di Rienzo in sod., 1994; Luikart in Cornuet, 1998), poleg tega pa je pri tem modelu v kombinaciji z uporabljenima metodama verjetnost za napako tipa I (napačna detekcija ozkega grla, ki ga dejansko ni bilo) majhna (Williamson-Natesan, 2005).

Prvi test temelji na predpostavki, da se alelska pestrost takoj po drastičnem zmanjšanju števila osebkov v populaciji zmanjša, medtem ko se heterozigotnost zmanjšuje počasneje, kar se v populaciji kaže kot presežek heterozigotnosti. Preverjamo torej hipotezo, ali je v populaciji, ki ima vzpostavljeno ravnovesje med mutacijami in genetskim zdrsom, opažena heterozigotnost (H_o) statistično značilno večja od pričakovane (H_e). Statistično značilne razlike v primerih, ko je opažena heterozigotnost večja od pričakovane kažejo na drastično zmanjšanje populacije, v primerih, ko je opažena heterozigotnost manjša od pričakovane pa na povečanje efektivne velikosti ali na dotok redkih alelov z imigracijo (Cornuet in Luikart, 1996). Test presežka heterozigotov smo naredili v programu Bottleneck (Cornuet in Luikart, 1996) ob dveh različnih predpostavkah, in sicer da vsi lokusi sledijo SMM ter TPM, kjer smo dopustili 10 % variance za verjetnost »multiple-step« mutacij in predvideli 70 % mutacij po SMM. V obeh primerih smo naredili 100.000 ponovitev. Ali je delež presežka heterozigotov v populaciji statistično značilno večji smo preverili z dvema

statističnima testoma, s 'sign' testom in Wilcoxonovim 'sign-rank' testom (Luikart in Cornuet, 1998).

Garza Williamsonov indeks temelji na predpostavki, da mikrosateliti mutirajo po SMM, kjer velja, da so v neskončno veliki populaciji vse alelne pozicije posameznega lokusa zapolnjene, razen na mestih kjer so se aleli izgubili zaradi ozkega grla. Večji delež »manjkajočih« alelov je v primerih drastičnih zmanjšanj številčnosti osebkov v populaciji večji in pomeni manjši GW indeks (Garza in sod., 2001).

4.6.3 Koeficient sokrvja

Parjenje v sorodstvu v smislu ne-naključnega parjenja (F_{is}) smo izračunali po enačbi $F_{is} = 1 - H_o/H_e$ v programu INest (Chybicki in Burczyk, 2009). F_{is} izraža sokrvje posameznega osebkga glede na subpopulacijo (rodovniško sokrvje) oziroma je mera primanjkljaja heterozigotov v subpopulaciji (Goudet, 1995).

Individualni koeficient sokrvja F , ki odraža stopnjo sorodnosti staršev posameznega osebkga (Frankham in sod., 2002), smo ocenili po dveh metodah. V tem primeru F pomeni verjetnost, da oba alela na posameznem lokusu izvirata od skupnega bližnjega prednika ('identity by descent'). F ocenimo iz stopnje homozigotnosti na molekularnih markerjih genoma posameznika v primerjavi z genomi drugih osebkov v populaciji. Uporabljeni pristopa, dyadic ML (DyadML) (Milligan, 2003) in triadic ML (TrioML) (Wang, 2007), temeljita na metodah verjetja (ML) in pri izračunu koeficienta upoštevata možnost napake pri genotipizaciji. Obe metodi sta implementirani v programu Coancestry (Wang, 2011).

Za ničelno hipotezo smo predpostavili, da je povprečje koeficienta sokrvja F v SZ dinarski subpopulaciji enako nič. Preverili smo, ali se podatki razporejajo normalno. V kolikor podatki niso bili normalno razporejeni, smo poiskali funkcijo, ki čim boljše opiše razporejenost naših podatkov (krivulja ničelne hipoteze). Izbrali smo eksponentno funkcijo s parametrom $\lambda = 60$. Verjetnost, da dobimo vrednost manjšo od $F = 0,05$ je pri tej porazdelitvi 0,95. S pomočjo metode zankanja (bootstrapping) smo nato za vzorce pridobili predstavo o variabilnosti vzorca in dobili interval zaupanja. Nato smo preverili,

ali v dobljeni interval zaupanja pade tudi parameter ničelne hipoteze ter slednjo na podlagi tega potrdili oziroma zavrnili.

Koeficient F izračunan z metodo TrioML, ki je glede na svoje lastnosti bolj zanesljiva in bolje izračuna F (Wang, 2007), smo za posamezne osebkke izrisali še v času.

4.6.4 Efektivna velikost populacije

Efektivno velikost populacije (N_e) smo ocenili z metodo vezavnega neravnovesja (Waples, 2006), ki temelji na predpostavki, da se v končno veliki populaciji sicer nevezani lokusi zaradi vzorčenja gamet pri parjenju in naključnega vzorčenja posameznih osebkov v študiji na videz dedujejo vezano. Velikost teh naključnih odstopanj od vezavnega ravnovesja lokusov je obratno sorazmerna z efektivno velikostjo populacije in številom analiziranih vzorcev.

Temeljna predpostavka efektivne velikosti populacije je model Wright-Fisherjeve idealne populacije, ki predvideva enako pogostost alelov pri obeh spolih, enako pogostost obeh spolov, stalno velikost populacije, ločene generacije, naključno parjenje in enakovreden prispevek osebkov v naslednjo generacijo, v odsotnosti selekcije in mutacije (Luikart in sod., 2010). Populacije dolgoživih vrst, kot je tudi volk, ki imajo ob tem tudi kompleksno socialno organiziranost in sistem parjenja, od več predpostavk modela idealne populacije odstopajo. Posledično je ocenjevanje tega parametra zelo težavno in pri interpretaciji rezultatov zahteva veliko previdnost.

Poleg odstopanj obravnavane subpopulacije od idealne populacije smo kršili tudi nekatere predpostavke uporabljene metode, katere podajamo in komentiramo v preglednici 7 v poglavju 5.2.6.

Ena bolj kritičnih kršenih predpostavk so prekrivajoče generacije, saj v primeru, da jih ne upoštevamo, lahko pri oceni efektivne velikosti populacije naredimo velike napake (Luikart in sod., 2010). V primerih vrst s prekrivajočimi generacijami lahko, kadar imamo vzorčene posamezne kohorte, z uporabo teh istih metod ocenimo efektivno število

osebkov, ki se pariyo (N_b) (Waples, 2005). Le-to je konceptualno podobno N_e , s tem, da namesto celotne populacije gledamo le eno kohorto (Skrbinšek in sod., 2012a). Hkrati z oceno N_b za posamezno generacijo pristopimo tudi k reševanju problema spreminjanja velikosti populacij v času, saj te v realnem svetu niso konstantnih velikosti. Ocena skupne N_e je namreč odvisna od N_e posameznih generacij. V takih primerih je pomembno, da ocenjeno skupno N_e pravilno povežemo s stanjem v časovnem obdobju, ki ga dejansko ocenjuje. Problem je kompleksen, nanj pa vplivajo: življenjska strategija preučevane vrste (vrste z enim reproduktivnim ciklom vs. vrste z več reproduktivnimi cikli; monogamija vs. poligamija, itd.), uporabljena metoda (časovna metoda (temporal method), ki temelji na spremembi alelnih frekvenc v času vs. metoda enkratnega vzorca (one-sample method), ki temelji na vezavnem neravnovesju ali na presežku heterozigotov) in režim vzorčenja (pred ali po reprodukciji vs. ena ali več kohort) (Waples, 2005). V našem primeru nismo imeli podatkov o starosti volkov in tako nismo mogli oblikovati starostnih kohort, ki bi nam dale boljši vpogled v oceno efektivne velikosti.

Uporabljena metoda se dobro obnaša v primerih neenakovrednega spolnega razmerja in v primerih, ko je varianca reprodukcijskega uspeha večja kot pričakovana po naključju (Waples, 2006). Metoda je sicer občutljiva na predpostavko o zaprtosti populacije in o obstoju populacijske strukture, ki prav tako ustvarjata vezavno neravnovesje med lokusi, vendar pa naj bi vezavno neravnovesje, kot posledica delovanja genetskega zdrsa, v majhnih populacijah, kljub znatnemu deležu mešanja populacij, prevladalo (Waples in Smouse, 1990). Metoda poda zanesljivo oceno tudi kadar je v populaciji do 10 % migracije (Waples, 2010).

Ocenjevanja efektivne velikosti SZ dinarske subpopulacije smo se lotili na dva načina. Najprej smo se osredotočili na obdobje intenzivnega spremljanja subpopulacije. Oblikovali smo štiri časovne populacije: od 1. 1. 2003 do 30. 6. 2010 (pred začetkom triletnega intenzivnega spremljanja volkov) ($n = 89$), od 1. 7. 2010 do 30. 6. 2011 ($n = 51$), od 1. 7. 2011 do 30. 6. 2012 ($n = 54$) in od 1. 7. 2012 do 30. 6. 2013 ($n = 50$). V vsako od časovnih populacij smo uvrstili vse osebe, ki smo jih zaznali v posamezni sezoni, ne glede na leto njihovega rojstva. Časovne populacije so torej zajemale mešane generacije. Sezone spremljanja smo časovno določili tako, da smo v posamezni sezoni lahko zaznavali

mladiče le enega leta, kar je mogoče od začetka meseca julija, ko so se mladiči sposobni skupaj s svojim tropom že premikati na krajših razdaljah znotraj svojega teritorija in niso več vezani le na brlog. Mladičev, ki so skoteni v mesecu aprilu ali maju in so prva dva do tri mesece vezani na brlog, pa v populaciji še ni mogoče zaznavati. Na ta način smo iz časovnih populacij uspeli izločiti vsaj eno generacijo osebkov. V vsaki sezoni (od 2010 do 2013) smo na območju Slovenije in delu Gorskega Kotarja naredili »genetski izlov« populacije volka in tako dobili podatke o celotni subpopulaciji, in ne le o vzorcu.

Za vsako od časovnih populacij smo s pomočjo programa Arlequin 3.5.2 (Excoffier in Lischer, 2010) izračunali osnovne populacijsko genetske parametre (A , H_o in H_e) in naredili test Hardy-Weinbergovega ravnovesja (št. korakov v markovski verigi 1.000.000 in št. dememorizacijskih korakov 100.000).

Nadalje smo N_e ocenili še za obdobje od leta 2003 do 2012. Uporabili smo metodo drsečega časovnega okna, kjer smo v vsako kohorto zajeli osebkke, vzorčene v obdobju štirih let, kar po oceni Von Holdt in sod. (2008) ustreza približnemu povprečnemu generacijskemu času (pričakovana starost pri kateri imajo člani določene kohorte mladiče) za volkove v naravnih nereguliranih populacijah (natančneje 4,16 let) ter tako tvorili SZ dinarsko subpopulacijo. V naših kohortah smo zajeli tako mladiče kot njihove starše. Ker se v SZ dinarsko subpopulacijo od leta 1999 ponovno posega z izrednim oziroma letnim odstrelom in je generacijski obrat večji, predvidevamo, da je povprečni generacijski čas nekoliko krajši. Zato smo analizo ponovili še s triletnim razponom drsečega časovnega okna. Drseče časovno okno smo pomikali po eno leto naprej in tako sproti oblikovali kohorte.

Oceno N_e smo za vse tri različice podatkov naredili v programu LDNE (Waples in Do, 2008). Da bi se izognili napaki, ki jo povzročajo redki aleli in vseeno ohranili visoko stopnjo natančnosti, smo iz analize izključili redke alele, ki imajo frekvenco pojavljanja nižjo od vrednosti, ki je med $1/S$ in $1/2S$, pri čemer je S velikost vzorca (Waples in Do, 2010). Kritične vrednosti smo glede na velikost vzorca prilagodili vsaki kohorti posebej (preglednica 3).

Preglednica 3: Kritične vrednosti za redke alele za oceno N_e z metodo LD. Alele, ki so imeli nižjo frekvenco pojavljanja od vrednosti, ki je med $1/S$ in $1/2S$, pri čemer je S velikost vzorca (Waples in Do, 2010) smo izključili iz analize. Kritične vrednosti smo glede na velikost vzorca prilagodili vsaki kohorti oz. časovni populaciji posebej.

Table 3: Critical values for rare alleles for estimation of N_e using LD. Alleles with frequency of occurrence lower than the value between $1/S$ and $1/2S$, where S is the sample size (Waples and Do, 2010), were excluded from the analysis. We adopted critical values to the sample size of each cohort or time population separately.

časovno okno/		kritična vrednost	
sezona	obdobje	št. osebkov	za redke alele
sezona 1	2010 - 2011	51	0,015
sezona 2	2011 - 2012	54	0,01
sezona 3	2012 - 2013	50	0,02
4 letno okno	2003-2006	8*	0,06
4 letno okno	2004-2007	18*	0,04
4 letno okno	2005-2008	25	0,01
4 letno okno	2006-2009	19*	0,04
4 letno okno	2007-2010	20*	0,01
4 letno okno	2008-2011	54	0,01
4 letno okno	2009-2012	72	0,01
4 letno okno	2010-2013	73	0,01
3 letno okno	2003-2005	2*	0,07
3 letno okno	2004-2006	6*	0,07
3 letno okno	2005-2007	12*	0,07
3 letno okno	2006-2008	13*	0,07
3 letno okno	2007-2009	6*	0,07
3 letno okno	2008-2010	14*	0,02
3 letno okno	2009-2011	40	0,018
3 letno okno	2010-2012	32	0,02
3 letno okno	2011-2013	41	0,018

*označuje časovne populacije oz. kohorte s premajhnim številom vzorcev za zanesljivo oceno N_e .

4.7 ANALIZA ŠKODNIH PRIMEROV

V analizo škodnih primerov smo vključili vzorce sline s kadavrov, ki so jih za seboj pustili povzročitelji škode in so jih v obdobju od leta 2010 do vključno 2013 zbrali pooblaščenci Zavoda za gozdove, skupno 452 vzorcev sline s 329 škodnih primerov. Podatke smo obdelali v programskem okolju R (R Development Core Team, 2011) in ArcGIS (ESRI, 2011).

Za potrebe ugotavljanja pripadnosti tropom in socialnega statusa smo uporabili rodovnike, ki so bili izdelani tekom intenzivnega spremljanja populacije (Potočnik in sod., 2012; Skrbušek in sod., neobjavljeno).

5. REZULTATI

5.1 GENOTIPIZACIJA, NAPAKE PRI GENOTIPIZACIJI IN NIČELNI ALELI

Na 35 avtosomnih lokusih smo genotipizirali 381 različnih osebkov iz Slovenije in Hrvaške, ki so bili zbrani v obdobju od 2003 do 2013. Med njimi je bilo 52 psov in 329 domnevnih volkov. Iz 'volčjega' seta podatkov smo po opravljeni PCA in Structure analizi izločili en vzorec iztrebka, za katerega se je izkazalo, da pripada psu, in 34 vzorcev tkiv in en vzorec sline s škodnega primera, ki kažejo znake mešanja s psi in smo jih nadalje obravnavali pri analizah križanja volka in psa.

Izmed šestih modelov, s katerimi smo preverjali prisotnost ničelnih alelov, je model, ki upošteva vse tri spremenljivke (n, ničelne alele; f, parjenje v sokrvju; b, napake pri genotipizaciji), tako za celotno dinarsko populacijo kot le za SZ dinarsko subpopulacijo, najbolje ocenil njihovo frekvenco pojavljanja. V prilogi E1 so podane vrednosti odklonskega informacijskega kriterija (Deviance Information Criterion (DIC)) za vseh šest modelov, v prilogi E2 pa so ocenjene frekvence pojavljanja ničelnih alelov po metodah IIM in PIM. Za SZ dinarsko subpopulacijo je vrednost DIC v primeru modelov nfb in fb majhna in zato smo verjetno frekvenco pojavljanja ničelnih alelov preverili tudi po modelu fb, ki torej upošteva le dve spremenljivki - parjenje v sokrvju in napake. Po tem modelu so

frekvence pojavljanja ničelnih alelov na vseh lokusih enke 0. Po modelu nfb metode IIM pa so ocenjene frekvence tako za SZ dinarsko subpopulacijo kot celotno populacijo zanemarljivo majhne, enako velja za frekvence dobljene z metodo PIM.

Prisotnost ničelnih alelov pa tako pri celi dinarski populaciji kot pri SZ dinarski subpopulaciji na lokusu FH2004 potrjuje analiza v programu Microchecker. Ta lokus smo iz analiz izločili in raziskavo nadaljevali s 34 lokusi.

V povprečju smo vsak referenčni vzorec ponovili 2,3-krat, vendar pa se je število amplifikacij na vzorec razlikovalo glede na tip vzorca - vzorci s slabšo kvaliteto DNA so bili v povprečju ponovljeni 3,9-krat, vzorci z dobro kvaliteto DNA pa 1,8-krat. Imeli smo 0,77 % manjkajočih podatkov. Mediana izpada alelov (ADO) je bila 4,1 % (0,8 5% - 11,96 %) za manj kvalitetne vzorce in 0,27 % (0 % - 2,17 %) za vzorce dobre kvalitete. Lažne alele smo zaznali v treh tipih vzorcev, in sicer v krvi, v brisih ustne sluznice in v propadajočih tkivnih vzorcih (trupla volkov, ki so bila najdena v naravi nekaj dni ali tednov po poginu živali). Zaznali smo jih na posameznih lokusih: AHTh260, FH2010, INRA21, INU055, REN162C04, CPH22 in INU030, frekvenca pojavljanja lažnih alelov pa se je gibala med 1,28 % to 2,08 % na lokus za posamezni tip vzorcev, skupna ocenjena frekvenca lažnih alelov je 0,02 %.

Za celotno dinarsko populacijo smo imeli na koncu 294 multi-lokusnih referenčnih genotipov volkov, za SZ dinarsko subpopulacijo pa 198. Verjetnost identičnosti (PI) in verjetnost identičnosti za brate in sestre (PIsib) sta bili $1,03 \times 10^{-33}$ in $4,09 \times 10^{-13}$.

5.2 POPULACIJSKO GENETSKE ANALIZE

5.2.1 Mere genske raznolikosti in primerjava z drugimi populacijami

Mere genetske raznolikosti za celotno dinarsko populacijo in SZ dinarsko subpopulacijo so podane v preglednici 4 in v prilogi G.

Za celotno dinarsko populacijo smo na vseh lokusih skupaj dobili 258 različnih alelov. Število alelov na lokusih se giblje od 4 (lokusa CPH22 in FH2069) do 14 (lokus AHTh260). Povprečno število alelov na lokus je 7,3, povprečno efektivno število alelov na lokus pa 3,8. Najbolj informativen je lokus FH2137, ki ima efektivno 8,5 alelov, najmanj informativen pa je FH2096, ki ima sicer štiri alele, od katerih je eden zelo pogost, trije pa imajo med volkovi nižjo frekvenco pojavljanja (efektivno 1,68 alelov).

Preglednica 4: Mere genetske raznolikosti za celotno dinarsko populacijo in za SZ dinarsko subpopulacijo za celotno časovno obdobje in za štiri časovne populacije. N - število osebkov, A - število alelov, Ae – efektivno št. alelov, He - pričakovana heterozigotnost in Ho - opažena heterozigotnost, s.d. - standardna deviacija.

Table 4: Genetic diversity indexes for the whole Dinaric population and for the NW Dinaric subpopulation for the whole time period and separated into four time populations. N - number of specimens, A - number of alleles, Ae - effective number of alleles, He - expected heterozygosity and Ho - observed heterozygosity, s.d. - standard deviation.

	N	A (s.d.)	Ae (s.d.)	He (s.d.)	Ho (s.d.)
dinarska pop.	294	7,32 (2,23)	3,85 (1,55)	0,7 (0,11)	0,68 (0,12)
SZ dinarska subpop.	198	6,62 (1,86)	3,59 (1,55)	0,67 (0,12)	0,67 (0,14)
SZ dinarska subpop. (2003-2010)	85	5,74 (1,79)	/	0,65 (0,14)	0,64 (0,15)
SZ dinarska subpop. (2010-2011)	51	5,94 (1,68)	/	0,68 (0,12)	0,69 (0,15)
SZ dinarska subpop. (2011-2012)	54	5,91 (1,42)	/	0,67 (0,13)	0,69 (0,15)
SZ dinarska subpop. (2012-2013)	50	5,57 (1,44)	/	0,67 (0,13)	0,67 (0,15)

Za SZ dinarsko subpopulacijo ($n = 198$) smo dobili 233 različnih alelov, število alelov med lokusi se giblje med 3 (lokus FH2096) in 12 (lokus AHTh260). V povprečju pa smo na lokusih dobili 6,6 različnih alelov in efektivno 3,6 alelov. Tudi v tem primeru je najbolj informativen lokus FH2137, ki ima efektivno 8 alelov, in spet najmanj informativen

FH2096, ki ima efektivno le 1,03 alelov. V primeru SZ dinarske subpopulacije je glede na manjše območje in manjše število volkov genetska raznolikost pričakovano nekoliko nižja.

Vrednosti opažene heterozigotnosti H_o za celotno dinarsko populacijo se po lokusih giblje med 0,34 (lokus FH2096) in 0,88 (lokus FH20137), v povprečju pa je H_o enaka 0,68 (priloga G1). Vrednosti H_o SZ dinarske subpopulacije so podobne in se gibljejo od 0,3 (lokus FH2096) do 0,89 (lokus FH20137), povprečna vrednost H_o pa je 0,67 (priloga G2). Če za posamezne lokuse izrišemo razmerje med pričakovano in opaženo heterozigotnosjo (priloga F), lahko preverimo, ali je mogoče za celoten nabor lokusov opaziti vzorec razmerja med obema merama. Odstopanja od Hardy-Weinbergovega razmerja namreč dajo vpogled v parjenje v populaciji, socialno vedenje in genetsko strukturo (Allendorf in Luikart, 2007). Vidimo, da je v primeru celotne dinarske populacije pričakovana heterozigotnost za večino lokusov višja od opažene, medtem ko je razmerje H_e in H_o bolj enakomerno porazdeljeno za SZ dinarsko subpopulacijo (priloga F in G2). Večje odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja je v primeru celotne populacije verjetno posledica Wahlundovega efekta oziroma populacijske strukture, medtem ko za SZ dinarsko subpopulacijo lahko predvidevamo panmiksijo.

Rezultati primerjave genetske pestrosti obravnavane subpopulacije z genetsko pestrostjo drugih evropskih populacij so zbrani v preglednici 5. SZ dinarsko subpopulacijo smo glede na število analiziranih genetskih markerjev, število analiziranih osebkov in razmeroma visoko genetsko pestrost lahko obravnavali kot referenčno populacijo (Skrbinšek in sod., 2012b). Študije, ki smo jih vključili v primerjavo so obravnavale različno število markerjev, od deset (Aspi in sod., 2006) do 42 (Godinho in sod., 2011). Najmanj lokusov ($N = 6$) smo lahko primerjali za skandinavsko in finsko populacijo (Flagstad in sod., 2003), največ ($N = 17$) pa za ibersko populacijo, saj so Godinho in sod. (2011) v raziskavo vključili isti nabor markerjev iz komercialno dostopnega kita, razvitega za pse.

Najnižjo genetsko pestrost je mogoče opaziti pri italijanski populaciji ($H_e = 0,81$) in najvišjo pri ruski ($H_e = 1,51$). Razmerje alelne pestrosti (A_r) pa je najnižje za skandinavske volkove ($A_r = 0,91$ za obdobje med leti 1940 in 1980 ter $A_r = 0,69$ za obdobje od 1991 do 2011) in najvišje za volkove v Rusiji ($A_r = 2,28$).

Preglednica 5: Primerjava genetske pestrosti SZ dinarske subpopulacije volka z drugimi populacijami.**Table 5: Comparison of genetic diversity of NW Dinaric subpopulation to other European wolf populations.**

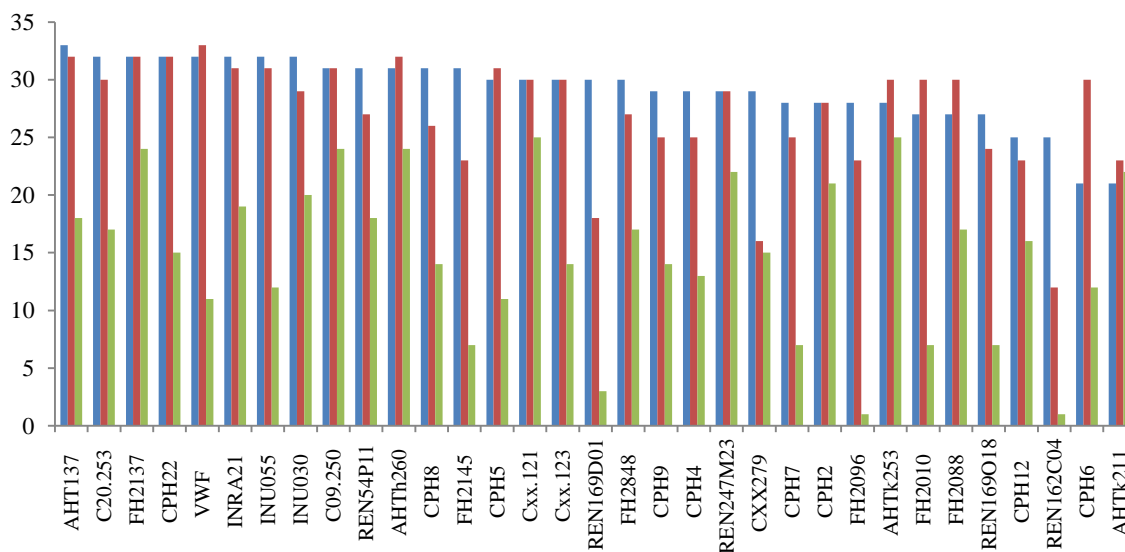
Avtorji	Populacija/območje	Št. vzorcev	Št. analiziranih lokusov/št. skupnih lokusov	Relativna genetska pestrost posamezne populacije glede na referenčno populacijo		
				Ar (s.e.)	Her (s.e.)	Hor (s.e.)
Bensch in sod., 2006	Skandinavija (1991-2001)	87	31/8	0,69 (0,11)	1,08 (0,15)	0,96 (0,07)
Flagstad in sod., 2003	Skandinavija (1940-1980)	8,5	15/6	0,91 (0,18)	1,12 (0,25)	0,86 (0,20)
Fabrizi in sod., 2014	Italija	282	12/10	0,92 (0,19)	0,81 (0,12)	0,78 (0,12)
Godinho in sod., 2011	Iberski polotok	208	42/17	0,96 (0,12)	0,91 (0,07)	NA
Jelenčič in sod., v pripravi	Dinaridi - Lika	34	34/34	1,06 (0,07)	1,06 (0,05)	1,04 (0,06)
Jelenčič in sod., v pripravi	S Dinaridi - referenčna populacija	135	34/34	1,07 (0,08)	1,03 (0,06)	1,00 (0,05)
Jelenčič in sod., v pripravi	Dinaridi - Dalmacija	56	34/34	1,12 (0,07)	1,09 (0,05)	1,01 (0,05)
Jährdrzejewski in sod., 2005	Beloveški gozd, Poljska	35	20/8	1,19 (0,19)	1,25 (0,18)	NA
Aspi in sod., 2006	Finska (2002-2004)	48	10/7	1,20 (0,20)	1,25 (0,22)	0,96 (0,12)
Aspi in sod., 2006	Finska (1996-1998)	31	10/7	1,20 (0,22)	1,19 (0,22)	0,97 (0,13)
Jansson in sod., 2012	Finska (2007-2009)	33	17/13	1,21 (0,15)	1,13 (0,12)	0,91 (0,09)
Aspi in sod., 2009	Archangelsk, Rusija	14	10/7	1,22 (0,22)	1,18 (0,22)	0,96 (0,15)
Aspi in sod., 2006	Finska (1999-2001)	39	10/7	1,23 (0,21)	1,22 (0,22)	1,04 (0,13)
Hindrikson in sod., 2013	Estonija, Latvija (skupina D)	37	16/9	1,25 (0,18)	1,12 (0,16)	1,02 (0,10)
Flagstad in sod., 2003	Finska	20,7	15/6	1,27 (0,23)	1,33 (0,28)	1,01 (0,15)
Sastre in sod., 2010	Iberski polotok	47	13/4	1,28 (0,34)	1,26 (0,35)	0,82 (0,12)
Fabrizi in sod., 2014	Dinaridi	152	12/10	1,28 (0,22)	1,17 (0,16)	0,92 (0,09)
Jansson in sod., 2012	Karelja, Rusija	37	17/13	1,28 (0,16)	1,22 (0,13)	1,05 (0,10)
Aspi in sod., 2009	Karelja	29	10/7	1,30 (0,24)	1,29 (0,25)	1,02 (0,14)
Jelenčič in sod., v pripravi	Dinaridi	294	34/34	1,46 (0,12)	1,04 (0,04)	1,02 (0,05)
Hindrikson in sod., 2013	Estonija, Latvija (skupina A)	52	16/9	1,51 (0,24)	1,28 (0,17)	1,13 (0,11)
Hindrikson in sod., 2013	Estonija, Latvija (skupina B)	39	16/9	1,53 (0,21)	1,35 (0,18)	1,02 (0,11)
Czarnomska in sod., 2013	Poljska	457	11/6	1,65 (0,38)	1,18 (0,16)	0,87 (0,14)
Hindrikson in sod., 2013	Estonija, Latvija (skupina C)	38	16/9	2,15 (0,36)	1,37 (0,19)	1,17 (0,11)
Sastre in sod., 2010	Rusija	47	13/4	2,28 (0,64)	1,51 (0,40)	0,97 (0,14)
Moura in sod., 2013	Bolgarija	102	14/7	NA	1,35 (0,24)	1,03 (0,13)
Moura in sod., 2013	Bolgarija (nesorodni osebk)	62	14/7	NA	1,35 (0,24)	1,00 (0,13)
Randi in Lucchini, 2002	Italija	107	18/15	NA	0,81 (0,11)	NA

5.2.2 Vezavno neravnovesje lokusov

V dinarski populaciji in v SZ dinarski subpopulaciji je vezavno neravnovesje med lokusi na prvi pogled zelo visoko (priloga I1, I2). Od 561 parov lokusov jih je po korekciji za mnogotere primerjave v vezavnem neravnovesju v celi subpopulaciji 247 (44,02 %) (prej

492), v SZ dinarski subpopulaciji pa 267 (47,59 %) (prej 462). V nadaljevanju poročamo le za pare lokusov, ki so v vezavnem neravnovesju po korekciji za mnogotere primerjave. Vsak izmed 34 lokusov je v vezavnem neravnovesju z vsaj 21 lokusi (61,76 %), v primeru cele subpopulacije, oziroma z 12 lokusi (35,3 % vseh lokusov) v obravnavani subpopulaciji, ali več lokusi. V povprečju je v dinarski populaciji vsak lokus v vezavnem neravnovesju s 85,9 % oziroma 80 % lokusov v primeru SZ dinarske subpopulacije (slika 5).

Nekoliko drugačno sliko dobimo, če se osredotočimo le na SZ dinarsko subpopulacijo pred začetkom njenega triletnega intenzivnega spremljanja (priloga I3). Od 561 parov lokusov jih je v vezavnem neravnovesju 251 (44,74 %) oziroma 73 (13,01 %) po korekciji za mnogotere primerjave. V povprečju je v SZ dinarski subpopulaciji vsak lokus v vezavnem neravnovesju s 14,9 (43,82 %) lokusi (slika 5).



Slika 5: Število lokusov s katerimi je posamezni lokus v vezavnem neravnovesju. Modro - cela dinarska populacija; rdeče - SZ dinarska subpopulacija (2003 do 2013); zeleno - SZ dinarska subpopulacija pred intenzivnim spremljanjem populacije (2003 do 2010).

Figure 5: Number of loci that each locus is in linkage disequilibrium with. Blue - whole Dinaric population, red - NW Dinaric subpopulation (2003 to 2013), green - NW Dinaric subpopulation before intensive population monitoring in Slovenia (between 2003 and 2010).

Nekateri lokusi uporabljeni v naši študiji (19 lokusov, po dva ali trije) se nahajajo na istih kromosomih, vendar se predpostavlja, da je razdalja med njimi dovolj velika, da se dedujejo neodvisno (Godinho in sod., 2011). Visoko vezavno neravnovesje v dinarski populaciji oziroma v SZ dinarski subpopulaciji lahko deloma pripišemo veliki sorodnosti volkov, ki smo jih zaznali predvsem med leti 2010 in 2013, ko smo uspeli pridobiti veliko večino vzorcev živali, ki so v tem obdobju živele na območju Slovenije in delu Gorskega Kotarja. To je pokazala tudi analiza narejena po odstranitvi vzorcev iz zadnjih treh let (priloga I3).

5.2.3 Populacijsko ozko grlo

Test presežka heterozigotnosti ob predpostavki, da vsi lokusi mutirajo po TPM, kaže, da je preučevana subpopulacija preživela populacijsko ozko grlo, medtem ko ob predpostavki, da lokusi mutirajo po SMM, test tega ne potrjuje (preglednica 6). Glede na to, da je TPM primernejši model za opis mutacij pri mikrosatelitih, je njegov rezultat bolj verjeten in ga potrjuje tudi druga metoda.

Vrednosti GW indeksa so podane v prilogi G2 skupaj z merami genetske variabilnosti. Povprečna vrednost GW indeksa za skupno 29 lokusov je 0,40, kar je znatno manj od s simulacijami ocenjene mejne vrednosti 0,82 (Garza in sod., 2001). To prav tako nakazuje, da je SZ dinarska subpopulacija preživela populacijsko ozko grlo.

Dobljeni rezultati so dokaz, da so v SZ dinarski subpopulaciji učinki populacijskega ozkega grla vidni na genetski ravni.

Preglednica 6: Rezultati testa preživetja ozkega grla SZ dinarske populacije volka po metodi presežka heterozigotov po predpostavkah TPM in SMM ter povprečna vrednost GW indeksa.

Table 6: Results of bottleneck test for NW Dinaric wolf population by the heterozygosity excess method for TPM and SMM, and average value of GW index.

		TPM	SMM
Presežek heterozigotnosti	Wilcoxon	$p = 0,007$	$p = 0,853$
GW indeks	povpr.	0,40	
	st.dev.	0,12	

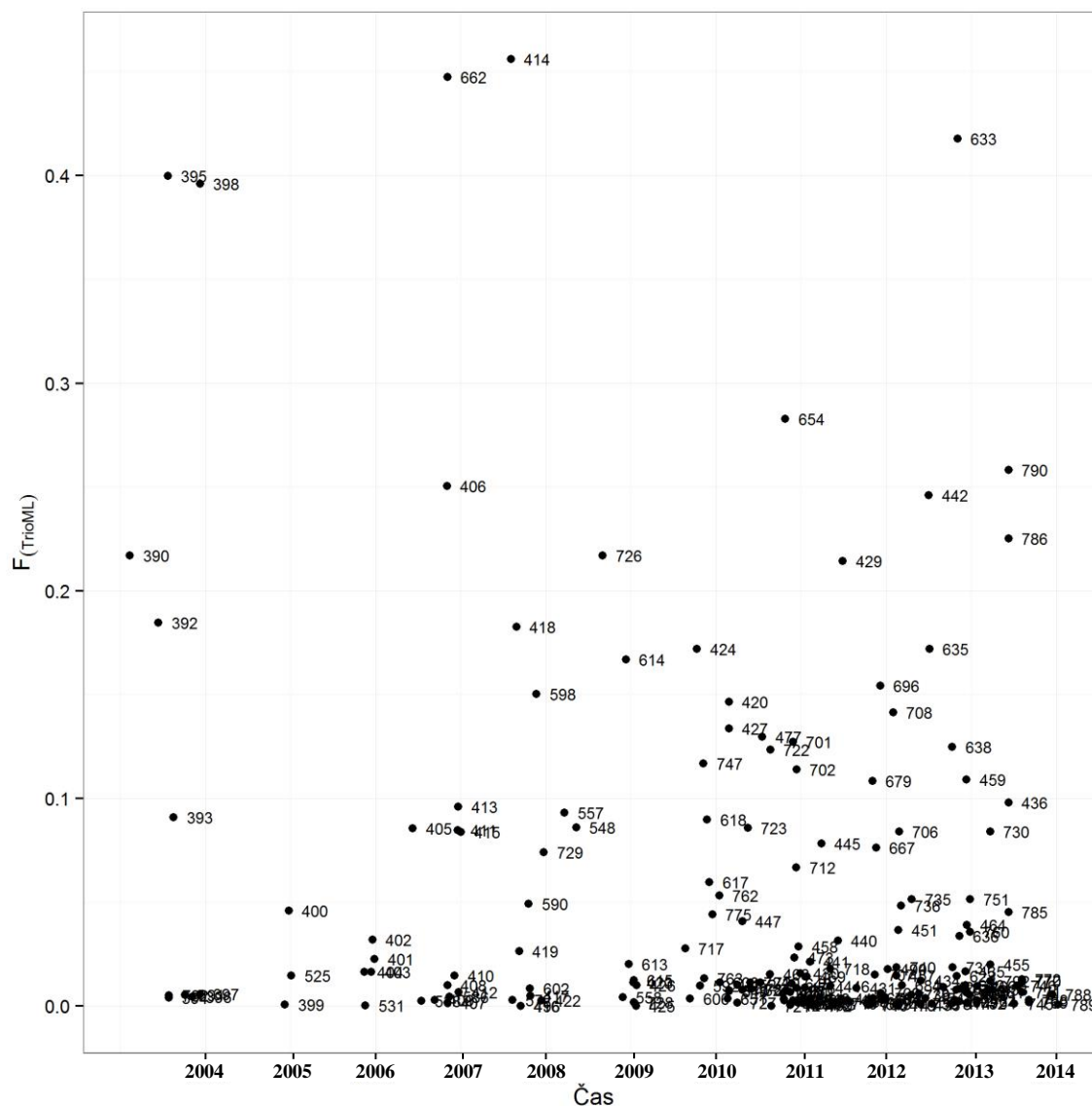
5.2.4 Ocena koeficienta sokrvja

Povprečna vrednost F_{is} je 0,01, kar kaže da parjenje v SZ dinarski subpopulaciji poteka približno naključno.

Vrednosti individualnega koeficienta sokrvja F , ki odraža stopnjo sorodnosti staršev posameznega osebka, ocenjene po metodah DyadML in TrioML niso normalno porazdeljene (priloga K1). Hkrati se interval zaupanja, ki smo ga dobili z metodo zankanja, ne pokriva s parametrom ničelne hipoteze (priloga K2 in K3). Hipotezo posledično zavrnemo, kar pomeni, da je koeficient sokrvja v povprečju različen od nič.

Povprečna vrednost F_{DyadML} je enaka 0,055 (st. dev. 0,09), F_{TrioML} pa 0,05 (st.dev. 0,09), kar pomeni, da se v povprečju med seboj pariyo osebki, ki so si sorodni nekoliko manj kot bratranci in sestrične ($1/16 = 0,06$ – full first cousins).

Če izrišemo vrednosti F_{TrioML} posameznih osebkov v času (slika 6), vidimo, da je večina vrednosti zelo blizu nič, medtem ko so vrednosti za posamezne osebke lahko tudi precej visoke.



Slika 6: Koefficient sokrvja F_{TrioML} za posamezne osebke na časovni skali.

Figure 6: Coefficient of inbreeding F_{TrioML} for individual animals in time.

5.2.5 Genetska pestrost štirih časovnih populacij SZ dinarske subpopulacije

Med štirimi časovnimi populacijami se povprečne vrednosti alelne pestrosti ter H_o in H_e bistveno ne razlikujejo. Povprečno število alelov se je na lokusih gibalo med 5,57 (tretja sezona) in 5,91 (druga sezona), povprečna H_o med 0,65 (pred začetkom sistematičnim spremljanja volkov) in 0,69 (v prvi in drugi sezoni) in povprečna H_e med 0,66 (pred začetkom sistematičnim spremljanja volkov) in 0,68 (v prvi sezoni).

Po korekciji za mnogotere primerjave od Hardy-Weinbergovega ravnovesja odstopa razmeroma majhno število lokusov: pet v časovni populaciji pred začetkom sistematičnega spremljanja volkov (FH2137, CPH4, FH2145, REN247M23, CPH22), eden za prvo sezono (FH2848), štirje za drugo sezono (FH2010, INU030, Cxx.123, FH2004) in pet za tretjo sezono (AHTk253, CPH2, REN169O18, AHTh260, CPH4).

Odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja na posameznih lokusih je lahko posledica asortativnega parjenja, ničelnih alelov, napak ali spolno vezanega dedovanja. Glede na to, da se med časovnimi populacijami lokusi, ki niso v Hardy-Weinbergovem ravnovesju, razlikujejo (v vsaki gre za druge lokuse) in da pri primerjavi razmerja med *He* in *Ho* ni opaznega vzorca (priloga J) smo analize, kjer ni posebej omenjeno, nadaljevali s celotnim setom markerjev.

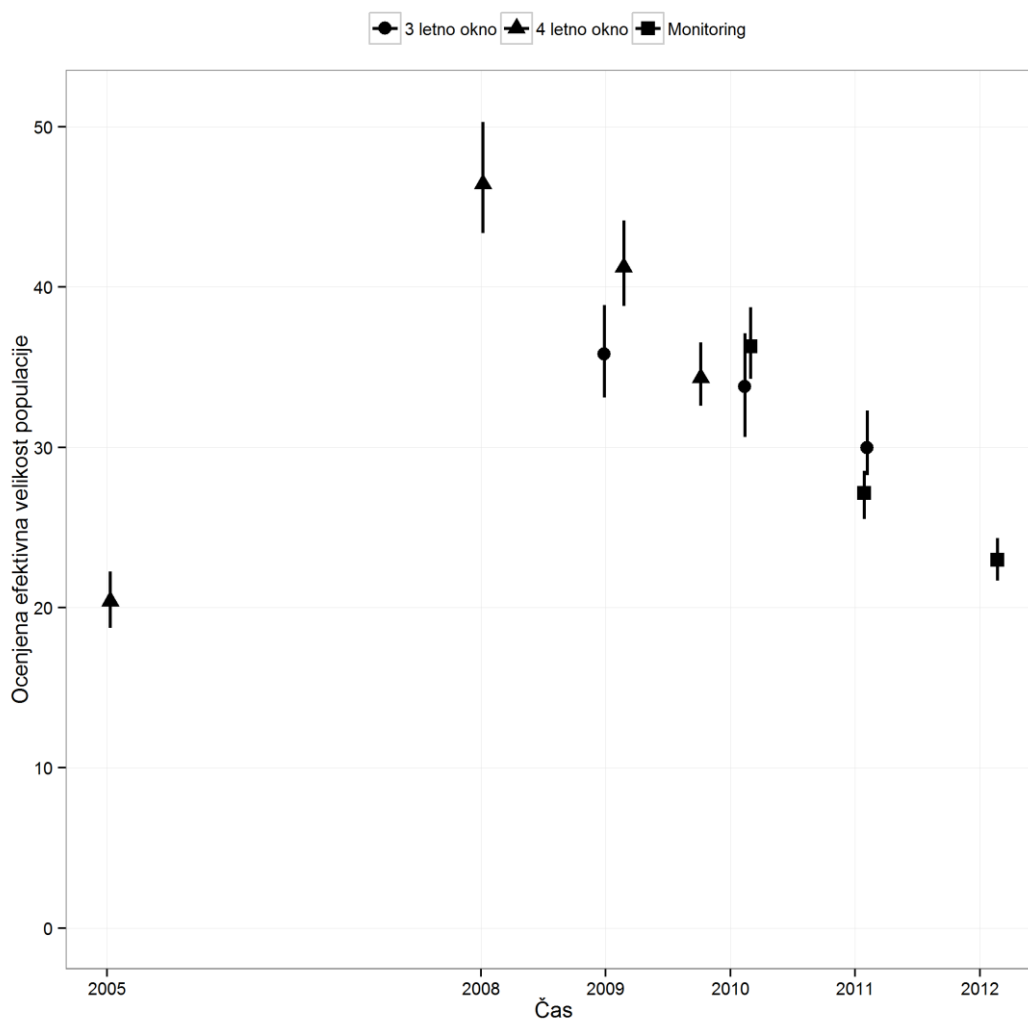
5.2.6 Efektivna velikost populacije

Oceno efektivne velikosti smo za iste podatke naredili na tri različne načine, ki pa so nam dali podobno sliko. Prvo zanesljivejšo oceno *Ne* dobimo s štiriletnim časovnim oknom za leto 2005 (slika 7). Za leta pred tem pa imamo premajhno število osebkov ($n < 20$) in posledično dobimo ocene z velikimi intervali zaupanja. Teh ocen na sliki 7 ni prikazanih, predstavljene pa so v prilogi L. Ocena efektivne velikosti populacije po metodi LD je namreč razmeroma zanesljiva šele pri velikosti vzorcev, ki štejejo vsaj 25 osebkov, v primerih, ko je tudi efektivna velikost obravnavane populacije dejansko majhna ($< 300 - 500$) (Waples, 2006; Waples in Do, 2010). V primeru SZ dinarske subpopulacije volka je glede na biologijo vrste in prostorsko velikost obravnavanega območja to sicer razumna predpostavka.

Za kohorte, ki se začnejo leta 2006 in 2007 je število osebkov zopet premajhno za zanesljivo oceno. Tako s štiriletnim časovnim oknom dobimo spet bolj zanesljive ocene šele po letu 2008 za zadnje tri kohorte. Za kohorte triletnega časovnega okna, zaradi še manjšega števila osebkov v vsaki od njih, dobimo prvo zaneslivejšo oceno le za zadnje tri kohorte, torej po letu 2009. V primeru enoletnih sezon, v času intenzivnega spremljanja populacije, smo imeli za vsa tri leta dovolj velik vzorec.

Ker smo kršili več predpostavk uporabljene metode (preglednica 7), pri čemer je ena najbolj kritičnih predpostavka o diskretnih generacijah, ki vodi v podcenitev efektivne velikosti populacije, moramo biti pri interpretaciji rezultatov previdni.

Glede na dobljene rezultate lahko pričakujemo, da se je N_e med leti 2008 in 2012 gibala nekje med 21 in 50 živalmi. Ocene N_e so za različne načine izračunov za prekrivajoča leta podobne. V vseh treh primerih pa gre opaziti trend zmanjševanja N_e , ki ga bi bilo treba dodatno preučiti, vendar pa to zaradi kompleksnosti metod in teorije, ki se še razvijajo, presega okvir te naloge.



Slika 7: Ocena N_e z intervali zaupanja za različna časovna obdobja s tri- (krog) in štiriletnim (trikotnik) drsečim časovnim oknom ter ocena za obdobje intenzivnega spremljanja subpopulacije v

Sloveniji in delu Gorskega Kotarja (2010-2013) (kvadrat). Ocene niso neodvisne ker se časovne populacije prekrivajo.

Figure 7: Estimated N_e with confidence intervals for three- (circle) and four-year (triangle) sliding window and during intensive monitoring of the population in Slovenia and part of Gorski Kotar area (2010-2013) (square). Estimates are not independent as the time generations overlap.

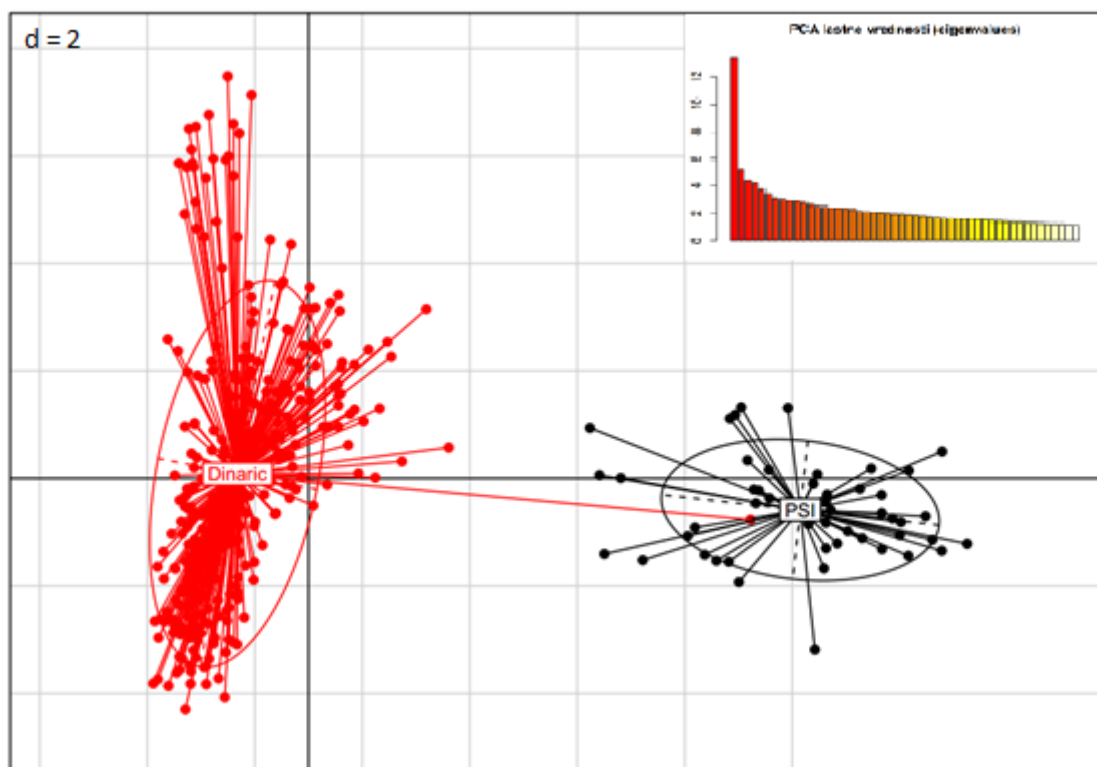
Preglednica 7: Predpostavke metode LD in njihove kršitve v primeru obravnavane subpopulacije.

Table 7: Assumptions of LD method and their violation in the case of studied subpopulation.

Predpostavka LD metode.	Kršitev predpostavk v primeru naše populacije.
Populacija je vzorčena naključno.	Hrvaški del subpopulacije je gledano z vidika časovne in prostorske razporeditve vzorčen bolj enakomerno, medtem ko smo v Sloveniji za obdobje med 2010 in 2013 poznali veliko večino volkov in bi lahko rekli, da je šlo za "genetski izlov", za obdobje pred tem pa razpolagamo s podatki za manjši del populacije (večinoma manj kot 10 osebkov letno). Z območja Gorskega Kotarja imamo od 2003 do 2013 skupno 58 živali (od tega 35 v obdobju 2010-2013). V Sloveniji imamo od leta 2003 do 2013 skupno 145 živali (od tega 103 v obdobju 2010-2013). V primerih, ko so posamezne družine bolj vzorčene, ima to lahko za posledico podcenjeno N_e . V našem primeru so v zadnjih treh letih na območju Slovenije vsi tropi volkov približno enakomerno vzorčeni, medtem ko so tropi, ki imajo večji del teritorija na Hrvaškem, vzorčeni slabše.
Populacija ni razdeljena.	Dinarska populacija je razdeljena v vsaj dve ali celo tri subpopulacije (Fabbri in sod., 2014). Zato smo oceno N_e naredili samo za SZ dinarsko subpopulacijo, znotraj katere pa ne pričakujemo dodatne deljenosti, saj je habitat neprekinjen in dobro povezan.
Generacije se ne prekrivajo.	Ker nimamo podatkov o starosti živali, smo kohorte oblikovali glede na pričakovani generacijski čas. V kohorte smo tako zajeli živali, ki so bile v danem obdobju prisotne na vzorčenem območju, ne glede na to ali pripadajo starševski generaciji ali generaciji potomcev. Ta predpostavka je v naši študij kršena tako pri oceni, ki smo jo pridobili z metodo drsečega okna, kot v primeru, ko N_e ocenimo za vsako od sezon v času intenzivnega spremljanja populacije.
Ni imigracije.	Fabbri in sod. (2014), ocenjujejo, da je recentna stopnja migracije (v obdobju od 1996-2011) med subpopulacijami nekje od 9 do 20 %. Predvidevamo pa, da v tako kratkih časovnih intervalih, kot smo jih uporabili v naši študiji, stopnja migracije vseeno ne presega 10 %, kar je za uporabo LD metode še sprejemljivo (Waples, 2010).
Velikost populacije je stabilna.	Po zavarovanju volkov leta 1990 (LZS) oziroma 1993 (država) si je populacija volkov opomogla in se tako številčno kot prostorsko razširila. V treh letih aktivnega spremljanja je bila velikost dela SZ dinarske subpopulacije stabilna, ocenjena na okoli 50 volkov (Potočnik in sod., 2014).
Ni mutacije, ni selekcije.	Glede na to, da gre za kratke časovne intervale lahko oba procesa zanemarimo. Osem lokusov odstopa od Hardy-Weinberovega ravnovesja. Razlog za odstopanja teh lokusov je bolj smiselno iskati v napakah pri genotipizaciji, končno veliki populaciji, starostni strukturi populacije in migraciji.
Enakovreden prispevek posameznih osebkov k naslednji generaciji.	Predpostavka je kršena, saj imajo volkovi kot vrsta socialno hierarhijo, kjer se parita le vodilni živali v tropu. Velja monogamija. Kršenje te predpostavke pri metodi LD ni kritično (Waples, 2006).

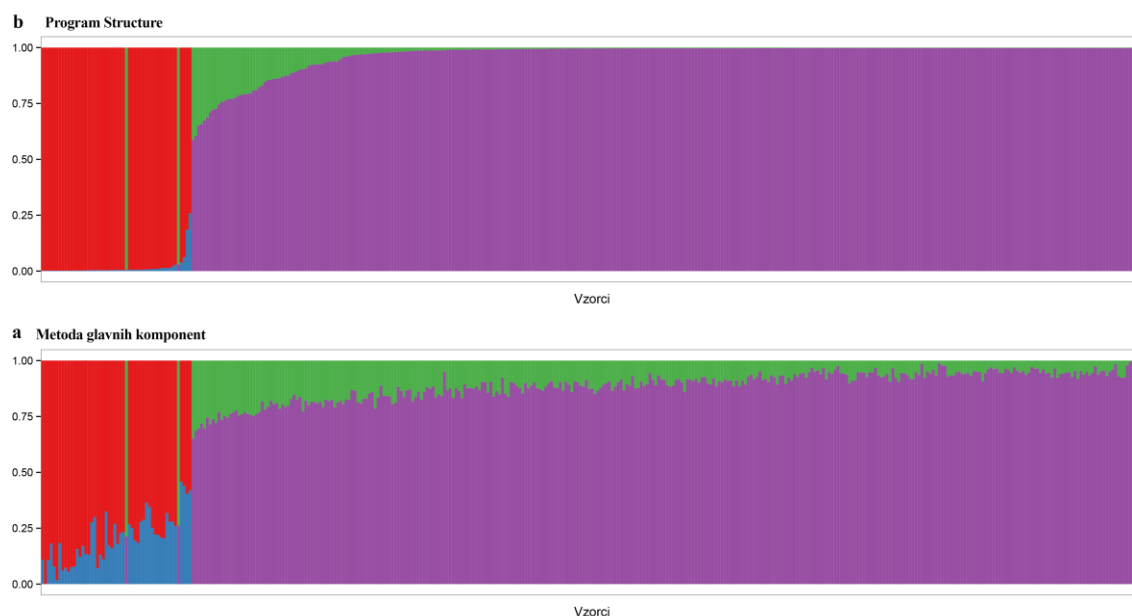
5.3 LOČEVANJE VOLKOV IN PSOV TER PREPOZNAVANJE KRIŽANCEV

Z obema uporabljenima metodama smo dobili jasno ločitev genotipov dinarskih volkov in psov ter križancev *F1* in *F2* generacije (slika 8 - analiza glavnih komponent (PCA) in slika 9 - PCA in Structure analize). PCA nam je dala grobo podobo razporejanja podatkov, medtem ko smo v nadaljnjih korakih več pozornosti posvetili rezultatom Structure analize. Da smo genotip vzorca s 95 % verjetnostjo prepoznali kot volčjega (slika 10), je morala biti s programom Structure ocenjena vrednost, da je osebek volk $p_{Volk} \geq 0,93$, oziroma vsaj $p_{Volk} \geq 0,89$ (minimalna vrednost). Obe kritični vrednosti izhajata iz razporeditve p_{Volk} vrednosti »čistih« volkov in simuliranih križancev (priloga M1, M2 in M3).



Slika 8: Lastne vrednosti vektorjev in analiza glavnih komponent. Prva komponenta jasno loči volkove in pse v dve skupini.

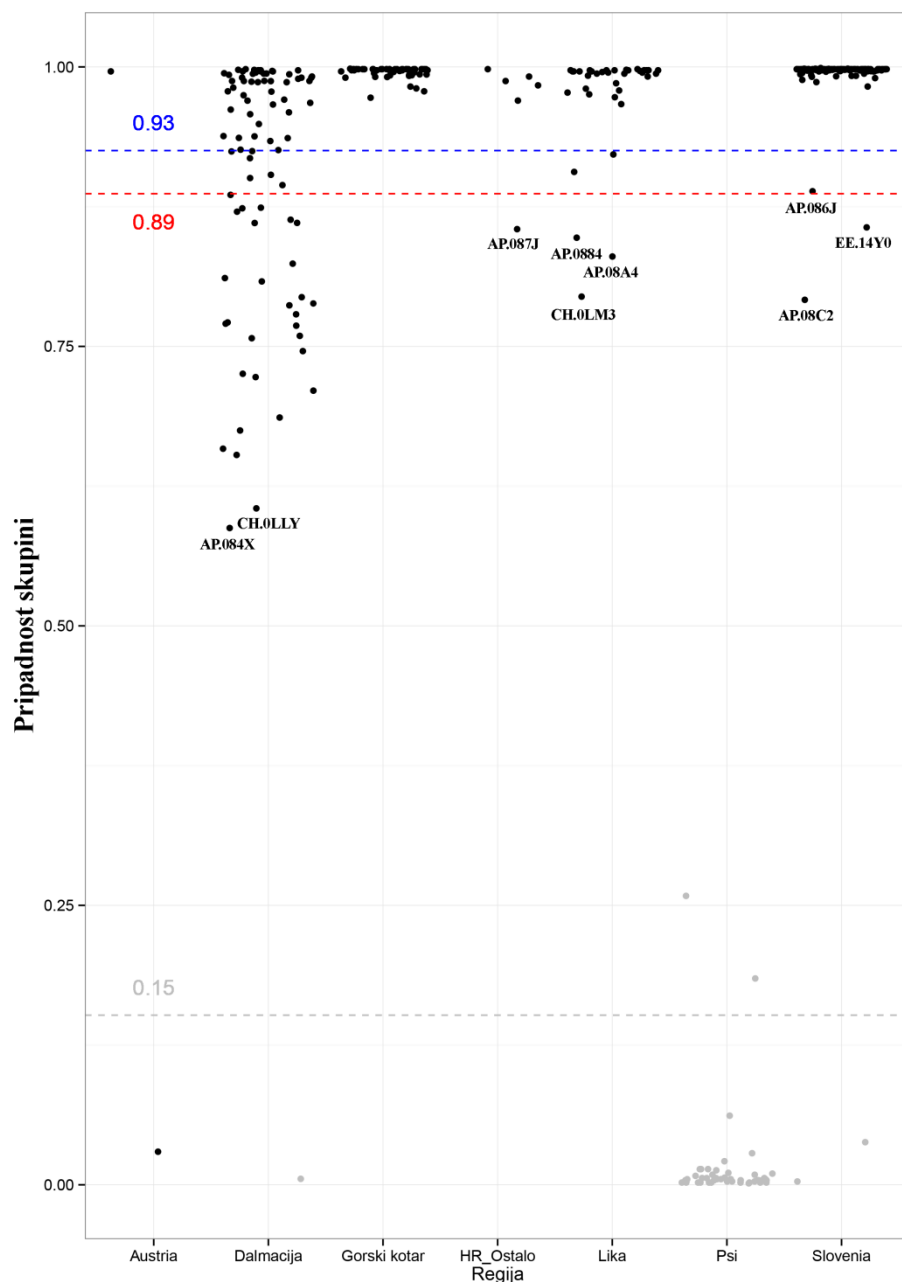
Figure 8: Eigen values and PCA. The first component clearly differentiates wolves and dogs into two separate clusters.



Slika 9: Rezultati dodelitvenih testov Structure analize (b) in rezultati metode glavnih komponent (a). V modro-rdeči barvni kombinaciji so prikazani osebki, ki smo jih v laboratorij prejeli kot pse, v vijolično-zelena pa kot volkove. Vsak stolpec predstavlja en osebek in oceno koeficienta pripadnosti psom (rdeča in zelena) oziroma volkovom (modra in vijolična). Prepoznavanje posameznih osebkov s tega grafikona je mogoče s prilogo M4.

Figure 9: Probabilistic assignment to the genetic clusters from Structure (b) and from PCA (a). The blue-red combination shows specimens which were received at the laboratory as dogs, and purple-green as wolves. Each column represents a single specimen and probabilistic assignment to dogs (red and green) and wolves (blue and purple). Individual wolves from this figure can be recognized in Annex M4.

V primeru vzorca iztrebka AY.0F2K iz Avstrije (priloga M4) se je izkazalo, da je šlo dejansko za iztrebek psa. Prav tako sta tkivni vzorec AP.084F iz Dalmacije tako Structure kot PCA dodelila med pse (priloga M4). Glede na to, da gre za vzorec razpadajočega trupla živali je najbolj verjetno, da je bila vrsta v osnovi napačno določena. Med lastniškimi psi smo zaznali dva osebka (AH.02UT in AH.02X0), ki kažeta znake povratnega križanja F1 križanca s psom.



Slika 10: p vrednosti posameznih vzorcev, da je vzorec volčji. Rdeča črtkana črta ($p_{Volk} \geq 0,89$) označuje najnižjo vrednost, da je vzorec volčji, modra črtkana črta ($p_{Volk} \geq 0,93$) pa označuje 95 % verjetnost, da vzorec pripada volku. Za boljšo preglednost smo vzorce razdelili v skupine glede na regijo najdbe.

Figure 10: p - values for individual animals belonging to wolves. The red line shows the lowest p -value ($p_{Wolf} \geq 0,89$) and the blue line ($p_{Wolf} \geq 0,93$) the p -value with 95 % probability for an individual to be recognized as a wolf. Samples are grouped by the region.

S slik 10 in 11 je razvidno, da v SZ dinarski subpopulaciji križanja med volkov in psi praktično nismo zaznali. Kot potencialne povratne križance smo v Sloveniji prepoznali dva

osebka (AP.08C2 in EE.14Y0), eden pa je čisto na spodnji meji kritične vrednosti za dodelitev med volkove (AP.086J). Enega povratnega križanca smo zaznali južno od Zagreba (AP.087J), tri pa v Liki (CH.0LM3, AP.08A4 in AP.0884). Glede na popolno odsotnost križancev prve in druge generacije v severnejšem delu populacije sklepamo, da gre v teh primerih za migrante iz drugih (sub)populacij ali pa gre za osebkke, ki so pobegnili iz ujetništva.

Za obdobje med leti 2003 in 2013 smo v Dalmaciji med 84 osebki kot križance prepoznali 28 živali. Dva osebka (AP.084X in CH.0LLY) se (mejno) uvrstita v skupino križancev prve oziroma druge generacije, vendar rezultat ni prepričljiv. Ostalih 26 lahko uvrstimo med povratne križance z volkom. Seznam križancev s pripadajočimi vrednosti verjetnosti za pripadnost psom je v prilogi M5.



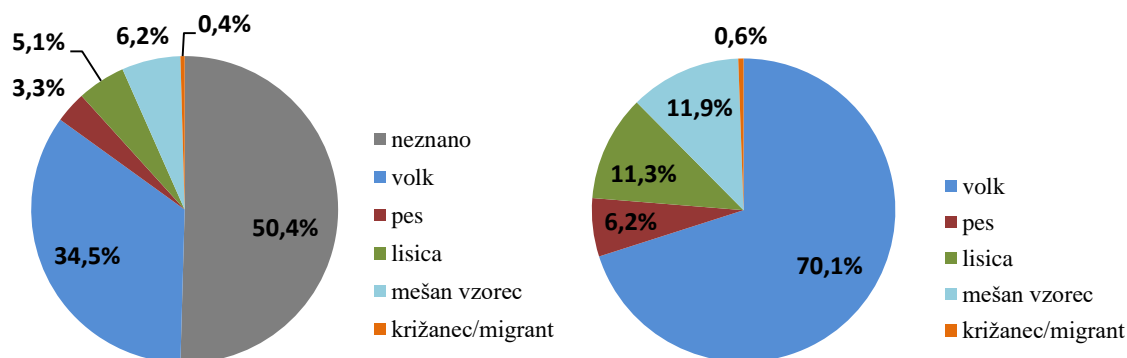
Slika 11: Prostorsko razporejanje vzorcev zaznanih križancev. V severnem delu Dinaridov križancev praktično ni zaznani, je pa ta problem bolj izrazit na območju Dalmacije.

Figure 11: Spatial distribution of recognized wolf-dog hybrids. Wolf-dog hybridization is almost absent in the northern part of the Dinaric region, while this problem is more obvious in Dalmatia region.

5.4 ŠKODNI PRIMERI IN UGOTAVLJANJE NJIHOVIH POVZROČITELJEV

Skupno smo tekom treh sezon spremljanja populacije volka pridobili 750 vzorcev slin zbranih s 458 različnih škodnih primerov. Analizirali smo 329 škodnih primerov, 129 pa je ostalo neanaliziranih. Z velike večine škodnih primerov smo analizirali po en vzorec (76,3 %) oziroma dva (18,5 %), s preostalih 5 % škodnih primerov pa smo analizirali do največ 15 vzorcev (v času testiranja metodologije na terenu).

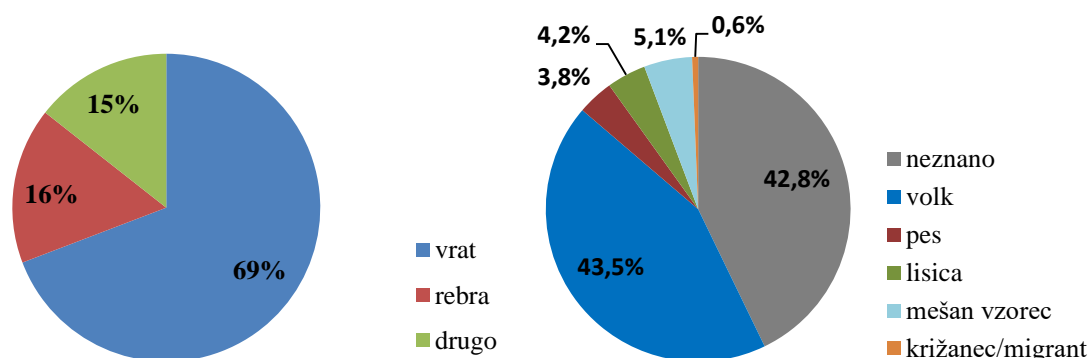
Od skupno 452 analiziranih vzorcev, jih 228 (50,4 %) ni delovalo oziroma so bili vzorci preveč slabe kvalitete, da bi lahko določili kateri vrsti ali celo osebkju pripadajo. V 28 vzorcih (6,2 %) smo ugotovili mešane genotipe različnih živalski vrst ali različnih osebkov, kar prav tako ni dovoljevalo zanesljive določitve povzročitelja (slika 12, levo). Za 196 vzorcev pa smo uspešno določili kateri vrsti pripadajo (slika 12, desno), v večini primerov volkov pa smo lahko prepoznali tudi posamezne osebkke. Lisice smo zaznali v 23 vzorcih z 20 (11,3 %) škodnih primerov, pse v 15 vzorcih z 11 (6,2 %) škodnih primerov, volkove v 156 s 124 (70 %) škodnih primerov in v dveh vzorcih z enega (0,6 %) škodnega primera križanca oziroma bolj verjetno imigranta iz druge populacije (morda povratni križanec iz Dalmacije).



Slika 12: Deleži zaznanih vrst v vzorcih (levo) in delež vrst zaznanih v vzorcih na škodnih primerih za katere smo določili povzročitelje oziroma živali, ki se sekundarno prehranjujejo na kadavrih (desno).

Figure 12: Proportion of different animal species recognized in saliva samples collected from carcasses (left) and their proportion at damage cases where we determined the predator or scavenger (right); gray – unknown, blue - wolf, red - dog, green - fox, violet - mixed sample, orange - wolf-dog hybrid or immigrant.

Glede na to, da nas je v prvi vrsti zanimal povzročitelj škodnega primera, smo se odločili, da se vzorce, če je le mogoče, jemlje z vratu v predelu smrtnih ran. Na tem mestu je večja verjetnost, da je zaznan osebek tudi dejanski povzročitelj škode in se žival ni le sekundarno prehranjevala na kadavru, hkrati se s tem izognemo tudi odvzemu mešanih DNA vzorcev. Večina analiziranih vzorcev (69,2 %) je bila tako odvzeta z vratu (slika 13, levo). Od skupno 313 vzorcev odvzetih z vratu za 42,8 % nismo uspeli določiti povzročitelja, v 43,5 % smo ugotovili volkove, pse v 3,8 % vzorcev, lisice v 4,2 %, mešanih pa je bilo 5,1 % vzorcev. Edini zaznani križanec (potencialni povratni križanec z volkovm) oziroma migrant je predstavljal slabega 0,6 % zaznanih vrst (slika 13, desno). Ker odvzem slin s smrtnih ran na vratu kadavra zaradi ni vedno mogoč, smo kot mesto odvzema vzorcev dopuščali tudi druge dele telesa, večinoma so bila to rebra (16,4 %) in drugo (14,4 %) - medenica, hrbet, vime, uhlji idr. (slika 13, levo).

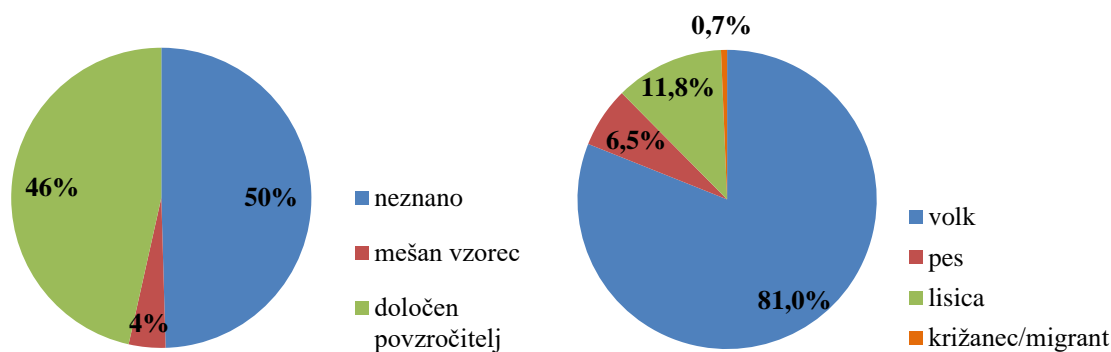


Slika 13: Delež vzorcev odvzetih z različnih delov kadavra (levo), delež vrst zaznanih v vzorcih odvzetih z vratu (desno).

Figure 13: Proportion of samples collected from different parts of carcasses (left); blue - neck area, red - ribs area, green - other body parts. Proportion of different animal species determined from samples collected from the neck area (right); grey - unknown, blue - wolf, red - dog, green - fox, violet - mixed sample, orange - wolf-dog hybrid/immigrant.

Če povzamemo, smo z molekularno genetskimi metodami povzročitelja uspeli določiti v 46 % škodnih primerov (slika 14, levo). Od tega smo volkove določili v 81 % škodnih

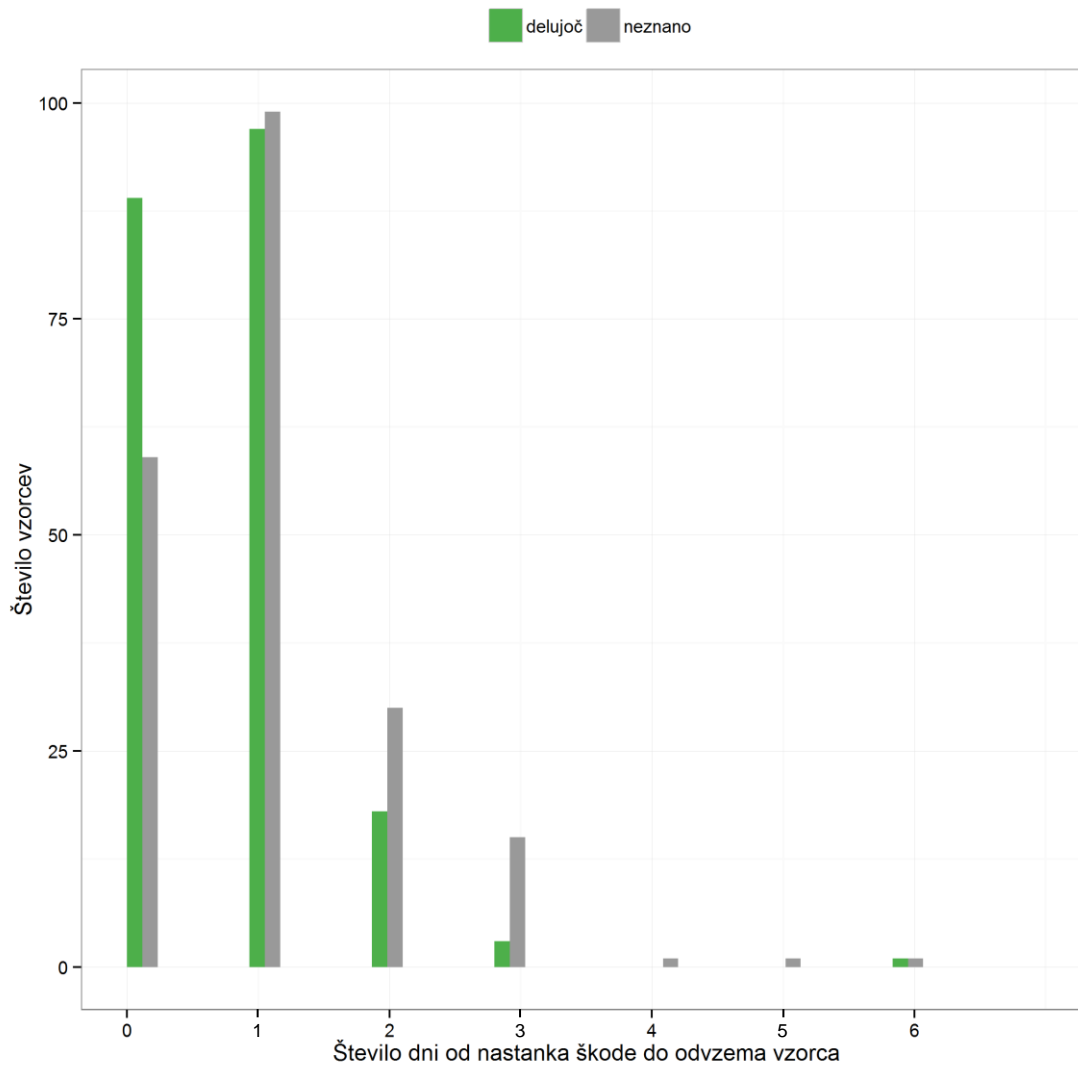
primerih, pse v 6 %, lisice v 12 % in križanca oz. migranta v manj kot 1 % (slika 14, desno).



Slika 14: Deleži uspešno in neuspešno analiziranih škodnih primerov (levo) in deleži škodnih primerov glede na ugotovljenega povzročitelja škode (desno).

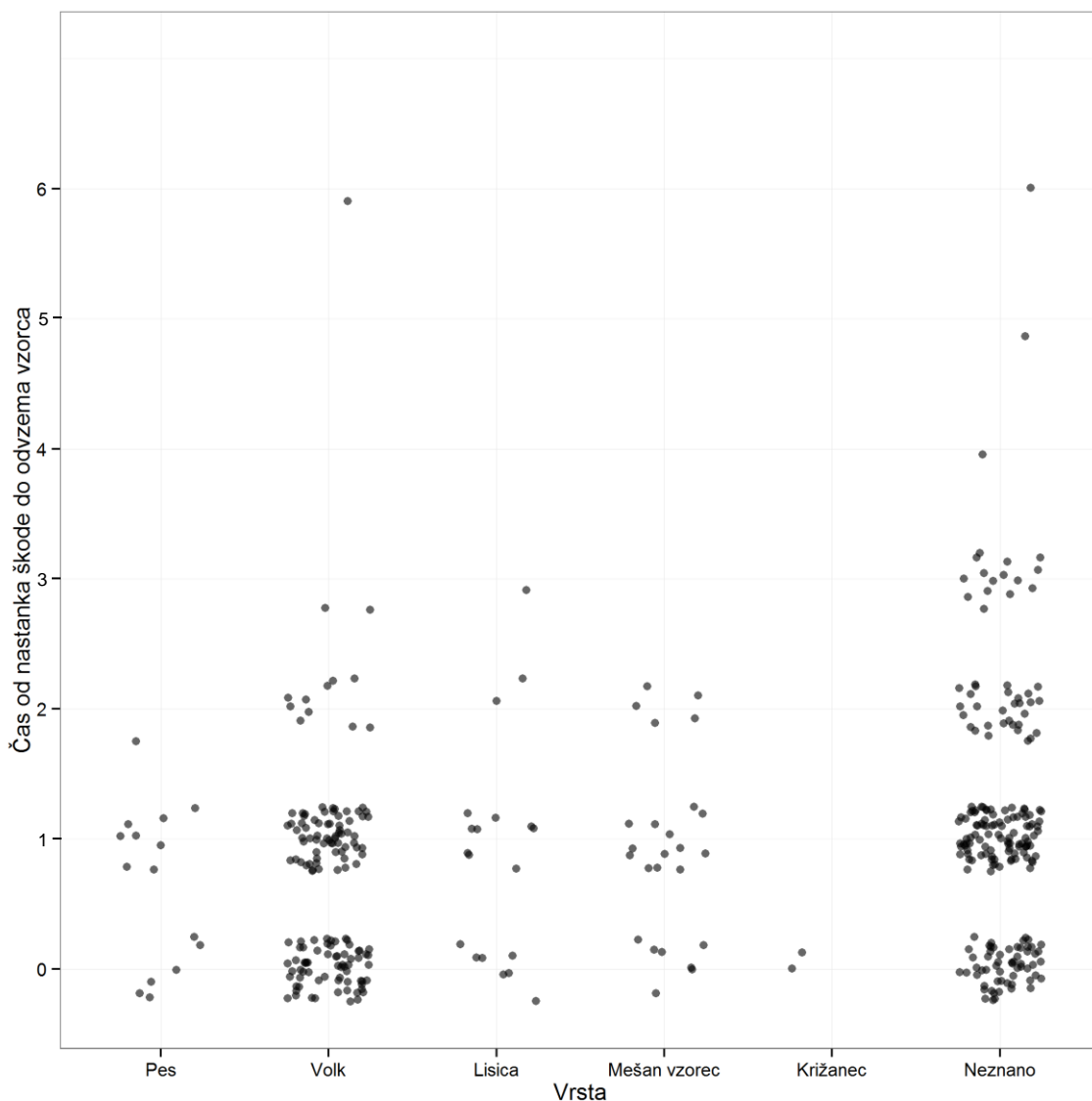
Figure 14: Proportion of solved (green) and unsolved (blue – unworking samples, red – mixed sample) damage cases (left) and proportion of species recognized as predators at damages (blue - wolf, red - dog, green - fox, violet - mixed sample, orange - wolf-dog hybrid/immigrant).

V povprečju so bili vzorci s škodnih primerov zbrani v 0,7 dneh od ocenjenega nastanka škode (slika 15). Z zagotavljanjem kratkega časa, od nastanka škode do odvzema vzorcev, smo povečali verjetnost za uspešno genotipizacijo vzorcev in s tem pridobitev genotipov živali, ki so dejansko povzročile škodo. Glede na sliko 16 lahko rečemo, da čas, ki preteče od ocenjenega nastanka škode do odvzema vzorcev, ne vpliva na vrstno strukturo zaznanih povzročiteljev. Verjetno bi zaradi sekundarnega prehranjevanja nekoliko drugačno sliko dobili, če bi imeli v analizo vključenih tudi več vzorcev z drugih delov kadavrov.



Slika 15: Število zbranih vzorcev od ocenjenega časa nastanka škode do odvzema vzorcev (zelena - delujoči in siva - nedelujoči vzorci).

Figure 15: Number of samples collected in consecutive days from the estimated time of the damage event (green - good quality samples/species determined; grey - low quality samples/not working).

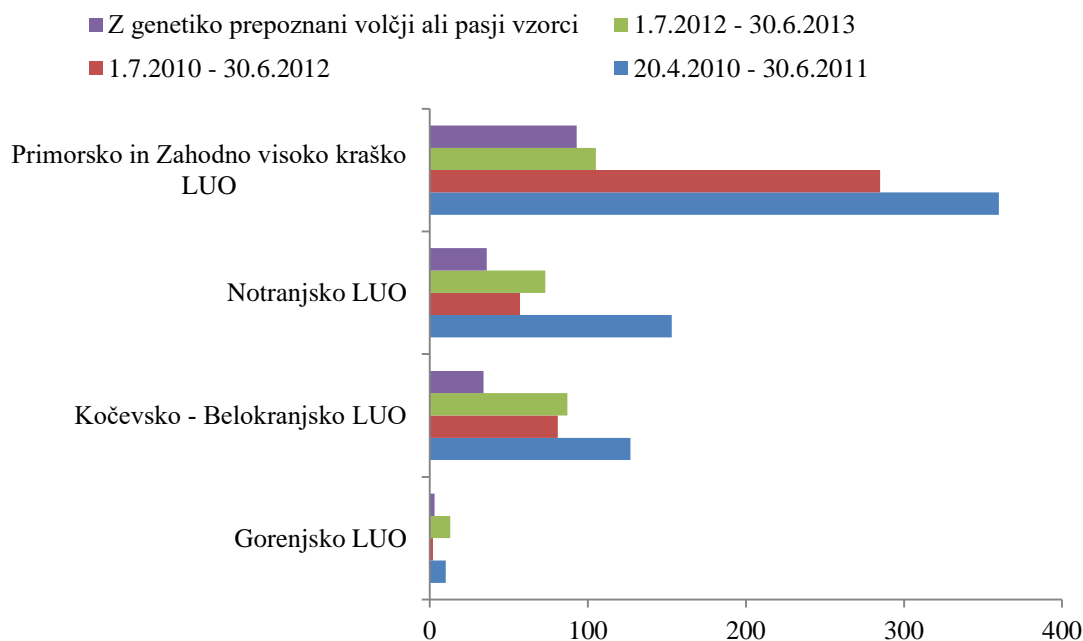


Slika 16: Vrste zaznane na kadavrih glede na čas, ki je pretekel od ocenjenega časa nastanka škode do odvzema vzorcev (v dnevih).

Figure 16: Species recognized in saliva samples considering the time passed from the damage event to collection of the sample (in days).

Pooblaščenca ZGS so največ škod vsako leto zabeležili na Primorskem (slika 17), kjer so v prvih dveh sezonah zabeležili skoraj polovico vseh škodnih primerov. V zadnji sezoni so se škode na Primorskem v primerjavi s prvo sezono zmanjšale za dve tretjini in število zabeleženih primerov se je med tremi večjimi regijami - Primorska, Notranjska, Kočevska, kjer so v Sloveniji prisotni volkovi, razporedilo bolj enakomerno. Pričakovano so na Gorenjskem in Novomeškem zabeležili manj škod zaradi volka, saj volkovi na teh

območjih niso stalno prisotni. Pričakovano smo sorazmerno z zabeleženim številom škodnih primerov tudi s pomočjo genetskih metod največ povzročiteljev škod uspešno določili za Primorsko in Zahodno visoko kraško regijo, ki so jim sledile ostale (slika 17).



Slika 17: Število na ZGS zabeleženih škodnih primerov glede na geografsko regijo in sezono spremljanja populacije volka. * LUO - lovsko upravljavsko območje

Figure 17: Number of damage cases recorded by Slovenia Forest Service regarding the geographical region and monitoring season of wolf population. In violet nuber of damage cases solved using genetics is shown. * LUO - hunting management unit

5.4.1 Škodni primeri, ki so jih povzročili volkovi

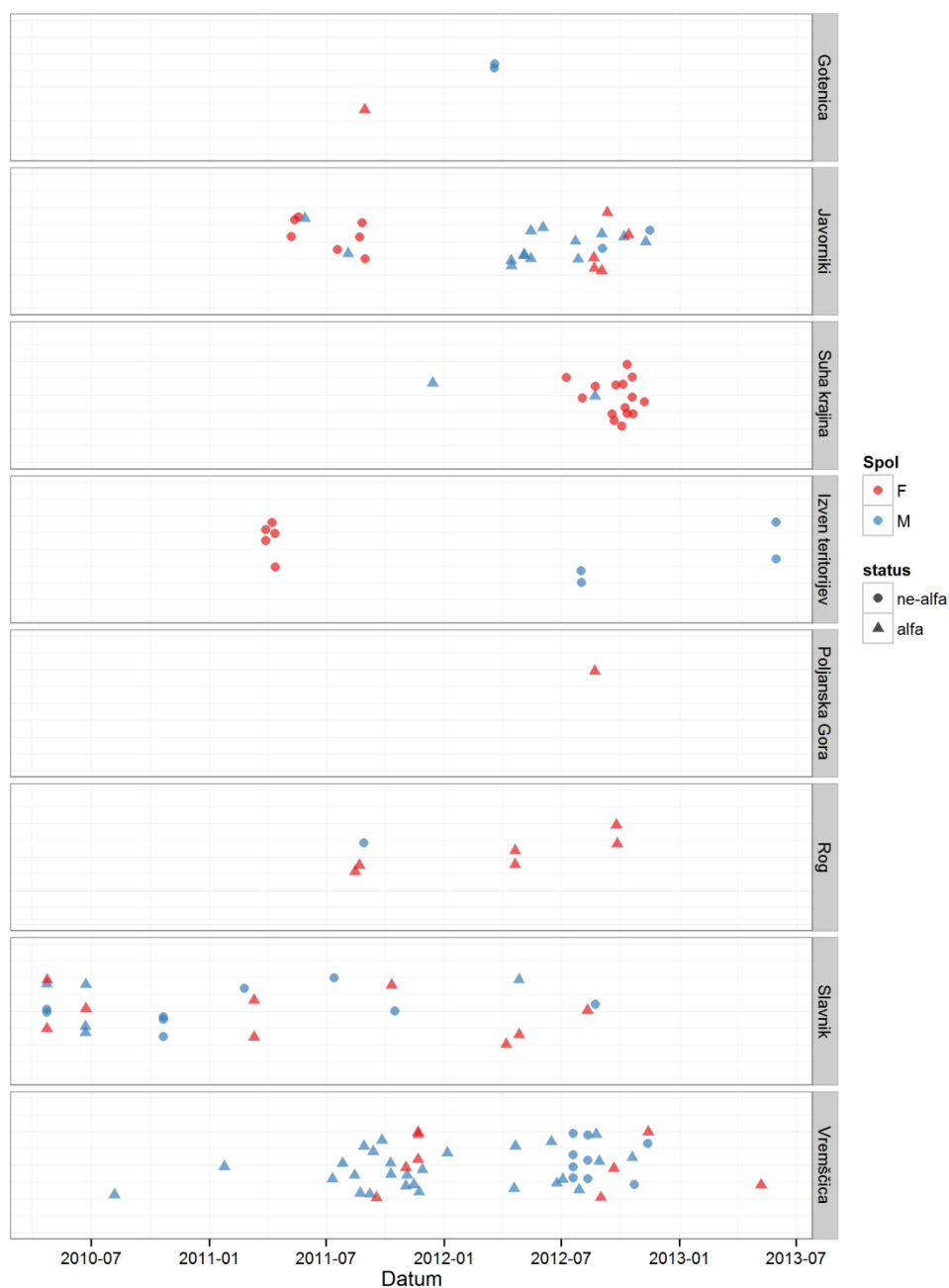
Na škodah smo tekom treh let zaznali 26 različnih volkov (priloga N), od tega jih je bilo 11 reproduktivnih in 15 nereproduktivnih. Nekoliko pogosteje so škode povzročali samci, saj smo 16 samcev, od tega štiri alfa, ugotovili v 76 vzorcih s škodnih primerov, deset samic, od tega sedem alfa, pa smo ugotovili v 58 vzorcih. V času intenzivnega spremljanja volkov smo sicer v Sloveniji s pomočjo genetike zaznali 103 različne volkove.

S slike 18 in 19 je razvidno, da so se škode najbolj redno pojavljale na območju teritorijev nanoško-vremškega, slavniškega in javorniškega tropa. Teritorija tropa nanos-vremščica in

slavniškega tropa sta na območju Primorskega in Zahodno visoko kraškega lovskega upravljaljskega območja, kjer je bilo tudi sicer zabeleženih največ škod (slika 17 in slika 19).

V največ vzorcih s škod ($n = 40$) smo prepoznali alfa samca iz tropa nanos-vremščica (»samec 428«), v 15 vzorcih smo ugotovili samico iz tropa suha krajina (»samica 740«), potem pa so sledile štiri alfa samice, ki smo jih ugotovili v od pet do osmih vzorcih s škodnih primerov in »samec 637«, ki je iz slavniškega tropa dispergiral na območje javorniškega tropa. »Samec 428« je med vsemi zaznanimi volkovi močno izstopal. Preostali trije alfa samci so bili zaznani v dveh do petih vzorcih. Seznam volkov, ki smo jih zaznali na škodnih primerih, s pripadajočimi podatki je v prilogi N.

»Samec 774«, ki smo ga prepoznali kot potencialnega povratnega križanca oziroma imigranta je škodo povzročil konec maja 2013 izven teritorijev znanih tropov.



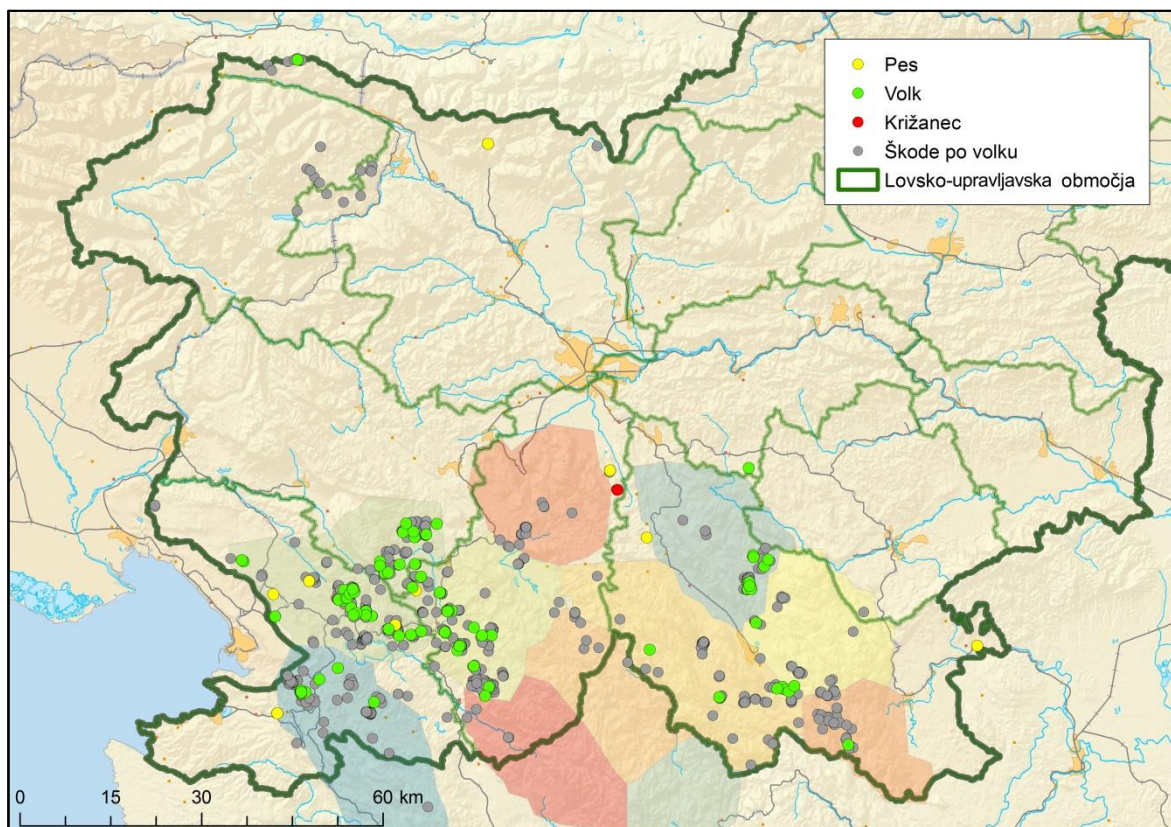
Slika 18: Časovno razporejanje škodnih primerov po volkovih, ki smo jih potrdili z genetskimi metodami, glede na meje znanih teritorijev. Škode so na teritoriju enega tropa lahko povzročali tudi volkovi iz sosednjih tropov ali volkovi v disperziji. Vsak simbol predstavlja delujoč vzorec, s posameznega škodnega primera pa je bilo lahko več takih vzorcev.

Figure 18: Time distribution of wolf's damages confirmed by genetics considering borders of known wolf territories. Damages could also be caused by wolves from other packs or wolves in dispersal. Each simbol represents a working sample, from the same damage case there could be more than one such sample.

5.4.2 Škodni primeri, ki so jih povzročili psi

Kot je razvidno iz rezultatov, smo pse ugotovili v 12 škodnih primerih, od tega je bil delujoč vzorec na eni škodi odvzet le z reber in tako ne moremo z gotovostjo trditi, da je škodo pes tudi dejansko povzročil. V enem primeru so bili na škodi vzeti trije vzorci, dva delujoča vzorca slin (eden z uhljev in eden z reber) in iztrebek. V iztrebku psa so bile ušesne markice drobnice, kar nam potrjuje, da je škode na točno določenem pašniku povzročal pes, ki naj bi drobnico sicer varoval pred napadi zveri. Tekom intenzivnega spremljanja populacije volka v Sloveniji smo torej zabeležili 11 škodnih primerov, ki so jih povzročili psi. Te škodne primere smo v glavnem zabeležili na Primorskem (slika 18).

Za 329 analiziranih škodnih primerov smo z genetskimi metodami za obdobje intenzivnega spremljanja populacije volka v Sloveniji (od 20. 4. 2010 do 30. 6. 2013) potrdili 11 primerov, ki so jih povzročili psi in 124 primerov na katerih so bili prisotni volkovi (večina vzorcev je bila odvzetih z vratu). Iz tega lahko zaključimo, da je število dogodkov, ki jih na območju prisotnosti volka povzročijo psi razmeroma majhno. Težko bi sklepali na časovno ali prostorsko dinamiko škod, ki jo povzročijo psi, saj imamo premalo takih škodnih primerov.



Slika 19: Prostorski prikaz škodnih primerov v Sloveniji med 2010 in 2013; Sivo - vsi škodni primeri, ki so jih popisali na ZGS (nedelujoči in neanalizirani primeri); zeleno - škodni primeri, na katerih smo zaznali volkove; rumeno - škodni primeri na katerih smo zaznali pse; rdeče - škodni primer, na katerem smo zaznali križanca oziroma migranta.

Figure 19: Spatial distribution of damage cases in Slovenia between 2010 and 2013; grey - all damage cases recorded by Slovenia Forest Service, green - damage cases where wolves were recorded, yellow - damage cases where dogs were recorded and red - damage cases where wolf-dog hybrid or immigrant was recorded.

6. RAZPRAVA

6.1 GENETSKA SLIKA SZ DINARSKE SUBPOPULACIJE VOLKA

Rezultati analize populacijskega ozkega grla sovpadajo z zgodovinskimi podatki o številčnem zmanjšanju populacije volka na območju Slovenije in Hrvaške. Kljub temu da je še konec osemdesetih let 20. stoletja na Hrvaškem živelo le 50 volkov, v letih 1990 in 1993 pa so v Gorskem Kotarju zabeležili le po eno volčje leglo (Štrbenac in sod., 2005) in da lahko iz dinamike odstrela volkov v Sloveniji sklepamo o podobni sliki, si je populacija po svojem številčnem minimumu s koncem devetdesetih let 20. stoletja opomogla (Adamič in sod., 1998) in ima danes razmeroma visoko genetsko pestrost. V tako majhnih populacijah se okrepi genetski zdrs in posledično poveča izguba redkih alelov. Garza Williamsonov indeks sicer kaže na izgubo 60 % alelov. Poleg številčnosti živali v populaciji v času zmanjšanja populacije pa je z vidika izgube alelov pomembno tudi trajanje ozkega grla (Frankham in sod., 2002). Razsežnosti populacijskega ozkega grla dinarske populacije je smiselno v prihodnje podrobneje raziskati z metodami, ki temeljijo na koalescenčnem modelu (npr. z MSVAR, DIYABC) in ki spremembe v demografski zgodovini zaznavajo bolj natančno kot metodi, ki smo ju uporabili v naši študiji (Girod in sod., 2011), kar pa presega okvirje te doktorske naloge.

Poleg testov preživetja populacijskega ozkega grla, bi kot posledico majhne efektivne velikosti populacije v preteklih generacijah, zaradi močnega povezovanja lokusov ali parjenja v sokrvju, lahko videli tudi visoko stopnjo vezavnega neravnovesja lokusov (Allendorf in Luikart, 2007). Iz naših rezultatov, kjer smo za SZ dinarsko subpopulacijo analizo najprej naredili za obdobje 2003 do 2013, v drugo pa smo vključili le volkove v časovnem obdobju pred intenzivnim spremljanjem populacije (2003-2009) sledi, da je del visoke stopnje vezavnega neravnovesja lokusov verjetno res posledica majhne efektivne velikosti populacije v prejšnjih generacijah, medtem ko je del neravnovesja verjetno posledica intenzivnega vzorčenja volčjih družin, tj. sorodnih osebkov, ki so v letih intenzivnega spremljanja populacije (2010-2013) živeli na območju Slovenije in Gorskega Kotarja. Visoka stopnja vezavnega neravnovesja lokusov je v tem primeru pričakovana.

Povprečni koeficient sokrvja posameznega osebka je po metodi TrioML ocenjen na 0,051, kar pomeni, da se v povprečju med seboj pariyo osebki, ki so si sorodni nekoliko manj kot bratranci in sestrične. Kot je bilo pričakovano, parjenje v sokrvju v preučevani subpopulaciji ni tako visoko kot pri populacijah, ki izhajajo iz dveh ali treh osebkov in so bile po preživetju ustanoviteljevega učinka še izolirane, kot to velja za populacijo v Skandinaviji (Liberg in sod., 2005) in na Isle Royale (Räikkönen in sod., 2009; Adams in sod., 2011). Glede na to, da obravnavana subpopulacija ni bila nikoli tako nizko številčna in da si je med več ozkimi grli tudi opomogla, hkrati pa ni ostala povsem izolirana (Fabbri in sod., 2014), dobljeni rezultat ni presenetljiv. Kljub temu pa rezultat nakazuje, da genetski pretok vzdolž dinarsko-balkanske populacije ni tako velik, da bi posledice populacijskih nihanj takoj zabrisal.

Ocena efektivne velikost populacije se za obdobje med 2008 in 2012 po naši oceni giblje nekje med 21 in 50 živalmi. Najbolj lahko verjamemo oceni za obdobje med letoma 2010 in 2012. Za to obdobje smo v vzorec zajeli veliko večino osebkov preučevane subpopulacije. Vseeno pa so bili tudi v tem obdobju volkovi v Gorskem Kotarju nekoliko slabše vzorčeni. Kot posledico neenakovrednega vzorčenja tropov smo efektivno velikost populacije lahko podcenili (Luikart in sod., 2010). Prav tako lahko pričakujemo, da smo oceno efektivne velikosti populacije v primeru tri- in štiriletnega drsečega časovnega okna in treh enoletnih časovnih populacij v letih 2010 do 2013 podcenili zaradi kršenja predpostavke diskretnih generacij (Robinson in Moyer, 2013).

Za volčje populacije je zaradi njihove socialne strukture, ki temelji na tropih, stopnja genetske pestrosti odvisna od njihovega sistema parjenja, ki ga določajo parjenje le vodilnih živali v tropu, mehanizmi izogibanja parjenja v sokrvju in razpoložljivost nesorodnih živali. Posledično je efektivna velikost populacije (N_e) veliko manjša od cenzusa populacije (N_c) (Frankham, 1995; Aspi in sod., 2006). Razmerje med N_e in N_c je predmet intenzivnih raziskav in je bilo v povprečju ocenjevano med 0,1 in 0,2 (Frankham, 1995; Palstra in Ruzzante, 2008), vendar pa so razlike med vrstami zelo velike. Poznavanje razmerja med N_e in N_c pomaga pri prepoznavanju in določitvi ekoloških dejavnikov, ki zmanjšujejo N_e pod N_c , njegovo razumevanje pa je lahko pomembno z vidika predvidevanja, kako lahko upravljalovski postopki povečajo N_e ali razmerje med N_e in N_c za

ohranjanje genetske variabilnosti. Poznavanje tega razmerja za vrsto je lahko pomembno z vidika sklepanja o N_e iz N_c ali obratno, ocenjevanje le enega od parametrov in izpeljava drugega pa lahko predstavlja prihranek časa in denarja (Luikart in sod., 2010). Za volčje populacije so ugotovljena razmerja drugod po Evropi med 0,2 in 0,4 (Aspi in sod., 2006; Von Holdt in sod., 2008; Hansen in Andersen, 2011). V primeru SZ dinarske subpopulacije bi lahko to naivno ocenili na okoli 0,5, vendar ne smemo pozabiti, da smo ocenjevali cenzus velikosti populacije samo v Sloveniji (Potočnik in sod., 2014), medtem ko dem, na katerega se ocena nanaša, obsega še (vsaj) celoten Gorski Kotar na Hrvaškem. Ne glede na napako pri oceni efektivne velikosti populacije pa je le-ta še vedno majhna, tako da lahko kljub temu sklepamo, da so volkovi v SZ Dinaridih do neke mere ločeni od ostale dinarsko-balkanske populacije in da lahko v tej subpopulaciji pričakujemo rast sokrvja in padec genetske pestrosti sorazmeren njeni efektivni velikosti.

6.2 PRIMERJAVA GENETSKE PESTROSTI VOLČJIH POPULACIJ V EVROPI

Razporeditev genetske pestrosti evropskih volkov, ki smo jo dobili z metodo umeritvene referenčne populacije, ustreza sliki, ki so jo drugi raziskovalci dobili v manjši študijah, kjer so populacije med seboj primerjali brez korekcije za različno število analiziranih markerjev ali velikost vzorca (Lucchini in sod., 2004; Aspi in sod., 2006; Sastre in sod., 2010; Moura in sod., 2013) oziroma so uporabili drug tip genetskih markerjev (Von Holdt in sod., 2011; Pilot in sod., 2014). Kljub temu, da so bile nekatere populacije povsem izolirane in majhne, nobena od populacij oziroma subpopulacij ne izstopa po veliko višji ali nižji pričakovani heterozigotnosti.

Sliko, ki bolj ustreza zgodovinskemu dogajanju v posameznih populacijah, bolje oriše razmerje alelne pestrosti (A_r). Kljub temu, da je pričakovana heterozigotnost med populacijami podobna, pa so razlike v alelni pestrosti precejšnje.

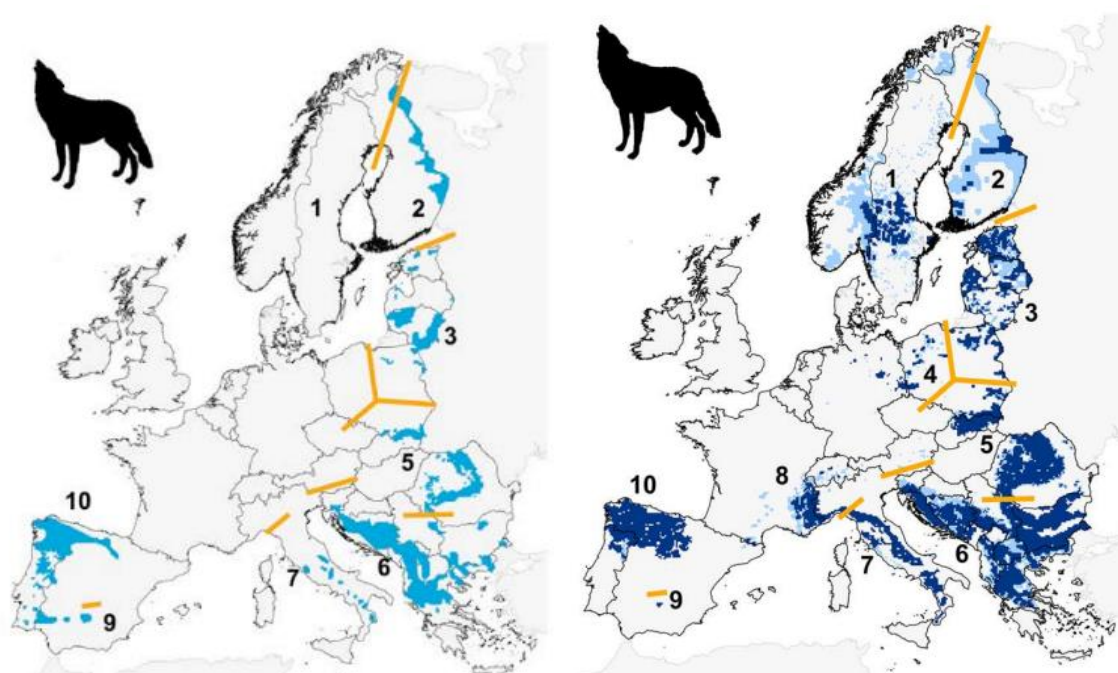
Najnižjo alelno pestrost ima skandinavska populacija, kar velja tako za obdobje pred lokalnim izumrtjem ($A_{r(1940-1980)} = 0,91$), kot obdobje ponovne naselitve ($A_{r(1991-2001)} = 0,69$). V obdobju med letoma 1960 in 1970 je v Skandinaviji populacija volka zaradi preganjanja in iztrebljanja izginila, leta 1982 pa je populacijo na novo osnoval par volkov

finsko-ruskega izvora, ki se mu je leta 1991 priključil še en volk s tega območja (Flagstad in sod., 2003; Vilà in sod., 2003a). Kljub temu, da je v populaciji močno izraženo parjenje v sokrvju (Räikkönen in sod., 2013), pri čemer velikost povprečnega koeficienta sokrvja ustreza parjenju med brati in sestrami ($F = 0,25$) (Bensch in sod., 2006), se je populacija tako številčno kot prostorsko razširila na približno 260–330 volkov (Kaczensky in sod., 2012b). Ne glede na visoko stopnjo parjenja v sokrvju, ki je posledica učinka ustanovitelja, ima skandinavska populacija vseeno nekoliko večjo pričakovano heterozigotnost kot drugi dve izolirani populaciji, apeninska in iberska. Med zadnjimi zgodovinskimi znižanji številčnosti populacij (konec 20. stoletja) nobena od njih ni bila zmanjšana na tako majhno številčnost kakor skandinavska populacija (Fabbri in sod., 2007; Sastre in sod., 2010) (v apeninski se je ohranilo okoli 100, v iberski pa okoli 700 volkov). Posledično verjetno kažeta večjo alelno pestrost ($Ar_{(apeninska)} = 0,92$, $Ar_{(iberska)} = 0,96$), medtem ko lahko nižjo pričakovano heterozigotnost razložimo z izolacijo populacij v času ledenih dob (Lucchini in sod., 2004; Von Holdt in sod., 2011, Montana in sod., 2016). Tudi z nedavno raziskavo preživetja populacijskih ozkih grl za evropske populacije volka, ki so jo Pilot in sod. (2014) naredili na ravni primerjave genomskih podatkov (uporabili so SNP = enonukleotidne polimorfizme), so potrdili, da gre v primeru teh dveh populacij za preživetje dolgotrajnega populacijskega ozkega grla. Na to kažejo nizka genetska pestrost, visoko vezavno neravnovesje, glavni pokazatelj tovrstnega ozkega grla pa je majhno število avtozigotnih segmentov v genomu.

Čeprav so baltske in finsko-karelijska (sub)populacije ter populacija v Beloveškem gozdu preživele več populacijskih ozkih grl, jim je povezava z večjimi populacijami v Rusiji, Ukrajini in Belorusiji omogočila, da so ohranile razmeroma visoko genetsko pestrost, ki se odraža v obeh parametrih (Her in Ar) (Flagstad in sod., 2003; Jędrzejewski in sod., 2005; Aspi in sod., 2006; Aspi in sod., 2009; Jansson in sod., 2014). Populacije v Dinaridih, na Poljskem in v Bolgariji imajo razmeroma visok indeks alelne pestrosti, kar lahko razlagamo z genetsko strukturo, ki so jo opazili avtorji v študijah uporabljenih za našo primerjavo (gledamo več subpopulacij, ki imajo manjše število, a različne alele) (Czarnomska in sod., 2013; Moura in sod., 2013; Fabbri in sod., 2014). V vseh omenjenih populacijah se je v preteklosti volkove lovilo oziroma se v populacije še vedno posega. Učinki dolgotrajne izpostavljenosti antropogenim pritiskom imajo lahko vpliv na strukturo

tropov, izbiro partnerjev (več parjenja v sokrvju), krajše disperzijske razdalje in posledično fiksacijo alelov, ki so značilni za posamezne trope, kar ima za posledico genetsko diferenciacijo (Jędrzejewski in sod., 2005; Hindrikson in sod., 2013; Jansson in sod., 2014).

Za več populacij smo opazili, da je pričakovana heterozigotnost višja od opažene, kar je lahko posledica Wahlundovega učinka zaradi strukture populacije, ali pa gre za nedavni oziroma sedanji pretok genov med različnimi (sub)populacijami. Volkovi so sicer sposobni dolgih migracij, vendar pa je verjetnost prenosa genov v stabilno populacijo zaradi velike smrtnosti mladih migrantov na zanje novih območjih, na potencialno že zasedenih teritorijih zaradi interakcije z drugimi volkovi in zaradi človekovega poseganja v populacije, majhna. Večinoma so odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja večja pri populacijah, ki so geografsko gledano bližje kakšni drugi populaciji, kot pri izoliranih populacijah. Naši rezultati kažejo, da med (sub)populacijami, ki so bile v preteklosti izolirane, poteka precejšen pretok genov, ki bo verjetno dolgoročno zabrisal trenutne razlike. Čeprav nekateri avtorji predvidevajo, da so opažene razlike lahko posledica selekcije (Pilot in sod., 2006; Czarnomska in sod., 2013; Moura in sod., 2013; Stronen in sod., 2013; Fabbri in sod., 2014), se zdi to malo verjetno. Velika večina populacij je namreč imela (oziroma še vedno ima) majhno efektivno velikost, kar pomeni, da ima genetski zdrs veliko večji učinek kot selekcija, ki bi lahko povzročila evlucijske adaptivne spremembe. Iz tega lahko sklepamo, da razlike med (sub)populacijami najverjetneje niso pomembna raznolikost, ki bi jo bilo treba varovati, ampak so posledica vpliva človeka. Te razlike bodo s časom v primeru nadaljnjega okrevanja evropskih populacij izgubile. Takšnemu procesu smo priča v Italiji (Fabbri in sod., 2014) in v Dinaridih (Fabbri in sod., 2014; Jelenčič in sod., v pripravi), vendar pa naši rezultati kažejo na to, da gre za širši fenomen, ki je povezan s trenutnim prostorskim širjenjem populacij volka v Evropi, ki ga opisujejo Chapron in sod. (2014) (slika 20).



Slika 20: Območja razširjenosti volka v obdobju med 1950 in 1970 (levo) in leta 2011 (desno). Vir: (Chapron in sod., 2014).

Figure 20: Distribution of wolf populations in Europe between 1950 and 1970 (left) and in 2011 (right). (Chapron et al., 2014)

6.3 KRIŽANJE MED VOLKOM IN PSOM

Križancev prve ali druge generacije v naši študiji v Sloveniji nismo zaznali. Smo pa zaznali tri osebke, ki glede na naše rezultate kažejo znake povratnih križancev, lahko pa bi šlo tudi za migrante iz druge populacije oziroma povratne križance, ki izhajajo iz Dalmacije. Glede na analize sorodnosti, ki so bile narejene v sklopu projekta SloWolf, nobeden od teh treh potencialnih križancev ne izhaja iz SZ dinarske subpopulacije, saj med vzorčenimi volkovi nismo prepoznali nobenega od njihovih staršev ali bratov in sester. Tudi sicer smo »samca 774« (EE.14Y0) zasledili na škodnem primeru, ki se je zgodil na območju, ki ni del nobenega od vzpostavljenih teritorijev. Truplo ene samice (AP.08C2) je bilo najdeno na teritoriju nanoško-vremškega tropa. To žival so najverjetneje ubili teritorialni volkovi tega tropa, saj so bile vzrok za njen pogin številne ugrizne rane. Verjetno je torej šlo za mlajšo samico v disperziji. Druga samica (AP.086J) pa je bila odstreljena na območju tropa suha krajina, kjer pa v tistem obdobju nismo beležili prisotnosti volkov, teritorij je bil torej prazen in lahko da bi se ta samica tam ustalila. Če k

temu dodamo še odsotnost F1 križancev, ki jih v Sloveniji nismo zaznali kljub izjemno intenzivnemu vzorčenju, lahko sklepamo, da te živali izvirajo od drugod.

Za volkove s Hrvaške rezultatov analize starševstva nimamo, hkrati pa tudi nimamo tako dobrega vpogleda v dogajanje v posameznih tropih, saj kljub temu, da imajo kolegi s Hrvaške vzpostavljeno stalno spremljanje populacije volka (Štrbenac in sod., 2005), le-to ne poteka tako intenzivno (vsaj ne z genetskimi metodami), kot smo ga med leti 2010 in 2013 imeli pri nas. Tako za štiri potencialne povratne križance z območja Like (CH.0LM3, AP.08A4 in AP.0884) in južno od Zagreba (AP.087J) ne moremo preveriti natančnejšega dogajanja in genetskih rezultatov podpreti s podatki s terena. Vsi trije potencialni povratni križanci iz Like so bili dobljeni v njenem južnejšem delu, dva od tega čisto na meji z Dalmacijo. Na območju Gorskega Kotarja križancev enako kot v Sloveniji nismo zaznali.

Medtem pa genetska slika volkov v Dalmaciji kaže, da ima razmeroma visok delež vzorčenih volkov pasje gene (30,9 %), le dva osebka (2,4 %) pa bi lahko bila križanca prve ali druge generacije, vendar tudi v njunem primeru ta določitev ni zanesljiva. Tudi Randi in sod. (2014) ugotavljajo, da je v apeninski populaciji frekvenca osebkov, ki imajo pasje gene oziroma povratnih križancev, veliko večja (87,5 %) od frekvence pojavljanja križancev prve in druge generacije (12,5 %). Predvidevajo, da se je križanje dogajalo nekaj generacij nazaj, verjetno v zgodnjih fazah rasti in širitve populacije, ko se je populacija od osemdesetih let 20. stoletja iz osrednjega dela Apeninov širila v severne in južne Apenine. Glede na teoretična pričakovanja in znanstvena opažanja se verjetnost križanja povečuje na robnem delu volčjih populacij v bližini človeških naselbin, kjer je populacijska gostota volkov manjša, psov, ki se prosto gibljejo v okolici, pa večja. To povečuje možnost parjenja psov z mladimi volkovi v procesu disperzije. Ko se volčja populacija v prostoru širi, gotovo doseže bolj poseljena območja z več infrastrukturo, kmetijskih zemljišč in človekove aktivnosti, kar posledično lahko vpliva na večjo stopnjo smrtnosti v prometu in lahko tudi na nezakonito ubijanje volkov. Posledično lahko velik generacijski obrat v tropih prispeva k večji frekvenci križanja. Te ugotovitve kažejo i) da so populacije, ki se širijo, lahko v primerjavi s stabilnimi populacijami izpostavljene večjemu pritisku križanja ii) in da se dinamika križanja in vključevanje pasjih genov v času spreminja, pri čemer je v

zgodnjih fazah širitve populacije mogoče pričakovati največjo stopnjo križanja, ki ji sledi širitev križancev in nato več generacij povratnih križancev (Randi in sod., 2014).

Podobno lahko razložimo tudi sliko, ki jo vidimo v dinarski populaciji. Z območja severo zahodnih Dinaridov (Kočevska, Notranjska, Gorski Kotar in Lika) za razliko od Dalmacije volkovi kljub preganjanju in iztrebljanju tudi v osemdesetih letih 20. stoletja niso izginili. V Dalmacijo so se začeli vračati v devetdesetih letih 20. stoletja. Med vojno (1991–1995) so bile na hrvaškem podeželju številne kmetije uničene, kar je imelo za posledico tudi prosto gibanje živine in drugih domačih živali. To je vodilo v povečanje števila potepuških psov, ki so privzeli vzorce prostoživečih živali, niso pa imeli strahu pred človekom (Štrbenac in sod., 2005). Potepuškim psom tople klimatske razmere in obilica psom dostopne hrane (manjša divjad, nevarovana drobnica, smetišča, klavniški odpadki) nudita ugodnejše razmere za preživetje (Boitani in Ciucci, 1995). V Dalmaciji je bilo zabeleženih nekaj opažanj napadov tropov potepuških psov na drobnico, medtem ko je bil v Liki zabeležen en tak dogodek, v Gorskem Kotarju pa teh primerov niso zaznali (Štrbenac in sod., 2005). Največ težav s potepuški psi je na območju Dalmatinskega Zagorja. Podatkov o številu potepuških psov ni, hkrati pa ni tudi ukrepov, ki bi zmanjševali številčnost in odpravljali težave s temi psi (Štrbenac in sod., 2005; Štrbenac in sod., 2010).

V Dalmaciji se tudi volkovi v glavnem prehranjujejo s hrano antropogenega izvora (drobnica, smeti, klavniški odpadki), saj je na tem območju naravnega plena manj (Bath in Majić, 2001; Kusak, 2002). Tako so bili volkovi zaradi plenjenja drobnice v lokalnem okolju slabo sprejeti (Bath in Majić, 2001). To je posledično vodilo v ubijanje volkov, kadar koli je bilo to mogoče (Huber in sod., 2002). Robni del populacije, večja antropogena smrtnost in posledični hitrejši generacijski obrat v tropih, v kombinaciji z več potepuški psi v okolici, so verjetni razlogi, ki jih za večjo verjetnost križanja navajajo tudi drugi avtorji (Wayne in Vilà, 2003; Linnell in sod., 2008; Godinho in sod., 2011; Randi in sod., 2014). Med vzorčenimi volkovi v Dalmaciji smo zaznali le dva potencialna križanca prve oziroma druge generacije, kar pomeni, da je do križanja verjetno pogosteje prihajalo v samih začetkih širjenja populacije. Če kot generacijski čas zopet vzamemo tri leta (enako kot pri ocenjevanju N_e), se je od začetka širitve populacije zamenjalo približno 10-12 generacij. Z našim naborom markerjev smo zanesljivo lahko ločili le pse, volkove

ter križance *F1* in *F2* generacije (ena skupina) ter povratne križance, za katere pa ne moremo natančneje določiti koliko generacij nazaj je dejansko prišlo do križanja. Glede na večje zaznano število povratnih križancev predvidevamo, da je bilo križanja med volkovi in psi več v začetnih fazah širjenja populacije.

Godinho in sod. (2015) v svojem nedavnem članku pravijo, da bi bilo z vidika spremljanja pojavljanja in širjenja križancev primerno in smotno uporabljati tudi neinvazivne genetske vzorce. V Sloveniji in v Gorskem Kotarju smo v 1610 neinvazivnih genetskih vzorcih enega potencialnega križanca zaznali v dveh vzorcih sline na enem škodnem primeru. Tega samca smo zaznali samo v teh dveh vzorcih. Za obe samici (prav tako potencialna križanca) pa smo uspeli pridobiti le tkivna vzorca. Glede na to, da predvidevamo, da je šlo v vseh treh primerih za volkove v disperziji, to pomeni tudi, da je te živali nekoliko težje zaznati v naravi, saj svojih iztrebkov in urina ne uporabljajo za markiranje, kakor drugi teritorialni volkovi. Pri volkovih gre v tem primeru za problem heterogenosti ulovljivosti, kar je še posebej problematično pri ocenjevanju velikosti populacije (Marucco in sod., 2009; Cubaynes in sod., 2010). V naši študiji smo predpostavili, da z uporabo več različnih tipov neinvazivnih genetskih vzorcev zaznamo več različnih osebkov in imamo na ta način manj heterogenosti ulovljivosti, ki je posledica razlik v vedenju volkov do katerih prihaja zaradi hierarhične ureditve tropov in teritorialnosti. Sicer pa smo z našim multipleksom za individualno prepoznavanje z desetimi markerji križanca, ki smo ga ugotovili v vzorcu sline na škodnem primeru, brez težav prepoznali in vzorec dodatno amplificirali na skupno 34 lokusih, ki jih uporabljamo za ločevanje volkov in psov ter za analize sorodnosti. Potencialni problem predstavlja še nizka uspešnost genotipizacije neinvazivnih genetskih vzorcev, ki pa se ga lotevamo tako, da glede na pričakovano število osebkov zberemo precej večje število vzorcev (v praksi približno šestkrat). Na ta način poskušamo zagotoviti, da nam bo v 50 % delujočih vzorcev večino živali kljub vsemu uspelo »ujeti« več kot enkrat (stopnja ponovnega ulova v študiji ocenjevanja številčnosti je bila 4,5 (Skrbinšek in sod., neobjavljeno)). Kljub razmeroma nizki uspešnosti genotipizacije smo večino volkov, ki smo jih v Sloveniji zaznali tekom intenzivnega genetskega spremljanja populacije volka, »ujeli« več kot enkrat, kar pomeni, da smo z vzorci zajeli večji del volkov in tudi križancev, ki so se v tistem času gibali na območju stalne prisotnosti volka v Sloveniji. Na podlagi tega lahko sklepamo, da so v našem primeru metode, ki jih

uporabljamo za spremljanje populacije, povsem uporabne tudi za namene zgodnjega odkrivanja križanja med volkom in psom.

6.4 ŠKODE NA DROBNICI NA OBMOČJU RAZŠIRJENOSTI VOLKOV

Rezultati naše raziskave so pokazali, da na območju razširjenosti volka v Sloveniji večino škod povzročijo volkovi. Pričakovali smo večji »prispevek« psov, kar izhaja iz izkušenj z drugih koncev Slovenije, kjer vemo, da volkov ni in so za škode na divjadi (npr. na srnjadi) odgovorni psi (Upravljavski načrti posameznih lovsko upravljaljskih območij npr.: (Zavod za gozdove Slovenije, 2013; Zavod za gozdove Slovenije, 2015)) ter izkušenj z drugih koncev sveta (Bergman in sod., 2009; Echegaray in Vilà, 2010; Young in sod., 2011; Lescureux in Linnell, 2014).

Na splošno so na ZGS več škod zabeležili na Primorskem, kar potrjuje tudi analiza prehrane, ki temelji na pregledu volčjih iztrebkov. Ta je pokazala, da drobnica na Primorskem predstavlja okrog 20 % biomase plena, medtem ko na Kočevskem in Notranjskem predstavlja le 4 % oziroma 2 % (Potočnik in sod., 2014). Enako smo več škod, ki so jih povzročili psi, zaznali na Primorskem. Glede na to, da je število takšnih škodnih primerov tako majhno, pa težko govorimo o kakršni koli časovni ali prostorski dinamiki njihovega pojavljanja. Na nobenem od primerov nismo zaznali več kot enega psa, torej nismo zaznali, da bi škode povzročali psi, ki bi se združevali v skupine. Dejstvo pa je, da smo imeli samo v šestih škodnih primerih, kjer smo zabeležili škodo po psih, analiziran več kot en vzorec. Smo pa v teh primerih istega psa zaznali v več vzorcih z ene škode.

Dejanska številčnost prostoživečih oziroma potepuških psov v Sloveniji, enako kot velja za druge dele Evrope oziroma sveta, ni znana. Pogosto sicer obstajajo ocene, vendar pa za Slovenijo tudi teh nimamo. Znano je, da že v času Jugoslavije na območju Slovenije, za razliko od drugih bivših jugoslovanskih republik, potepuških psov ni bilo veliko. Kaj točno je razlog za to je prepuščeno spekulacijam (Tasker, 2007). V preteklosti se je pse, ki so se brez nadzora lastnikov gibali po javnih površinah, predvsem z namenom preprečevanja širjenja stekline in zmanjševanja vznemirjanja prostoživečih živali, lahko odstrelilo. Od spremembe Etičnega kodeksa lovcev (1998, 18. člen) in Zakona o zaščiti živali (Ur. l. RS,

št. 98/1999, 15. člen) dalje pa je to prepovedano. Glede na dobro urejeno zakonodajo s področja zaščite živali (Zakon o zaščiti živali, Št. 510-05/13-3/2, Ur. l. RS, št. 38/2013), ki določa vodenje centralnega registra psov, odgovornost lastnikov psov na področju veterinarske oskrbe in spuščanja psov, določa postopke ravnanja v primerih izgubljenih oziroma najdenih psov ter odgovornost občin in delovanja zatočišč za živali, je Sloveniji uspelo ohraniti nizko številnost potepuških psov. Iz tega lahko sklepamo, da v Sloveniji najverjetneje škode povzročijo psi, ki se le v določenem krajšem času na javnih površinah gibajo brez nadzora svojega lastnika oziroma so to lahko tudi delovni psi (npr. varuhi črede), ki so razvili neželjeno vedenje.

Poleg določitve vrste, ki je povzročila škodo, smo tekom intenzivnega spremljanja populacije volka v Sloveniji med nekaj več kot 450 analiziranimi vzorci slin s škodnih primerov, zaznali 25 % volkov, ki so v tem času živeli na območju Slovenije. Alfa samec iz tropa nanos-vremščica je po številu škodnih primerov, ki jih je povzročil, kot edini močno izstopal. Ostali trije zaznani alfa samci pa so bili zaznani na le nekaj posameznih škodnih primerih. Enako velja npr. za alfa samice. Zaradi kompleksnosti podatkov, biologije vrste in predvsem majhnega vzorca volkov zaznanih na škodnih primerih trenutno težko govorimo o problematičnih osebkih ali tropih, ki bi se specializirali za plenjenje pašnih živali. Potencialno bi kot takega lahko opredelili alfa samca iz tropa nanos-vremščica. Poleg tega na pojavljanje škod po volkovih v Sloveniji v veliki meri vpliva razpoložljivost različnih vrst naravnega plena (Potočnik in sod., 2014), zaščita in velikost pašnikov ter velikost črede (Černe in sod., 2010). Da bi poiskali vzorce pojavljanja škod po volkovih, bi potrebovali večji vzorec, najbolj smiselno pa bi se bilo tovrstnih analiz lotiti s statističnim modeliranjem, kar bi nam omogočilo vključitev različnih predpostavk in ugotoviti njihov prispevek k pojavljanju škod po volkovih.

Vzorci slin, odvzeti s kadavrov pašnih živali na škodnih primerih, so se izkazali za približno enako zahteven genetski material kot volčji iztrebki ali urin. Poleg 50 % uspešnosti pri genotipizaciji pa smo v primeru slin med delujočimi vzorci dobili še mešane vzorce z DNA različnih osebkov ali vrst, kar dodatno znižuje uspešnost določitve povzročitelja škodnega primera. Razen študije Mumme in sod. (2014), ki obravnava večje število tovrstnih vzorcev z namenom preučevanja odnosov med plenilcem in plenom, so v

drugih objavljenih študijah vpeljevali metodologijo odvzema vzorcev in preverjali, ali je s kadavrov uplenjenih živali sploh mogoče pridobiti dovolj DNA za analize (Williams in sod., 2003; Blejwas in sod., 2006; Sundqvist in sod., 2007; Caniglia in sod., 2013). V naši študiji smo se eni prvih v svetovnem merilu ukvarjali z določitvijo povzročiteljev škodnih primerov na velikem vzorcu. Kljub nekoliko nižji uspešnosti določitve povzročitelja ocenjujemo metodo kot sprejemljivo in primerno tako za prepoznavanje vrste, ki je škodo povzročila, kot za prepoznavanje posameznih volkov, ki škodo povzročijo ali pa se na kadavrih le prehranjujejo. Metoda je tako uporabna tudi z vidika spremljanja populacije volka in prepoznavanja posameznih osebkov oziroma tropov, ki povzročajo škode. Če bi želeli pridobiti vpogled tudi v plenilske in prehranjevalne navade v tropih (npr. ali večino ovac pokončata alfa živali, mladiči pa se nato samo najedo), bi morali vzorce slin zbirati z več kadavrov pašnih živali na posamezni škodi in tudi z njihovih drugih telesnih delov, kar bi sicer lahko povečalo delež mešanih vzorcev. Taki podatki bi lahko predstavljali pomembno osnovo za načrtovanje ukrepov, tako posegov v populacijo volka kot varovanja domačih živali.

Metode, ki vedno bolj prihajajo v uporabo tudi v varstveni biologiji (naslednja generacija sekvenciranja), bi uspešnost genotipizacije lahko povečale na okoli 70 odstotkov (De Barba, 2016, ustno). Boljše rezultate pričakujemo predvsem na račun še krajših mikrosatelitnih markerjev, ki se uporabljajo pri delu z neinvazivnimi genetskimi vzorci in na podlagi tega, da s temi metodami dejansko neposredno preberemo sekvenco DNA. S trenutno uporabljeno metodo se nam je lahko šibek signal skrivil v šumu, ki je v primeru vzorcev slin še posebej problematičen. Ta problem bi moral pri prehodu na novo tehnologijo izginiti.

6.5 VARSTVENI VIDIKI NAŠIH UGOTOVITEV

Škode, ki jih volkovi povzročijo na drobnici predstavljajo največjo grožnjo dolgoročnemu ohranjanju volka v Sloveniji (Akcijski načrt za trajnostno upravljanje populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji 2013 – 2017, 2013), zato moramo tej problematiki posvečati posebno pozornost. V Sloveniji smo tekom projekta SloWolf vzpostavili protokol za prepoznavanje povzročitelja škodnih primerov na podlagi DNA analize. Kljub nekoliko

slabši uspešnosti genotipizacije forenzičnih vzorcev sline, je DNA analiza zanesljiva metoda za ugotavljanje povzročitelja škode in lahko v primerih, ko se na terenu povzročitelja škode ne da zanesljivo določiti, predstavlja podlago za odločitev o izplačilu odškodnine. Naši rezultati kažejo, da na območju življenjskega prostora volka večino škod dejansko povzročijo volkovi. Poleg izplačevanja odškodnin je bil odstrel volkov do nedavnega edina metoda blaženja konflikta med volkom in človekom. Ker pa je lahko odstrel neučinkovita metoda za zmanjšanje škode na drobnici (Wielgus in Peebles, 2014; Imbert in sod., 2016; Fernández-Gil in sod., 2016), je še pomembneje pozornost posvečati varovanju pašnih živali z učinkovitimi sistemi za preprečevanje napadov zveri, kot so na primer uporaba visokih elektromrež, nočnih varnih ograd in pastirskih psov (Akcijski načrt za trajnostno upravljanje populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji 2013 – 2017, 2013).

Raziskava kot ena prvih temelječih na velikem vzorcu škodnih primerov pomembno prispeva k poznavanju razsežnosti škode, ki jo na območjih prisotnosti volka povzročajo psi. Ker potepuški psi v Sloveniji na območjih prisotnosti volka v tem primeru ne predstavljajo velike grožnje, bi lahko Slovenija predstavljala primer dobre prakse kontrole pojavljanja potepuških psov oziroma njihovega plenjenja domačih živali. Dobro bi bilo nadaljevati z ugotavljanjem povzročiteljev škodnih primerov in spremljati trend pojavljanja tako volkov kot psov na škodah. To daje možnosti za sprejemanje ustreznih ukrepov na območjih morebitnega pojavljanja pogostejših napadov potepuških psov in izboljšanja varovanja pašnih živali, še posebej na območju ponavljajočih se škod in na območjih, kjer se volkovi pojavijo na novo. Hkrati lahko tako zbrani vzorci predstavljajo pomemben del genetskih vzorcev za monitoring populacije volka, ki ga je država glede na mednarodno (Bernska konvencija, Direktiva o ohranjanju naravnih habitatov ter prostoživečih živalskih in rastlinskih vrst, CITES) in državno (Uredba o zavarovanju ogroženih živalskih vrst, Rdeči seznam) zakonodajo dolžna izvajati.

Kljub zahtevnosti prepoznavanja križancev zaradi velike sorodnosti volka in psa smo le-te z velikim naborom mikrosatelitnih lokusov uspešno prepoznavali. Glede na to, da križanja med tema vrstama v Sloveniji in v Gorskem Kotarju nismo zaznali, vključevanje pasjih genov v volčjo populacijo za zdaj na tem območju ni kritično in ne predstavlja grožnje za izgubo adaptivnih lastnosti pridobljenih tekom evolucije ter vključevanje genetskih

lastnosti psov, ki so jih selekcionirali ljudje in bi lahko vplivale na morfologijo, vedenje in ekologijo volkov. Ob dovolj intenzivnem monitoringu in z razvito metodologijo za ugotavljanje križancev imamo orodje za njihovo zgodnje odkrivanje in možnost za čimprejšnje ukrepanje.

Vprašanje pa je kako postopati glede problematike križancev v Dalmaciji, kjer smo odkrili večje število povratnih križancev. Razen Washingtonske konvencije (CITES), kjer imajo križanci enak status kot prostoživeče živali, nobena mednarodna zakonodaja ne določa varstvenega statusa križancev. Tako se na področju upravljanja oziroma ravnanja s križanci odpirajo številna vprašanja: od tega kolikšna stopnja vključenosti pasjih genov v volčjo populacijo je še sprejemljiva, do povsem tehničnih in etičnih vprašanj o primernosti različnih intervencijskih metod upravljanja s križanci (npr. odstrel križancev na Norveškem leta 2004; odvzem iz narave in nato življenje v ujetništvu npr. v Latviji leta 2000, v Nemčiji leta 2003 in v Italiji leta 2013) (Lescureux in Linnell, 2014). Živali z območja Dalmacije, ki smo jih prepoznali kot potencialne F1 oziroma F2 križance in povratne križance, so osebk, ki so na tem območju poginili tekom daljšega časovnega obdobja (2003-2013). Da bi videli koliko križancev živi v tem prostoru hkrati v krajšem časovnem obdobju, bi bilo smotrno vpeljati genetski monitoring, temelječ na neinvazivnih genetskih vzorcih. Poznavanje aktualnega stanja bi dalo boljši vpogled v problematiko križanja na tem območju.

Slika genetske pestrosti volkov v severozahodnih Dinaridih odseva demografsko zgodovino populacije. Genetska pestrost je primerljiva z drugimi evropskimi volčjimi populacijami, katerim je skupna zgodovina preganjanja in iztrebljanja ter nedavnega okrevanja (Chapron in sod., 2014). Čeprav zgleda, da so genetske razlike med evropskimi populacijami precejšnje in se celo na krajših razdaljah kaže genetska struktura, te razlike niso značilnost, ki bi jo bilo treba varovati, pač pa se bodo v procesu nadaljnega okrevanja in širjenja populacij, ki trenutno poteka v Evropi (Chapron in sod., 2014), verjetno izgubile.

Za zdaj z vidika ugotovljene nizke stopnje koeficienta sokrvja tveganje za depresijo zaradi parjenja v sokrvju pri naših volkovih ni zaskrbljujoče. Prav tako pri 38 živalih, ki so bile v

letih od 2010 do 2013 patoanatomsko pregledane, ni bilo ugotovljenih nobenih posebnosti, ki bi lahko kazale na kakršnekoli degenerativne spremembe (Potočnik in sod., 2012; Potočnik in sod., 2014), kot so bile ugotovljene pri skandinavskih volkovih (Liberg in sod., 2005) in volkovih z Isle Royale (Räikkönen in sod., 2009; Adams in sod., 2011) in bi lahko bile posledica parjenja v sokrvju. Kljub vsemu pa je tako ocenjena velikost SZ dinarske populacije (Potočnik in sod., 2014) kot njena ocenjena efektivna velikost majhna in sam po sebi ta del populacije, izoliran od preostalega dela dinarsko-balkanske populacije, dolgoročno ne more preživeti. Posledično je treba za volkove na tem območju zagotavljati trajnostno upravljanje in povezljivost s preostalim delom dinarske populacije, kar je opredeljeno tudi v Strategiji ohranjanja in trajnostnega upravljanja z volkom (*Canis lupus*) v Sloveniji (Strategija ..., 2009).

Kljub temu, da je verjetnost izumrtja populacij tri do osemkrat večja od verjetnosti izumrtja za vrste (Garner in sod., 2005), večji del varstva narave, vključno z Direktivo o habitatih, ki predstavlja temelj evropske naravovarstvene politike, arhaično temelji na ravni varstva vrste. Po drugi strani pa se varstvo narave v Evropi pogosto izvaja na ravni administrativnih enot – držav ali celo provinc – kar predstavlja dodatno oviro pri varovanju in upravljanju populacij in vrst. Za boljše varovanje volka in obnovitev genetske pestrosti volčjih (sub)populacij je pomembno povečati in ohranjati genski pretok med njimi, kar pomeni, da bi se morala varstvo in upravljanje odvijati na ravni populacij (Linnell in sod., 2008). Ta proces bi moral biti strokovno podprt, kar pomeni, da bi morale tudi raziskave potekati ne le na nacionalni ravni pač pa širše, na ravni biogeografskih regij ali celo na ravni kontinentov. Le tako širok pristop lahko tako mobilnim in pogosto kontroverznim vrstam kot je volk, omogoči dolgoročno preživetje v sodobni gosto poseljeni Evropi.

7. SKLEPI

V doktorskem delu smo z metodami molekularne genetike proučevali SZ dinarsko populacijo volka. Pri svojem delu smo uporabili tkivne in neinvazivne genetske vzorce volkov, ki so bili zbrani od leta 2003 do 2013. Ukvarjali smo se z genetsko pestrostjo populacije, s križanjem volkov in psov pri nas in se lotili forenzične raziskave škodnih primerov na domačih živalih, ki jih predvidoma povzročijo volkovi.

Rezultati analiz 34 mikrosatelitnih genetskih markerjev kažejo, da je genetska pestrost SZ dinarske populacije volka primerljiva s pestrostjo drugih evropskih volčjih populacij. Naši rezultati primerjave po metodi umeritvene referenčne populacije se skladajo s sliko, ki so jo opisali tudi drugi raziskovalci. Sliko, ki bolj ustreza zgodovinskemu dogajanju s posameznimi populacijami, bolje oriše razmerje alelne pestrosti (A_r). Kljub temu, da se zdijo genetske razlike med evropskimi populacijami ali celo subpopulacijami, ki so ugotovljene na krajših razdaljah, precejšnje, gre verjetno v večini primerov za posledico fragmentiranosti in izoliranosti populacij v preteklosti in izpostavljenosti delovanju genetskega zdrsa. Te razlike tako niso nekaj kar bi bilo treba varovati, ampak se bodo s trenutnim širjenjem populacij volka v Evropi verjetno izgubile, kar je zaželjen proces, ki bo dvigal genetsko pestrost v vsaki posamezni populaciji.

Rezultati analize populacijskega ozkega grla sovpadajo z zgodovinskimi podatki o številčnem zmanjšanju populacije volka na območju Slovenije in Hrvaške. Garza Williamsonov indeks kaže na izgubo 60 % alelov. Na majhno efektivno velikost populacije v preteklosti kaže tudi visoka stopnja vezavnega neravnovesja lokusov, ki pa je deloma gotovo tudi posledica intenzivnega vzorčenja volčjih družin v letih 2010-2013.

Parjenje poteka približno naključno (koeficient sokrvja $F_{is} = 0,01$), med seboj pa se pariyo volkovi, ki so si v povprečju sorodni nekoliko manj kot bratranci in sestrične (individualni koeficient sokrvja $F = 0,05$). Ocenjena efektivna velikost populacije je majhna ($N_e = 21,7-50,3$). Kljub temu, da parjenje v sokrvju in njegove možne posledice v SZ dinarski populaciji trenutno niso zaskrbljujoči, majhna ocenjena efektivna velikost populacije za

dolgoročno ohranitev populacije kaže na potrebo, da se ohranja in izboljšuje povezljivost te subpopulacije s preostalim delom dinarsko-balkanske populacije.

Z uporabljenim naborom mikrosatelitnih markerjev smo volkove uspešno ločevali od psov, lisic in šakalov ter prepoznavali križance med volkom in psom. Nenivazivni genetski vzorci, ki predstavljajo temelj spremljanju populacije, so kljub nižji uspešnosti pri genotipizaciji (cca. 50 %), primeren material za namene zgodnjega odkrivanja križancev. V Sloveniji križancev prve ali druge generacije nismo zaznali. Zaznali pa smo tri osebke, ki kažejo znake povratnega križanja volk-križanec. Te živali bi lahko bile tudi migranti iz druge populacije oziroma povratni križanci, ki izhajajo iz Dalmacije. Enako tudi v Gorskem Kotarju in Liki križancev praktično nismo zaznali, medtem ko je problem bolj izrazit v Dalmaciji, kjer smo kot potencialna križanca prve ali druge generacije prepoznali dva osebka in kot povratne križance 26 osebkov (30,9 %).

Z analizo vzorcev slin odvzetih s kadavrov pašnih živali na škodnih primerih smo kot eni prvih v svetu raziskali, ali škode, ki so pripisane volkovom, tudi dejansko povzročijo volkovi. Pri šestih odstotkih škodnih primerov z območja stalne prisotnosti volka v Sloveniji smo kot povzročitelja ugotovili psa. Poleg določitve vrste, ki je povzročila škodo, smo tekom intenzivnega spremljanja populacije volka v Sloveniji med nekaj več kot 450 analiziranimi vzorci slin s škodnih primerov, zaznali 25 % volkov, ki so v tem času živeli na območju Slovenije. Metoda je tako primerna tudi kot vir dodatnih vzorcev oz. podatkov za monitoring populacije.

Gre za prvo obsežno molekularno genetsko raziskavo volkov pri nas. Metode in protokoli ter pridobljeno znanje o »naših« volkovih so izhodišče in temelj za genetsko spremljanje populacije v prihodnje. Le-ta je v kombinaciji z drugimi metodami monitoringa osnova za varstvo in upravljanje volka pri nas. Pri tako mobilnih vrstah kot je volk pa je za njegovo dolgoročno ohranjanje ključno varstvo na ravni populacije in ne le na ravni posamezne države ter kliče po sodelovanju raziskovalcev in upravljavcev na širšem območju razširjenosti teh vrst.

8. POVZETEK

8.1 POVZETEK

Volkovi v Sloveniji in v Gorskem Kotarju predstavljajo severno zahodni del dinarsko-balkanske populacije, katere življenjski prostor se razteza naprej na območje Like in Dalmacije ter naprej proti Balkanu. Območje Slovenije predstavlja povezavo med Dinaridi in vzhodnimi Alpami, kar pomeni, da volkovi s tega dela lahko po naravni poti rekolonizirajo alpski prostor in se tam srečajo s populacijo volkov, ki se širi preko Apeninov vse do zahodnih Alp. Glede na to, da je dinarska populacija razdeljena v vsaj dve ali tri subpopulacije in da so volkovi pri nas robni del populacije, so še posebej občutljivi na stohastične dogodke. Z vidika varstva in upravljanja populacije je poznavanje demografskih in genetskih značilnosti populacij tako še posebej pomembno. Njihovo proučevanje in spremljanje nam omogočajo metode varstvene genetike, ki smo jih uporabili v pričujoči študiji, ki je prva obsežna genetska raziskava volkov pri nas.

Na osnovi 34 mikrosatelitnih lokusov smo ugotovili, da je genetska pestrost populacije razmeroma visoka in primerljiva s pestrostjo drugih evropskih volčjih populacij. Naši rezultati sovpadajo z zgodovinsko poznanim zmanjšanjem številčnosti populacije volka pri nas, ki je bilo posledica preganjanja in iztrebljanja volkov v 18., 19. in 20. stoletju. Glede na test Hardy-Weinbergovega ravnovesja je parjenje v SZ dinarski subpopulaciji približno naključno ($F_{is} = 0,01$), med seboj pa se pariyo volkovi, ki so si v povprečju sorodni nekoliko manj kot bratranci in sestrične ($F = 0,05$). Za zdaj z vidika ugotovljene nizke stopnje koeficienta sokrvja tveganje za depresijo zaradi parjenja v sokrvju ni zaskrbljujoče. Ocenjena efektivna velikost je majhna ($N_e = 21,7-50,3$), verjetno pa je nekoliko podcenjena, saj smo pri oceni kršili nekatere predpostavke uporabljene metode. Kljub temu ocenjena majhna efektivna velikost populacije v SZ Dinaridih poudarja potrebo po ohranjanju in izboljševanju povezljivosti te (sub)populacije s preostalim delom dinarsko-balkanske populacije, če želimo volkove pri nas in na Hrvaškem ohraniti v ugodnem varstvenem stanju.

Z uporabljenimi 34 mikrosatelitnimi lokusi smo uspešno razločevali volkove od psov in drugih predstavnikov iz družine psov, s katerimi si volkovi delijo svoj življenjski prostor

(šakal in lisica). Na območju Slovenije, Gorskega Kotarja in Like križanja med volkom in psom praktično ni zaznati in na tem območju za ohranjanje populacije volka ne predstavlja grožnje. Ta problem pa je bolj izrazit na območju Dalmacije, kjer smo zaznali 28 križancev (33,3 %). Dva osebka lahko potencialno uvrstimo v skupino prve (*F1*) oziroma druge (*F2*) generacije križancev, ki ju z našim setom markerjev med seboj sicer ni mogoče ločiti, v preostalih 26 primerih (30,9 %) pa gre za povratne križance z volkom. Križanje v Dalmaciji je verjetno posledica kombinacije več dejavnikov: več potepuških psov v okolju, ki jim ugodne razmere za preživetje v naravi omogoča mediteransko podnebje, dostopno je več hrane antropogenega izvora, idealne razmere za križanje med vojno v devetdesetih, ko je prišlo tudi do ponovne kolonizacije Dalmacije s to vrsto (tropi podivjalih psov in izpuščene druge domače živali, ko so ljudje v begu pred vojno zapustili območje), velika smrtnost zaradi preganjanja volkov, kot posledica škode, ki jo v Dalmaciji povzročajo volkovi lokalnemu prebivalstvu. Za boljši vpogled v problematiko križanja na tem območju bi bilo smiselno vpeljati monitoring s pomočjo metod molekularne genetike temelječ na neinvazivnih genetskih vzorcih.

Kot ena prvih študij v svetovnem merilu smo raziskali, ali vse škode, ki so pripisane volkovom, volkovi tudi dejansko povzročijo. Veliko večino škod na drobnici na območju stalne prisotnosti volka v Sloveniji povzročijo volkovi. V šestih odstotkih analiziranih primerov so škodo povzročili psi. Glede na majhno število škod, ki jih povzročijo psi, na podlagi naših podatkov težko govorimo o njihovi prostorski in časovni dinamiki. Na enem škodnem primeru smo zaznali potencialnega križanca (povratno križanje križanec - volk) oziroma migranta. Vzorci slin odvzete s kadavrov predstavljajo zahteven material in imajo nizko uspešnost genotipizacije. Glede na to, da potepuški psi v Sloveniji na območju prisotnosti volkov z vidika škod ne predstavljajo velike grožnje, bi lahko Slovenija predstavljala primer dobre prakse kontrole pojavljanja potepuških psov oziroma njihovega plenjenja domačih živali. Tudi v prihodnje bi bilo smiselno spremljati trende pojavljanja psov in volkov na škodah ter nato na podlagi tega izboljševati varovanje pašnih živali oziroma sprejemati druge potrebne ukrepe.

Metode, protokoli in pridobljeno znanje o »naših« volkovih so izhodišče in temelj za spremljanje populacije s pomočjo molekularno genetskih metod v prihodnje.

8.2 SUMMARY

Wolves in Slovenia and Gorski Kotar belong to the most north western part of the Dinaric-Balkan population that extends also over the area of Lika and Dalmatia and further to the south to the Balkan Peninsula. Slovenia represents the connection between the Dinaric-Balkan population and population originating from the Apennines that has recently recolonized Western Alps. Considering that Dinaric population is divided into two or even three subpopulations, and that wolves in Slovenia represent the edge of the population, they are more vulnerable to stochastic events. Thus knowledge, understanding and monitoring of demographic and genetic parameters is especially important from the conservation and management point of view. Modern conservation genetic methods used in this first comprehensive genetic study of wolves in Slovenia enabled us to study and gather the data about such parameters.

Based on 34 microsatellite genetic loci we have found that population genetic variability is comparable to diversity of other European grey wolf populations. Results of the population bottleneck test coincide with the historical data of reduction in population size due to persecution and extermination during the 18th, 19th and most of the 20th century. Considering that the population is in Hardy-Weinberg equilibrium, we can say that mating in the studied population is approximately random ($F_{is} = 0.01$). Inbreeding coefficient (F) was estimated at 0.05, meaning that the animals that mate are on average less related than full first cousins. Considering relatively low inbreeding coefficient, for now inbreeding depression does not seem to represent a serious threat for this subpopulation. Estimated effective population size is low ($N_e = 21.7-50.3$), but possibly underestimated due to violations of the assumptions of the LDNe method. In order to conserve this population in the long run, we should aim to preserve and improve its connectivity with the other part of the Dinaric-Balkan wolf population.

The panel of genetic markers we used enabled us to successfully distinguish wolves from dogs, foxes and jackals, and recognize hybrids between wolves and dogs. Hybridization appears to be more frequent in Dalmatia, while in Slovenia, Gorski Kotar and Lika only a few wolf-hybrid backcrosses were found, possibly originating from Dalmatia as no hybrids

of first or second generation were recorded in the other studied areas. In these other three areas hybridization between wolf and dog does not seem to represent a threat to wolf conservation. In Dalmatia where we found 28 hybrids (33.3 %) (two were possibly first or second generation hybrids but this result is inconclusive, and the other 26 (30,9 %) were backcrosses with wolf) hybridization seems a more serious threat. Reasons for hybridization in Dalmatia can be found in combination of different factors: there is more stray dogs present in the area as the mild Mediterranean climate offers them favorable conditions for survival, more anthropogenic food availability, ideal conditions for hybridization during the war in the 90s when wolves recolonized Dalmatia (packs of wild dogs and abandoned livestock in the area when the residents fled the war), high mortality due to illegal killing of wolves as they cause lots of damages on livestock that present a considerable financial burden to the local people. To better understand hybridization in Dalmatia, it would make sense to establish noninvasive genetic monitoring of the population in the area.

As one of the first large-scale studies in the world we looked at damage cases on livestock attributed to wolves. In the area of permanent wolf presence, saliva samples were collected from carcasses. We found that most of the damages were actually caused by wolves since only in six percent of such damage cases dogs were detected. Based on the low number of damages cases attributed to dogs we can not say much about their spatial and time dynamics. In one damage case we found that the culprit was a possible backcross hybrid or a migrant from another wolf population. Such saliva samples are demanding material and have low success rates in genotyping. As stray and free ranging dogs in Slovenia do not cause a lot of damages to livestock, we could use the management of stray dogs in Slovenia as a good practice example. Monitoring of damage cases is still recommended both to improve livestock protection, as well as to enable timely adopting of appropriate measures if a different trend appeared.

Methods, established protocols and the acquired understanding of »our« wolves provide a solid foundation for genetic monitoring of this wolf population in the future.

9. VIRI

9.1 CITIRANI VIRI

- Adamič M., Jerina K., Zafran J., Marinčič A. 2004. Izhodišča za oblikovanje strategije ohranitvenega upravljanja s populacijo volka (*Canis lupus*) v Sloveniji. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 36 str.
- Adamič M., Kobler A., Berce M. 1998. The return of the wolf (*Canis lupus*) into its historic range in Slovenia – is there any place left and how to reach it? Zbornik Gozdarstva in Lesarstva, 57: 235–254
- Adams J.R., Vucetich L.M., Hedrick P.W., Peterson R.O., Vucetich J.A. 2011. Genomic sweep and potential genetic rescue during limiting environmental conditions in an isolated wolf population. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 278, 1723: 3336–3344
- Adams J.R., Waits L.P. 2007. An efficient method for screening faecal DNA genotypes and detecting new individuals and hybrids in the red wolf (*Canis rufus*) experimental population area. Conservation Genetics, 8, 1: 123–131
- Akcijski načrt za trajnostno upravljanje populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji 2013 – 2017. 2013. Ljubljana, SloWolf: 67 str.
- Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. 2001. The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. Trends in Ecology and Evolution, 16, 11: 613–622
- Allendorf F.W., Luikart G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Malden, Blackwell Publishing: 642 str.
- Andersons Ž., Lucchini V., Randi E., Ozoliņš J. 2002. Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. Mammalian Biology, 67: 79–90
- Aspi J., Roininen E., Kiiskilä J., Ruokonen M., Kojola I., Bljudnik L., Danilov P., Heikkinen S., Pulliainen E. 2009. Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. Conservation Genetics, 10, 4: 815–826
- Aspi J., Roininen E., Ruokonen M., Kojola I., Vilà C. 2006. Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf

- population. *Molecular Ecology*, 15, 6: 1561–1576
- Bath A., Majić A. 2001. Human dimensions in wolf management in Croatia. Understanding attitudes and beliefs of residents in Gorski kotar, Lika and Dalmatia toward wolves and wolf management. Zagreb, Large carnivore initiative for Europe: 171 str.
http://www1.nina.no/lcie_new/pdf/635011364836702351_Bath%20LCIE%20Croatian%20attitudes.pdf (15. 8. 2016)
- Bellemain E., Taberlet P. 2004. Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Molecular Ecology Notes*, 4, 3: 519–522
- Bensch S., Andrén H., Hansson B., Pedersen H.C., Sand H., Sejberg D., Wabakken P., Akesson M., Liberg O. 2006. Selection for heterozygosity gives hope to a wild population of inbred wolves. *PloS One*, 1, 1: 1–7
- Bergman D.L., Breck S.W., Bender S.C. 2009. Dogs gone wild: Feral dog damage in the United States. V: Proceedings of the 13th WDM Conference, 2009, Lincoln, University of Nebraska. J. R. Boulanger (ed.). Lincoln, University of Nebraska: 117–183
http://digitalcommons.unl.edu/icwdm_usdanwrc/862 (15. 8. 2016)
- Blejwas K.M., Williams C.L., Shin G.T., McCullough D.R., Jaeger M.M. 2006. Salivary DNA Evidence Convicts Breeding Male Coyotes of Killing Sheep. *Wildlife Management*, 70: 1087–1093
- Boitani L. 2000. Action Plan for the conservation of the wolves (*Canis lupus*) in Europe. Nature and environment Vol. 113. Strasbourg, Council of Europe Publishing: 84 str.
- Boitani L. 2003. Wolf conservation and recovery. V: Wolves: Behaviour, Ecology, and Conservation. Mech L. D., Boitani L. (eds.). Chicago, The University of Chicago Press: 317–340
- Boitani L., Ciucci P. 1995. Comparative social ecology of feral dogs and wolves. *Ethology Ecology in Evolution*, 7: 49–72
- Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P., Pompanon F., Brochmann C., Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13, 11: 3261–3273
- Borg B.L., Brainerd S.M., Meier T.J., Prugh L.R. 2014. Impacts of breeder loss on social structure, reproduction and population growth in a social canid. *Journal of Animal*

- Ecology, 84, 1: 177–187
- Bouzat J.L. 2010. Conservation genetics of population bottlenecks: The role of chance, selection, and history. *Conservation Genetics*, 11, 2: 463–478
- Breen M., Jouquand S., Renier C., Mellersh C.S., Hitte C., Holmes N.G., Chéron A., Suter N., Vignaux F., Bristow A.E., Priat C., McCann E., André C., Boundy S., Gitsham P., Thomas R., Bridge W.L., Spriggs H.F., Ryder E.J., Curson A., Sampson J., Ostrander E.A., Binns M.M., Galibert F. 2001. Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Research*, 11, 10: 1784–1795
- Breitenmoser U. 1998. Large predators in the Alps: The fall and rise of man's competitors. *Biological Conservation*, 83, 3: 279–289
- Broquet T., Petit E. 2004. Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular Ecology*, 13, 11: 3601–3608
- Busch J.D., Waser P.M., DeWoody J.A. 2007. Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Molecular Ecology*, 16: 2450–2462
- Caniglia R., Fabbri E., Galaverni M., Milanesi P., Randi E. 2014. Noninvasive sampling and genetic variability, pack structure, and dynamics in an expanding wolf population. *Journal of Mammalogy*, 95, 1: 41–59
- Caniglia R., Fabbri E., Mastrogiuseppe L., Randi E. 2013. Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. *Forensic Science International: Genetics*, 7: 397–404
- Chapron G., Kaczensky P., Linnell J.D.C., von Arx M., Huber D., Andren H., Lopez-Bao J. V., Adamec M., Alvares F., Anders O., Balčiauskas L., Balys V., Bed P., Bego F., Blanco J. C., Breitenmoser U., Broseth H., Bufka L., Bunikyte R., Ciucci P., Dutsov A., Engleder T., Fuxjager C., Groff C., Holmala K., Hoxha B., Iliopoulos Y., Ionescu O., Jeremi J., Jerina K., Kluth G., Knauer F., Kojola I., Kos I., Krofel M., Kubala J., Kunovac S., Kusak J., Kutal M., Liberg O., Maji A., Mannil P., Manz R., Marboutin E., Marucco F., Melovski D., Mersini K., Mertzanis Y., Mys ajek R. W., Nowak S., Odden J., Ozolins J., Palomero G., Paunovi M., Persson J., Potočnik H., Quenette P.-Y., Rauer G., Reinhardt I., Rigg R., Ryser A., Salvatori V., Skrbinšek T., Stojanov A., Swenson J. E., Szemethy L., Trajce A., Tsingarska-Sedefcheva E., Vana M., Veeroja

- R., Wabakken P., Wolf M., Wolf S., Zimmermann F., Zlatanova D., Boitani L. 2014. Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science*, 346, 6216: 1517–1519
- Chybicki I.J., Burczyk J. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity*, 100, 1: 106–113
- Cornuet J.M., Luikart G. 1996. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics*, 144, 4: 2001–2014
- Crow J.F., Kimura M. 1970. An introduction to population genetics theory. New York, Harper in Row: 591 str.
- Cubaynes S., Pradel R., Choquet R., Duchamp C., Gaillard J.-M., Lebreton J.-D., Marboutin E., Miquel C., Reboulet A.-M., Poillot C., Taberlet P., Gimenez O. 2010. Importance of accounting for detection heterogeneity when estimating abundance: the case of French wolves. *Conservation Biology*, 24, 2: 621–626
- Czarnomska S.D., Jędrzejewska B., Borowik T., Niedziałkowska M., Stronen A. V., Nowak S., Mysłajek R.W., Okarma H., Konopiński M., Pilot M., Śmietana W., Caniglia R., Fabbri E., Randi E., Pertoldi C., Jędrzejewski W. 2013. Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics*, 14, 3: 573–588
- Černe R., Jerina K., Jonozovič M., Kavčič I., Stergar M., Marenče M., Potočnik H. 2010. Škode od volkov v Sloveniji. Analiza v okviru projekta Life in SloWolf Akcija A4. Ljubljana, SloWolf: 33 str.
- De Barba M. 2016. Naslednja generacija sekvenciranja v varstveni biologiji. Grenoble, Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) (osebni vir, 7. 5. 2016)
- De Groot G.A., Nowak C., Skrbinšek T., Andersen L.W., Aspi J., Fumagalli L., Godinho R., Harms V., Jansman H.A.H., Liberg O., Marucco F., Mysłajek R.W., Nowak S., Pilot M., Randi E., Reinhardt I., Śmietana W., Szewczyk M., Taberlet P., Vilà C., Muñoz-Fuentes V. 2016. Decades of population genetic research reveal the need for harmonization of molecular markers: the grey wolf *Canis lupus* as a case study. *Mammal Review*, 46, 1: 44–59
- Dent E.A., von Holdt B.M. 2012. Structure harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation*

- Genetics Resources, 4, 2: 359–361
- Di Rienzo A., Peterson A.C., Garza J.C., Valdes A.M., Slatkin M., Freimer N.B. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 3166–3170
- Dolf G., Schläpfer J., Gaillard C., Randi E., Lucchini V., Breitenmoser U., Stahlberger-Saitbekova N. 2000. Differentiation of the Italian wolf and the domestic dog based on microsatellite analysis. *Genetics, Selection, Evolution*, 32: 533–541
- Echegaray J., Vilà C. 2010. Noninvasive monitoring of wolves at the edge of their distribution and the cost of their conservation. *Animal Conservation*, 13, 2: 157–161
- ESRI. 2011. ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA, Environmental Systems Research Institute.
- Estes J.A., Terborgh J., Brashares J.S., Power M.E., Berger J., Bond W.J., Carpenter S.R., Essington T.E., Holt R.D., Jackson J.B.C., Marquis R.J., Oksanen L., Oksanen T., Paine R.T., Pickett E.K., Ripple W.J., Sandin S.A., Scheffer M., Schoener T.W., Shurin J.B., Sinclair A.R.E., Soulé M.E., Virtanen R., Wardle D.A. 2011. Trophic downgrading of planet Earth. *Science*, 333, 6040: 301–306
- Etični kodeks slovenskih lovcev. 1998. Ljubljana, Lovska Zveza Slovenije: 21 str.
http://www.lovska-zveza.si/userfiles/Zakonodaja/pdf/Eticni_kodeks.pdf (15. 8. 2016)
- Excoffier L., Lischer H.E.L. 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
- Excoffier L., Slatkin M. 1998. Incorporating Genotypes of Relatives into a Test of Linkage Disequilibrium. *The American Journal of Human Genetics*, 62, 1: 171–180
- Fabbri E., Caniglia R., Kusak J., Galov A., Gomerčič T., Arbanasić H., Huber D., Randi E. 2014. Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps. *Mammalian Biology*, 79, 2: 138–148
- Fabbri E., Miquel C., Lucchini V., Santini A., Caniglia R., Duchamp C., Weber J.M., Lequette B., Marucco F., Boitani L., Fumagalli L., Taberlet P., Randi E. 2007. From the Apennines to the Alps: Colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology*, 16, 8: 1661–1671

- Fernández-Gil A., Naves J., Ordiz A., Quevedo M., Revilla E., Delibes M. 2016. Conflict Misleads Large Carnivore Management and Conservation: Brown Bears and Wolves in Spain. *PLOS ONE*, 11, 3: e0151541, doi:10.1371/journal.pone.0151541: 13 str.
- Fisher R.A. 1930. The genetical theory of natural selection. Oxford, Oxford University Press: 308 str.
- Flagstad Ø., Walker C.W., Vilà C., Sundqvist A.-K., Fernholm B., Hufthammer A.K., Wiig Ø., Koyola I., Ellegren H. 2003. Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular Ecology*, 12, 4: 869–880
- Francisco L. V., Langston A.A., Mellersh C.S., Neal C.L., Ostrander E.A. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*, 7: 359–362
- François O., Currat M., Ray N., Han E., Excoffier L., Novembre J. 2010. Principal component analysis under population genetic models of range expansion and admixture. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 6: 1257–1268
- Frankham R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research*, 66: 95–107
- Frankham R. 1996. Relationships of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology*, 10, 6: 1500–1508
- Frankham R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126, 2: 131–140
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. 1st ed. Cambridge, Cambridge University Press: 617 str.
- Frantz A.C., Pope L.C., Carpenter P.J., Roper T.J., Wilson G.J., Delahay R.J., Burke T. 2003. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology*, 12, 6: 1649–1661
- Fredholm M., Winterø A.K. 1995. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome*, 6: 11–18
- Garner A., Rachlow J.L., Hicks J.F. 2005. Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conservation Biology*, 19, 4: 1215–1221
- Garza J.C., Williamson E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305–318
- Gazzola A., Bertelli I., Avanzinelli E., Apollonio M., Tolosano A., Bertotto P. 2005.

- Predation by wolves (*Canis lupus*) on wild and domestic ungulates of the western Alps, Italy. *Journal of Zoology*, 266: 205–213
- Geffen E., Kam M., Hefner R., Hersteinsson P., Angerbjörn A., Dalèn L., Fuglei E., Norèn K., Adams J.R., Vucetich J., Meier T.J., Mech L.D., Von Holdt B.M., Stahler D.R., Wayne R.K. 2011. Kin encounter rate and inbreeding avoidance in canids. *Molecular Ecology*, 20, 24: 5348–5358
- Girod C., Vitalis R., Leblois R., Fréville H. 2011. Inferring population decline and expansion from microsatellite data: a simulation-based evaluation of the Msvar method. *Genetics*, 188, 1: 165–79
- Godinho R., Llaneza L., Blanco J.C., Lopes S., Álvares F., García E.J., Palacios V., Cortés Y., Talegón J., Ferrand N. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20, 24: 5154–5166
- Godinho R., López-Bao J.V., Castro D., Llaneza L., Lopes S., Silva P., Ferrand N. 2015. Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: combining non-invasive samples with ancestry informative markers. *Molecular Ecology Resources*, 15, 2: 317–328
- Gottelli D., Sillero-Zubiri C., Applebaum G.D., Roy M.S., Girman D.J., Garcia-Moreno J., Ostrander E.A., Wayne R.K. 1994. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, 3, 4: 301–312
- Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate. *Journal of Heredity*, 86: 485–486
- Guo S.W., Thompson E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 2: 361–372
- Guyon R., Lorentzen T.D., Hitte C., Kim L., Cadieu E., Parker H.G., Quignon P., Lowe J.K., Renier C., Gelfenbeyn B., Vignaux F., DeFrance H.B., Gloux S., Mahairas G.G., Andre C., Galibert F., Ostrander E.A. 2003. A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9: 5296–5301
- Hansen M.M., Andersen L.W. 2011. Evaluation of the conservation genetic basis of management of grey wolves in Sweden. *Swedish large carnivore inquiry*. Stockholm: 23 str.

- Harms V., Nowak C., Carl S., Munoz-Fuentes V. 2015. Experimental evaluation of genetic predator identification from saliva traces on wildlife kills. *Journal of Mammalogy*, 96, 1: 138–143
- Hausknecht R., Gula R., Pirga B., Kuehn R. 2007. Urine - A source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Molecular Ecology Notes*, 7, 2: 208–212
- Hindrikson M., Männil P., Ozolins J., Krzywinski A., Saarma U. 2012. Bucking the trend in wolf-dog hybridization: first evidence from Europe of hybridization between female dogs and male wolves. *PloS One*, 7, 10: e46465, doi:10.1371/journal.pone.0046465: 13 str.
- Hindrikson M., Remm J., Männil P., Ozolins J., Tammeleht E., Saarma U. 2013. Spatial genetic analyses reveal cryptic population structure and migration patterns in a continuously harvested grey wolf (*Canis lupus*) population in North-Eastern Europe. *PLoS ONE*, 8, 9: e75765, doi:10.1371/journal.pone.0075765: 12 str.
- Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6, 2: 65–70
- Holmes N.G., Dickens H.F., Parker H.L., Binns M.M., Mellersh C.S., Sampson J. 1995. Eighteen canine microsatellites. *Animal Genetics*, 26: 132–133
- Huber D., Kusak J., Guzvica G., Gomeri T., Frkovi A. 2002. Causes of wolf mortality in Croatia in the period 1986-2001. *Veterinarski Arhiv*, 72, 3: 131–139
- Hughes J., Macdonald D.W. 2013. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. *Biological Conservation*, 157: 341–351
- Imbert C., Caniglia R., Fabbri E., Milanesi P., Randi E., Serafini M., Torretta E., Meriggi A. 2016. Why do wolves eat livestock?: Factors influencing wolf diet in northern Italy. *Biological Conservation*, 195: 156–168
- ISAG. 2005. Canine Panel for parentage verification.
<http://www.isag.us/Docs/consignmentforms/2005ISAGPanelDOG.pdf> (15. 8. 2016)
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 14: 1801–1806
- Jansson E., Harmoinen J., Ruokonen M., Aspi J. 2014. Living on the edge: reconstructing the genetic history of the Finnish wolf population. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 64: 1–20

- Jansson E., Ruokonen M., Kojola I., Aspi J. 2012. Rise and fall of a wolf population: Genetic diversity and structure during recovery, rapid expansion and drastic decline. *Molecular Ecology*, 21: 5178–5193
- Jędrzejewski W., Branicki W., Veit C., MeĐugorac I., Pilot M., Bunevich A.N., Jędrzejewska B., Schmidt K., Theuerkauf J., Okarma H., Gula R., Szymura L., Förster M. 2005. Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. *Acta Theriologica*, 50, 1: 3–22
- Jędrzejewski W., Jędrzejewska B., Andersone-Lilley Z., Balčiauskas L., Männil P., Ozolins J., Sidorovich V., Bagrađe G., Kubarsepp M., Ornicans A., Nowak S., Pupila A., Zunna A. 2010. Synthesizing wolf ecology and management in eastern Europe: similarities and contrasts with North America. V: *The world of wolves: New perspectives on ecology, behaviour and management*. Musiani M., Boitani L., Paquet P.C. (eds.). Calgary, University of Calgary Press: 207–233
- Jędrzejewski W., Jędrzejewska B., Okarma H., Schmidt K., Zub K., Musiani M. 2000. Prey Selection and Predation By Wolves in Białowieża Primeval Forest, Poland. *Journal of Mammalogy*, 81, 1: 197–212
- Jelenič M., Luštrik R., Huber Đ., Kusak J., Trontelj P., Rigg R., Skrbinšek T. Genetic diversity of wolves in Northwestern Dinaric Mountains and Slovakian Carpathians and comparison with other European wolf populations. (v pripravi)
- Jeremić J., Štrbenac A., Skroza N., Kusak J., Huber Đ., Džzp. 2013. Izvješće o stanju populacije vuka u Hrvatskoj u 2013. godini. Zagreb, Državni zavod za zaštitu prirode: 74 str.
- Johnson W.E., Eizirik E., Roelke-Parker M., O'Brien S.J. 2001. Applications of genetic concepts and molecular methods to carnivore conservation. V: *Carnivore conservation*. Gittleman J. L., Funk S. M., Macdonald D., Wayne R. K. (eds.). Cambridge, Cambridge University Press: 335–358
- Jombart T. 2008. Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 11: 1403–1405
- Jombart T., Pontier D., Dufour A.-B. 2009. Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity*, 102, 4: 330–341
- Kaczensky P. 1999. Large carnivore depredation on livestock in Europe. *Ursus*, 11: 59–72
- Kaczensky P., Chapron G., Arx M. Von, Huber D., Andrén H., Linnell J.D.C. 2012a.

- Status, management and distribution of large carnivores–bear, lynx, wolf in wolverine–in Europe. Part 1. Status of large carnivores in Europe. Strasbourg, Large Carnivore Initiative for Europe: 72 str.
- Kaczensky P., Chapron G., von Arx M., Huber D., Andrén H., John Linell. 2012b. Status, management and distribution of large carnivores–bear, lynx, wolf in wolverine–in Europe. Part 2. Status of large carnivores in Europe. Strasbourg, Large Carnivore Initiative for Europe: 72 str.
- Keller L.F., Jeffery K.J., Arcese P., Beaumont M.A., Hochachka W.M., Smith J.N., Bruford M.W. 2001. Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268, 1474: 1387–1394
- Keller L.F., Waller D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 17, 5: 230–241
- Kojola I., Kaartinen S., Hakala A., Heikkinen S., Voipio H.-M. 2009. Dispersal behavior and the connectivity between wolf populations in northern Europe. *Journal of Wildlife Management*, 73: 309–313
- Konvencija o mednarodni trgovini z ogroženimi prostoživečimi živalskimi in rastlinskimi vrstami (CITES, Washingtonska konvencija), Dodatek II. 1999. Ur. l. RS št. 31/99
- Konvencija o varstvu prosto živečega evropskega rastlinstva in živalstva ter njihovih naravnih življenjskih prostorov (Bernska konvencija). Dodatek II. 1998. Ur. l. RS št. 17/99
- Kusak J. 2002. Analiza uvjeta za život vuka u Hrvatskoj. Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet: 239 str.
- Kusak J., Skrbinšek A.M., Huber D. 2005. Home ranges, movements, and activity of wolves (*Canis lupus*) in the Dalmatian part of Dinarids, Croatia. *European Journal of Wildlife Research*, 51, 4: 254–262
- Lapini L., Brugnoli A., Krofel M., Kranz A., Molinari P. 2010. A grey wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) from Fiemme valley (Mammalia, Canidae; North-eastern Italy). *Bollettino del Museo Civico di Storia Naturale di Venezia*, 61: 117–129
- Leonard J.A., Echegaray J., Randi E., Vilà C. 2013. Impact of hybridization with domestic dogs on the conservation of wild canids. V: *Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation*. Gompper M. E. (ed.). Oxford, Oxford University Press: 170 – 184

- Lescureux N., Linnell J.D.C. 2014. Warring brothers: The complex interactions between wolves (*Canis lupus*) and dogs (*Canis familiaris*) in a conservation context. *Biological Conservation*, 171: 232–245
- Liberg O., Andrén H., Pedersen H.-C., Sand H., Sejberg D., Wabakken P., Kesson M., Bensch S. 2005. Severe inbreeding depression in a wild wolf (*Canis lupus*) population. *Biology Letters*, 1: 17–20
- Linnell J.D.C., Brøseth H., Solberg E.J., Brainerd S.M. 2005. The origins of the southern Scandinavian wolf *Canis lupus* population: potential for natural immigration in relation to dispersal distances, geography and Baltic ice. *Wildlife Biology*, 11: 383–391
- Linnell J.D.C., Salvatori V., Boitani L., Andrén H., Bath A., Carlos J. 2008. Guidelines for Population Level Management Plans for Large Carnivores. Rome, Large carnivore initiative for Europe: 85 str.
- Lucchini V., Galov A., Randi E. 2004. Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Molecular Ecology*, 13: 523–536
- Luikart G., Allendorf F.W., Cornuet J.M., Sherwin W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity*, 89: 238–247
- Luikart G., Cornuet J.-M. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12, 1: 228–237
- Luikart G., Ryman N., Tallmon D.A., Schwartz M.K., Allendorf F.W. 2010. Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conservation Genetics*, 11, 2: 355–373
- Majić A., Bath A.J. 2010. Changes in attitudes toward wolves in Croatia. *Biological Conservation*, 143, 1: 255–260
- Mallet J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 5: 229–237
- Mariat D., Kessler J.L., Vaiman D., Panthier J.J. 1996. Polymorphism characterization of five canine microsatellites. *Animal Genetics*, 27, 6: 434–435
- Marucco F., Pletscher D.H., Boitani L., Schwartz M.K., Pilgrim K.L., Lebreton J.-D. 2009.

- Wolf survival and population trend using non-invasive capture-recapture techniques in the Western Alps. *Journal of Applied Ecology*, 46: 1003–1010
- Mckelvey K.S., Schwartz M.K. 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *Journal of Wildlife Management*, 68: 439–448
- Mech L.D., Boitani L. 2010. *Canis lupus*. V: The IUCN Red List of Threatened Species. 2010. Cambridge, IUCN: 10 str.
<http://www.iucnredlist.org/details/3746/0> (15. 8. 2016)
- Mech L.D., Peterson R.O. 2003. Wolf - prey relations. V: *Wolves: Behaviour, Ecology, and Conservation*. 2003 Mech L.D., Boitani L. (eds.). Chicago, The University of Chicago Press: 131–160
- Mengel R.M. 1971. A study of dog-coyote hybrids and implications concerning hybridization in canis. *Journal of Mammalogy*, 52, 2: 316–336
- Meriggi A., Lovari S. 1996. A review of wolf predation in southern Europe: Does the wolf prefer wild prey to livestock? *Journal of Applied Ecology*, 33: 1561–1571
- Miller C.R., Joyce P., Waits L.P. 2002. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics*, 160: 357–366
- Milligan B.G. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics*, 163, 3: 1153–1167
- Mills L.S., Citta J.J., Lair K.P., Schwarz M.K., Tallmon D. 2000. Estimating animal abundance using non-invasive sampling: Promises and pitfalls. *Ecological Applications*, 10, 1: 283–294
- Miquel C., Bellemain E., Poillot C., Bessière J., Durand A., Taberlet P. 2006. Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach. *Molecular Ecology Notes*, 6, 4: 985–988
- Montana L., Caniglia R., Galaverni M., Fabbri E., Bolfíková B.Č., Czarnomska S.D., Galov A., Hindrikson M., Hulva P., Jędrzejewska B., Jelenčič M., Kutal M., Saarma U., Skrbinšek T., Randi E. 2016. Combining phylogenetic and demographic inferences to assess the extent and origin of the genetic diversity in an isolated wolf population. (oddano v objavo avgust 2016)
- Moura A.E., Tsingarska E., Dabrowski M.J., Czarnomska S.D., Jedrzejewska B., Pilot M. 2013. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline:

- The cautionary case of Bulgarian wolves. *Conservation Genetics*, 15: 405–417
- Mumma M.A., Soulliere C.E., Mahoney S.P., Waits L.P. 2014. Enhanced understanding of predator-prey relationships using molecular methods to identify predator species, individual and sex. *Molecular Ecology Resources*, 14, 1: 100–108
- Muñoz-Fuentes V., Darimont C.T., Paquet P.C., Leonard J.A. 2009. The genetic legacy of extirpation and re-colonization in Vancouver Island wolves. *Conservation Genetics*, 11, 2: 547–556
- Murphy M.A., Kendall K.C., Robinson A., Waits L.P. 2007. The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conservation Genetics*, 8, 5: 1219–1224
- Nielsen E.E., Bach L.A., Kotlicki P. 2006. HYBRIDLAB (version 1.0): A program for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes*, 6: 971–973
- Ostrander E.A., Sprague G.F., Rine J. 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)_n markers for genetic mapping in dog. *Genomics*, 16: 207–213
- Paetkau D. 2004. The optimal number of markers in genetic capture-mark-recapture studies. *Journal of Wildlife Management*, 68: 449–452
- Palstra F.P., Ruzzante D.E. 2008. Genetic estimates of contemporary effective population size: What can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology*, 17, 15: 3428–3447
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 1: 288–295
- Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28, 19: 2537–2539
- Piggott M.P. 2004. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildlife Research*, 31: 485–493
- Pilot M., Greco C., VonHoldt B.M., Jędrzejewska B., Randi E., Jędrzejewski W., Sidorovich V.E., Ostrander E.A., Wayne R.K. 2014. Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in European wolves. *Heredity*, 112, 4: 428–442

- Pilot M., Jedrzejewski W., Branicki W., Sidorovich V.E., Jedrzejewska B., Stachura K., Funk S.M. 2006. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology*, 15: 4533–4553
- Potočnik H., Krofel M., Skrbinšek T., Ražen N., Jelenčič M., Kljun F., Žele D., Vengušt G., Kos I. 2012. Spremljanje stanja populacije volka v Sloveniji (2). 1. in 2. sezona – 2010/11 in 2011/12. Projektno poročilo za Akcijo C1 (LIFE08 NAT/SLO/000244 SloWolf). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 23 str.
- Potočnik H., Krofel M., Skrbinšek T., Ražen N., Jelenčič M., Kljun F., Žele D., Vengušt G., Kos I. 2014. Spremljanje stanja populacije volka v Sloveniji (3); 1., 2. in 3. sezona - 2010/11, 2011/12 in 2012/13. Projektno poročilo za Akcijo C1. Ljubljana, SloWolf: 63 str.
- Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. 2002. Ur. l. RS, št. 82/02
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959
- Pritchard J.K., Wen X., Falush D. 2010. Documentation for structure software: Version 2.3. Chicago, University of Chicago: 38 str.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing
- Räikkönen J., Vucetich J.A., Peterson R.O., Nelson M.P. 2009. Congenital bone deformities and the inbred wolves (*Canis lupus*) of Isle Royale. *Biological Conservation*, 142, 5: 1025–1031
- Räikkönen J., Vucetich J.A., Vucetich L.M., Peterson R.O., Nelson M.P. 2013. What the inbred Scandinavian wolf population tells us about the nature of conservation. *PloS One*, 8, 6: e67218, doi:10.1371/journal.pone.0067218: 7 str.
- Ralls K., Ballou J.D., Templeton A. 1988. Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation Biology*, 2, 2: 185–193
- Randi E. 2008. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology*, 17: 285–293
- Randi E. 2011. Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Review*, 41, 2: 99–111
- Randi E., Hulva P., Fabbri E., Galaverni M., Galov A., Kusak J., Bigi D., Bolfíková B.Č.,

- Smetanová M., Caniglia R. 2014. Multilocus detection of wolf x dog hybridization in Italy, and guidelines for marker selection. *PloS One*, 9, 1: e86409, doi:10.1371/journal.pone.0086409: 13 str.
- Randi E., Lucchini V. 2002. Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conservation Genetics*, 3: 31–45
- Ray J., Redford K., Steneck R., Berger J. 2005. Large carnivores and the conservation of biodiversity. 1st ed. Washington, Island Press: 544 str.
- Ražen N., Brugnoli A., Castagna C., Groff C., Kaczensky P., Kljun F., Knauer F., Kos I., Krofel M., Luštrik R., Majjić A., Rauer G., Righetti D., Potočnik H. 2016. Long-distance dispersal connects Dinaric-Balkan and Alpine grey wolf (*Canis lupus*) populations. *European Journal of Wildlife Research*, 61, 1: 137–142
- Ripple W.J., Estes J. a, Beschta R.L., Wilmers C.C., Ritchie E.G., Hebblewhite M., Berger J., Elmhagen B., Letnic M., Nelson M.P., Schmitz O.J., Smith D.W., Wallach A.D., Wirsing A.J. 2014. Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science*, 343, 6167: 1–11
- Robinson J.D., Moyer G.R. 2013. Linkage disequilibrium and effective population size when generations overlap. *Evolutionary Applications*, 6, 2: 290–302
- Rutledge L.Y., Patterson B.R., Mills K.J., Loveless K.M., Murray D.L., White B.N. 2010. Protection from harvesting restores the natural social structure of eastern wolf packs. *Biological Conservation*, 143, 2: 332–339
- Rutledge L.Y., White B.N., Row J.R., Patterson B.R. 2012. Intense harvesting of eastern wolves facilitated hybridization with coyotes. *Ecology and Evolution*, 2, 1: 19–33
- Sastre N., Vilà C., Salinas M., Bologov V. V., Urios V., Sánchez A., Francino O., Ramírez O. 2010. Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations. *Conservation Genetics*, 12, 3: 701–712
- Shibuya H., Collins B.K., Huang T.H., Johnson G.S. 1994. A polymorphic (AGGAAT)_n tandem repeat in an intron of the canine von Willebrand factor gene. *Animal Genetics*, 25, 2: 122
- Sindičić M., Polanc P., Gomerčič T., Jelenčič M., Huber Đ., Trontelj P., Skrbinšek T. 2013. Genetic data confirm critical status of the reintroduced Dinaric population of Eurasian lynx. *Conservation Genetics*, 14, 5: 1009–1018

- Skrbinšek T. 2007. Baza podatkov MisBase. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo (osebni vir, 15. 7. 2016)
- Skrbinšek T. 2013. Rodovniki volkov v SZ Dinaridih. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo (osebni vir, 15. 12. 2013)
- Skrbinšek T. 2013. Ulovljivost volkov pri ocenjevanju številčnosti volkov v SZ Dinaridih. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo (osebni vir, 15. 12. 2013)
- Skrbinšek T., Jelenčič M., Potočnik H., Trontelj P., Kos I. 2008. Analiza medvedov odvzetih iz narave in genetsko-molekularne raziskave populacije medveda v Sloveniji. Varstvena genetika in ocena številčnosti medveda 2007. Zaključno poročilo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 79 str.
- Skrbinšek T., Jelenčič M., Waits L., Kos I., Trontelj P. 2010. Highly efficient multiplex PCR of noninvasive DNA does not require pre-amplification. *Molecular Ecology Resources*, 10, 3: 495–501
- Skrbinšek T., Jelenčič M., Waits L., Kos I., Jerina K., Trontelj P. 2012a. Monitoring the effective population size of a brown bear (*Ursus arctos*) population using new single-sample approaches. *Molecular Ecology*, 21, 4: 862–75
- Skrbinšek T., Jelenčič M., Waits L.P., Potočnik H., Kos I., Trontelj P. 2012b. Using a reference population yardstick to calibrate and compare genetic diversity reported in different studies: an example from the brown bear. *Heredity*, 109, 5: 299–305
- Skrbinšek T, Jelenčič M, Waits LP, Potočnik H, Trontelj P (2012c) Data from: Using a reference population yardstick to calibrate and compare genetic diversity reported in different studies: an example from the brown bear. Dryad Digital Repository. <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.qt3j5>
- Smith D., Meier T., Geffen E.H., Mech L.D., Angeles L., Park N., Burch J.W., Adams L.G., Wayne R.K. 1997. Is incest common in gray wolf packs? *Behavioral Ecology*, 8, 4: 384–391
- Strategija ohranjanja volka (*Canis lupus*) v Sloveniji in trajnostnega upravljanja z njim. 2009. http://www.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/podrocja/velike_zveri/strategija_ohranjanja_volka.pdf (15. 8. 2016)
- Stronen A. V., Tessier N., Jolicoeur H., Paquet P.C., Nault M.H., Villemure M., Patterson B.R., Sallows T., Goulet G., Lapointe F.J. 2012. Canid hybridization: Contemporary

- evolution in human-modified landscapes. *Ecology and Evolution*, 2: 2128–2140
- Stronen A. V., Jędrzejewska B., Pertoldi C., Demontis D., Randi E., Niedziałkowska M., Pilot M., Sidorovich V.E., Dykyy I., Kusak J., Tsingarska E., Kojola I., Karamanlidis A.A., Ornicans A., Lobkov V.A., Dumenko V., Czarnomska S.D. 2013. North-South differentiation and a region of high diversity in European wolves (*Canis lupus*). *PloS One*, 8, 10: e76454, doi:10.1371/journal.pone.0076454: 9 str.
- Sundqvist A.-K., Ellegren H., Vilà C. 2007. Wolf or dog? Genetic identification of predators from saliva collected around bite wounds on prey. *Conservation Genetics*, 9, 5: 1275–1279
- Swenson J.E., Taberlet P., Bellemain E. 2011. Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos*. *Mammal Review*, 41: 87–98
- Štrbenac A., Huber Đ., Kusak J., Majić Skrbinišek A., Frković A., Štahan Ž., Jeremić-Martinko J., Desnica S., Štrbenac P. 2005. Plan upravljanja vukom u Hrvatskoj. Zagreb, Državni zavod za zaštitu prirode: 110 str.
- Štrbenac A., Kusak J., Huber Đ., Jeremić J., Oković P., Majić-Skrbinšek A., Vukšić I., Katušić L., Desnica S., Gomerčić T., Bišćan A., Zec D., Grubešić M. 2010. Plan upravljanja vukom u Republici Hrvatskoj za razdoblje 2010 - 2015. Zagreb, Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode: 136 str.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24, 16: 3189–3194
- Taberlet P., Waits L.P., Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 8: 323–327
- Tasker L. 2007. Stray Animal Control Practices (Europe). An investigation of stray dog and cat population control practices across Europe. London, World Society for the Protection of Animals (WSPA) and Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals – International (RSPCA International): 55 str.
- Thomas R., Holmes N.G., Fischer P.E., Dickens H.F., Breen M., Sampson J., Binns M.M. 1997. Eight canine microsatellites. *Animal Genetics*, 28, 2: 153–154
- Uredba o zavarovanju ogroženih živalskih vrst. 1993. Ur. l. RS, št. 57/93
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in

- microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535–538
- Van Oosterhout C., Weetman D., Hutchinson W.F. 2006. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes*, 6, 1: 255–256
- Verardi A., Lucchini V., Randi E. 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology*, 15, 10: 2845–2855
- Vilà C., Savolainen P., Maldonado J.E., Amorim I.R., Rice J.E., Honeycutt R.L., Crandall K.A., Lundeberg J., Wayne R.K. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276, 1997: 1687–1689
- Vilà C., Sundqvist A.-K., Flagstad Ø., Seddon J., Björnerfeldt S., Kojola I., Casulli A., Sand H., Wabakken P., Ellegren H. 2003a. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 91–97
- Vilà C., Walker C., Sundqvist A.-K., Flagstad Ø., Andersone Z., Casulli A., Kojola I., Valdmann H., Halverson J., Ellegren H. 2003b. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity*, 90, 2003: 17–24
- Vilà C., Wayne R.K. 1999. Hybridization between wolves and dogs. *Conservation Biology*, 13, 1: 195–198
- Von Holdt B.M., Pollinger J.P., Earl D.A., Knowles J.C., Boyko A.R., Parker H., Geffen E., Pilot M., Jedrzejewski W., Jedrzejewska B., Sidorovich V., Greco C., Randi E., Musiani M., Kays R., Bustamante C.D., Ostrander E.A., Novembre J., Wayne R.K. 2011. A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids. *Genome Research*, 21, 8: 1294–1305
- Von Holdt B.M., Pollinger J.P., Earl D.A., Parker H.G., Ostrander E.A., Wayne R.K. 2013. Identification of recent hybridization between gray wolves and domesticated dogs by SNP genotyping. *Mammalian Genome*, 24, 1-2: 80–88
- Von Holdt B.M., Stahler D.R., Smith D.W., Earl D.A., Pollinger J.P., Wayne R.K. 2008. The genealogy and genetic viability of reintroduced Yellowstone grey wolves. *Molecular Ecology*, 17, 1: 252–274
- Wabakken P., Sand H., Liberg O., Bjärvall A. 2001. The recovery, distribution, and

- population dynamics of wolves on the Scandinavian peninsula, 1978-1998. *Canadian Journal of Zoology*, 79, 4: 710–725
- Waits J.L., Leberg P.L. 2000. Biases associated with population estimation using molecular tagging. *Animal Conservation*, 3, 3: 191–199
- Waits L.P., Luikart G., Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: Cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10, 1: 249–256
- Wang J. 2007. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetical Research*, 89: 135–153
- Wang J. 2011. Coancestry: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources*, 11, 1: 141–145
- Waples R.S. 2002. Definition and estimation of effective population size in the conservation of endangered species. V: *Population Viability Analysis*. Beissinger S. R., McCullough D. R. (eds.). Chicago, University of Chicago Press: 147–168
- Waples R.S. 2005. Genetic estimates of contemporary effective population size: To what time periods do the estimates apply? *Molecular Ecology*, 14, 11: 3335–3352
- Waples R.S. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*, 7, 2: 167–184
- Waples R.S. 2010. Spatial-temporal stratifications in natural populations and how they affect understanding and estimation of effective population size. *Molecular Ecology Resources*, 10, 5: 785–796
- Waples R.S., Antao T., Luikart G. 2014. Effects of Overlapping Generations on Linkage Disequilibrium Estimates of Effective Population Size. *Genetics*, 197, 2: 769–780
- Waples R.S., Do C. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, 8, 4: 753–756
- Waples R.S., Do C. 2010. Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications*, 3, 3: 244–262
- Waples R.S., Smouse P.E. 1990. Gametic disequilibrium analysis as a means of identifying mixtures of salmon populations. *American Fisheries Society Symposium*, 7: 439–458
- Wayne R.K., Vilà C. 2003. Molecular genetic studies of wolves. V: *Wolves. Behavior, ecology and conservation*. Mech L. D. , Boitani L. (eds.). Chicago, The University of

- Chicago Press: 161–191
- Wengert G.M., Gabriel M.W., Matthews S.M., Higley J.M., Sweitzer R.A., Thompson C.M., Purcell K.L., Barrett R.H., Woods L.W., Green R.E., Keller S.M., Gaffney P.M., Jones M., Sacks B.N. 2014. Using DNA to describe and quantify interspecific killing of fishers in California. *The Journal of Wildlife Management*, 78, 4: 603–611
- Wielgus R.B., Peebles K. A. 2014. Effects of Wolf Mortality on Livestock Depredations. *PLoS ONE*, 9, 12: e113505, doi:10.1371/journal.pone.0113505: 16 str.
- Williams C.L., Blejwas K., Johnston J.J., Jaeger M.M. 2003. A coyote in sheep's clothing: predator identification from saliva. *Wildlife Society Bulletin*, 31, 4: 926–932
- Williamson-Natesan E.G. 2005. Comparison of methods for detecting bottlenecks from microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 6, 4: 551–562
- Wright S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16, 2: 97–159
- Wydeven A.P., Treves A., Brost B., Wiedenhoeft J.E. 2004. Characteristics of wolf packs in wisconsin: identification of traits influencing depredation. V: *People and Predators: From Conflict to Coexistence*. Fascione N., Delach A., Smith M. (eds.). Washington, DC, Island Press: 28–50
- Young J.K., Olson K.A., Reading R.P., Amgalanbaatar S., Berger J. 2011. Is wildlife going to the dogs? Impacts of feral and free-roaming dogs on wildlife populations. *BioScience*, 61, 2: 125–132
- Zakon o zaščiti živali (ZZZiv). 1999. Ur. l. RS, št. 98/99
- Zakon o zaščiti živali (ZZZiv-UPB3). 2013. Ur. l. RS, št. 38/13
- Zavod za gozdove Slovenije. 2013. Letni načrt za XV. Ptujsko - Ormoško lovsko upravljavsko območje za leto 2013. Maribor: 56 str.
- Zavod za gozdove Slovenije. 2015. Letni upravljavski načrt za XIII. Zasavsko lovsko upravljavsko območje za leto 2015. Ljubljana: 55 str.

ZAHVALA

Prof. dr. Petru Trontlju se zahvaljujem za mentorstvo ter hiter in temeljit pregled naloge. Vesela sem, da si me lansko leto tak čas pregovoril, da končam to zgodbo tako kot je treba – in evo, uspelo je.

Za temeljit pregled in prispevek k izboljšanju doktorske naloge se zahvaljujem tudi članom moje komisije.

Prof. dr. Đuru Huberju in prof. dr. Josipu Kusaku se zahvaljujem za možnost uporabe in delo s hrvaškimi vzorci volkov.

Hvala naši terenski ekipi, prostovoljcem in delavcem Zavoda za gozdove Slovenije, ki vsa ta leta vestno zbirajo genetske vzorce volkov – brez vašega prispevka v laboratoriju ne bi mogli kaj dosti narediti.

Tomaž, hvala za vse kar sem se tekom let lahko naučila od tebe. Hvala za vse poučne razprave in spodbudne besede.

Roman, hvala za statistične in R urice, ki si jih preživel z mano in seveda za pomoč pri analizah.

Hubert, hvala za volčje debate in pomoč pri pripravi kart.

Sodelavci iz skupine za ekologijo živali: Urška, Saška, Irena K., Frenk, Hubert, Roman, Tomaž in Ivan, pa tudi Nina, Anamarija, Irena B., Jasna in Miha, ki ste se nam pridružili tekom let za krajši čas in našim sosedom – Mojca, Maja P.U. in Dragan, hvala za super delovno vzdušje. Vesela sem, da sem lahko del tega tima.

Valeriji, Meti, Ajdi, Teju in Žigi hvala za prijetno delovno vzdušje v spodnjem laboratoriju.

Dinaricumovcem hvala za možnost, da sem se preizkusila v vlogi predsednice društva in za možnost sodelovanja na različnih projektih, kjer sem dobila številne nove izkušnje. V teh dveh letih in pol je bilo vsak teden kaj novega, v lepem spominu pa mi bodo ostali tudi naši sestanki in skupni izleti.

Maja, Mojca, Tina in Ines – s pravo žensko družbo je vse lažje ☺ Maja lepo je bilo biti tvoja cimra – brez Društvene in tvoje družbe ta pot ne bi bila ista ☺ še posebej hvala, da si bila ob meni, ko ni šlo vse tako kot bi si žela. Mojca, hvala, da si prevzela vodenje Dinaricuma v času mojega pisanja doktorske in za potepanja po Svetu, ki so dajala nov zagon za delo, ostala pa bodo v lepem spominu (skratka kontra softi ;)). Tina in Ines, tekom let mojega doktorskega študija so se naše družinske vezi okrepile. Nešteti obiski McDonald's-a, gledaliških predstav in druženja z vama so bili pravi balzam za dušo ☺ Skratka punce, super ste in hvala, da ste bile ob meni tekom vseh teh let.

Hvala moji družini (beri cela Partizanska 16 ☺) – brez vas ne bi prišla tako daleč. Mami in oči, hvala, tako za finančno kot moralno podporo. Še posebej hvala za vso pomoč v zadnjih mesecih odkar imamo Piko in je babi-servis res zlata vreden. Fantje, ki ste se skupaj z mano veselili zaključka tega projekta – otroška perspektiva je bila prava popestritev delovnih sobot in nedelj ☺ Blanka in mami pa vsi naši sprehodi po šmarski okolici, polni planiranja, dobre volje in optimizma – neprecenljivo!

In moja družinica - Luka, hvaležna sem ti, da si mi ob pisanju in zaključevanju doktorata stal ob strani ne glede na moje odločitve. Tvoja spodbuda, energija in pozornost, ki si mi jih namenil, še posebej ob tistih bolj »napetih« dnevih, so bili res neprecenljiva pomiritev in motivacija za dokončanje tega projekta. Mala moja Pika, presrečna sem, da te imamo in da se skupaj podajamo novim zmagam naproti.

FINANCIRANJE

Doktorski študij je sofinancirala Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada preko Inovativne sheme za sofinanciranje doktorskega študija za sodelovanje z gospodarstvom in reševanje aktualnih družbenih izzivov – generacija 2010 Univerza v Ljubljani.

Večji del naloge je bil narejen v sklopu projekta Varstvo in spremljanje varstvenega statusa populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji (2010-2013) – SloWolf (*LIFE08 NAT/SLO/000244 SloWolf*), ki so ga sofinancirali Evropska komisija, Ministrstvo za okolje in prostor ter Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.

PRILOGE

PRILOGA A

Tipi neinvazivnih vzorcev.

Types of noninvasive samples.

Pregled različnih tipov neinvazivnih vzorcev zbranih tekom neinvazivnega genetskega vzorčenja, ki je potekalo od leta 2010 do 2013. Med vsemi analiziranimi delujočimi neinvazivnimi in tkivnimi vzorci smo pridobili referenčne vzorce za posamezne volkove na podlagi katerih so bile nato narejene analize v pričujoči doktorski nalogi.

Overview of various types of non-invasive samples collected during 2010 to 2013 in noninvasive genetic sampling. Among all the genotyped noninvasive and tissue samples we acquired reference samples for individual wolves, which represent the basis for analysis of this doctoral thesis.

leto/tip vzorca	iztrebki	iztrebki - GK	urin	slina	SKUPAJ
2010/2011	256	53	117	145	571
2011/2012	163	28	96	257	544
2012/2013	181		114	200	495
SKUPAJ	600	81	327	602	1610

PRILOGA B

Lokusi uporabljeni v naši študiji.

Loci used in our study.

Lokusi s pripadajočimi podatki uporabljeni v naši študiji.

Loci with associated data used in our study.

lokus	motiv	min. alel	maks. alel	kromosom	MP	konc. začetnika v PCR (μ L)	barvilo	nukleotidno zaporedje začetnika F (5' - 3')	nukleotidno zaporedje začetnika R (5'-3')	Vir
C09.250	di-	127	141	CFA9	ID	0,25	6FAM	6FAM-TTAGTTAACCCAGCTCCCCCA	TCACCCTGTTAGCTGCTCAA	Ostrander in sod., 1993
C20.253	di-	94	110	CFA20	ID	0,05	VIC	VIC-AATGGCAGGATTTCTTTTGC	ATCTTTGGACGAATGGATAAGG	Ostrander in sod., 1993
CPH12	di-	195	205	CFA8	ID	0,20	6FAM	6FAM-GGCATTACTTGGAGGGAGGAA	GATGATTCTATGCTTCTTTGAG	Fredholm in Winterø, 1995
CPH5	di-	110	126	CFA15	ID	0,12	PET	PET-TCCATAACAAGACCCCAAAC	GGAGGTAGGGGTCAAAAGTT	Fredholm in Winterø, 1995
CPH7	di-	163	171	CFA2	ID	0,12	NED	NED-ACACAACCTTCCATAATACTTCCCA	ATCAATGCTCTCTCTCCCAG	Fredholm in Winterø, 1995
CPH8	di-	200	218	CFA13	ID	0,40	PET	PET-AGGCTCACAATCCCTCTCATA	TAGATTTGATACCTCCCTGAGTCC	Fredholm in Winterø, 1995
CPH9	di-	140	164	CFA28	ID	0,25	VIC	VIC-CAGAGACTGCCACTTTAAACACAC	AAAGTTCTCAAATACCATTGTGTTACA	Fredholm in Winterø, 1995
Cxx.103 *	di-	/	/	CFA4	ID	0,36	6FAM	6FAM-GGAAACTCAGTTATTTTACA	GCCCTAGAACTTCACACACA	Holmes in sod., 1995
Cxx.121	di-	81	107	CFA13	ID	0,25	NED	NED-TATTGCGAATGTCAGTGCTT	ATAGATACTCTCTCTCCG	Holmes in sod., 1995
FH2010	tetra-	212	236	CFA24	ID	0,10	VIC	VIC-AAATGGAACAGTTGAGCATGC	CCCCTTACAGCTTCATTTTCC	Francisco in sod., 1996
FH2145	tetra-	281	294	CFA3	ID	0,40	PET	CAGTCGGGTTTAGGGTCTCA	CAGAGCCCCTGACTGCAT	Francisco in sod., 1996
SRY	-	/	/	Y	ID	0,10	PET	GAACGCATTCTTGGTGTGGTC	PET-TGATCTCTGAGTTTGCATTG	Bellemain in Taberlet, 2004
CPH2	di-	94	110	CFA32	A	0,17	6FAM	6FAM-TTCTGTGTATCGGCACCA	TTCTTGAGAACAGTGTCTCTCG	Fredholm in Winterø, 1995
CPH4	di-	144	154	CFA15	A	0,47	6FAM	6FAM-ACTGGAGATGAAAAGTATTATA	TTACAGGGGAAAGCCTCATT	Fredholm in Winterø, 1995
CPH6	di-	121	139	CFA23	A	0,10	PET	PET-CATTGGCTGTTGACTCTAGG	ACTGATGTGGGTGTCTCTGC	Fredholm in Winterø, 1995

lokus	motiv	min. alel	maks. alel	kromosom	MP	konc. začetnika v PCR (μL)	barvilo	nukleotidno zaporedje začetnika F (5' - 3')	nukleotidno zaporedje začetnika R (5'-3')	Vir
FH2004	tetra-	111	191	CFA11	A	0,21	VIC	VIC-TCATTGCTGATACAGACTGAG	TTGAGCTTAGATCTCAAAGCATAGTG	Francisco in sod., 1996
FH2079*	tetra-	/	/	CFA24	A	/	6FAM	CCGAGCACATGGTTTGT	6FAM-GATTCTGATATGCCAGCTAA	Francisco in sod., 1996
FH2088	tetra-	94	138	CFA15	A	0,37	NED	NED-CCCTCTGCTACATCTCTGC	TTCATAGGGCATGCATATAAC	Francisco in sod., 1996
FH2096	tetra-	98	110	CFA11	A	0,08	PET	PET-CCGTCTAAGAGCCTCCAG	GACAAGGTTTCTGGTTCCA	Francisco in sod., 1996
CPH22	di-	110	116	/	B	0,33	PET	PET-TCTTTCATTTACATTTTGGCTCA	GCCCCAAAATCCGTGTGT	Dolf in sod., 2000
Cxx.123	di-	123	151	CFA23	B	0,35	6FAM	6FAM-AACTGGCCAAACATAAACAG	TTCATTAACCCTTTGCCCTG	Ostrander in sod., 1993
FH2137	tetra-	161	183	CFA3	B	0,20	NED	NED-TTCCAACATGATGACTAGTGTTCCA	ATGAATTGCCCAAGTTTGT	Francisco in sod., 1996
VWF	heksa-	142	178	CFA27	B	0,30	PET	PET-CTCCCCTTCTCTACCTCCACCTCTAA	CAGAGGTCAGCAAGGGTACTATTGTG	Shibuya in sod., 1994
AHT137	di-	124	152	CFA11	C	0,30	VIC	VIC-TACAGAGCTCTTAAGTGGTCC	CCTTGCAAAGTGTCATTGCT	Holmes in sod., 1995
AHTh171*	di-	/	/	CFA6	C	0,40	PET	PET-AGGTGCAGAGCACTCACTCA	CCCATCCACAGTTCAGCTTT	Breen in sod., 2001
AHTh260	di-	230	266	CFA16	C	0,25	VIC	VIC-CGCTATACCCACACCAGGAC	CCACAGAGGAAGGGATGC	Breen in sod., 2001
AHTk211	di-	83	93	CFA26	C	0,10	6FAM	6FAM-TTAGCAGCCGAGAAATACGC	ATTCGCCGACTTTGGCA	Thomas in sod., 1997
AHTk253	di-	280	298	CFA23	C	0,05	VIC	VIC-ACATTTGTGGCATTGGGGCTG	TGCACATGGAGGACAAGCACGC	Thomas in sod., 1997
amelogenin	-	/	/	CFAX	C	0,05	NED	NED-GTGCCAGCTCAGCAGCCCGTGGT	TCGGAGGCAGAGGTGGCTGTGGC	Finnzyme Inc.
CXX279	di-	114	134	CFA22	C	0,05	6FAM	6FAM-TGCTCAATGAAATAAGCCAGG	GCGACCTTCATTCTCTGAC	Ostrander in sod., 1993
FH2054	tetra-	146	170	CFA12	C	0,10	PET	PET-GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG	ATGCTGAGTTTGAACCTTCCC	Francisco in sod., 1996
FH2848	di-	230	240	CFA2	C	0,20	NED	NED-CAAACCAACCCATTCCTC	GTCACAAGGACTTTTCTCCTG	Guyon in sod., 2003
INRA21	di-	92	100	CFA21	C	0,20	VIC	VIC-ATGTAGTTGAGATTTCTCTACGG	TAATGGCTGATTTATTGGTGG	Mariat in sod., 1996
INU005*	di-	/	/	CFA33	C	/	NED	NED-CTTTCTACCAGCAAGTTAC	TCCCCATTTAATTGCCTCT	Finnzyme Inc.
INU030	di-	139	149	CFA12	C	0,20	NED	NED-GGCTCCATGCTCAAGTCTGT	CATTGAAAGGGAATGCTGGT	Finnzyme Inc.

lokus	motiv	min. alel	maks. alel	kromosom	MP	konc. začetnika v PCR (μ L)	barvilo	nukleotidno zaporedje začetnika F (5' - 3')	nukleotidno zaporedje začetnika R (5'-3')	Vir
INU055	di-	198	208	CFA10	C	0,07	6FAM	6FAM-CCAGGCGTCCCTATCCATCT	GCACCACTTTGGGCTCCTTC	Finnzyme Inc.
REN162C04	di-	190	208	CFA7	C	0,40	PET	PET-TTCCCTTTGCTTTAGTAGGTTTGG	TGGCTGTATTCTTTGGCACA	Guyon in sod., 2003
REN169D01	di-	198	216	CFA14	C	0,05	VIC	VIC-AGTGGGTTGCAAGTGGAAC	AATAGCACATCTTCCCCACG	Guyon in sod., 2003
REN169O18	di-	156	170	CFA29	C	0,05	6FAM	6FAM-CACCCAACCTGTCTGTTCT	ACTGTGTGAGCCAATCCCTT	Guyon in sod., 2003
REN247M23	di-	267	281	CFA15	C	0,30	PET	PET-TGGTAACACCAAGGCTTTCC	TGTCTTTTCCATGGTGGTGA	Guyon in sod., 2003
REN54P11	di-	227	241	CFA18	C	0,05	6FAM	6FAM-GGGGGAATTAACAAAGCCTGAG	TGCAAATTCTGAGCCCCACTG	Guyon in sod., 2003

Lokus - ime lokusa; motiv - dolžina motiva lokusa: di-/tetra-/heksa- nukleotidni; min.alel - najmanjši alel; maks. alel - največji alel; kromosom - na katerem se nahaja lokus; MP - PCR multipleks v katerem smo lokus amplificirali; konc. začetnika v PCR (μ L) - koncentracija začetnika v multipleksu; barvilo - fluorescentno barvilo s katerim je označen eden od začetnikov - 6FAM - modro, PET - rdeče, VIC - zeleno, NED - rumeno. * lokusi, ki smo jih zaradi nezanesljivosti in nečitljivosti elektorferogramov že med optimizacijo protokolov PCR izločili iz analize.

PRILOGA C

Frekvence alelov za lokuse v multipleksu ID za razločevanje vzorcev
 volka, psa, lisice in šakala.

Allele frequencies for loci in multiplex ID for distinguishing of
 wolf, dog, fox, and jackal samples.

Legenda

Ni pri volku, samo ena vrsta
Ni pri volku, več vrst
Samo pri volku in psu
Pri volku, ni pri psih
Samo pri volku

LOKUS	Volkovi (N = 318)		Lisice (N = 11)		Psi (N = 52)		Šakali (N = 28)	
	A	F	A	F	A	F	A	F
C09.250			121	0,05			119	0,35
					123	0,01		
							125	0,02
	127	0,002	127	0,50	127	0,18		
	129	0,005	129	0,09			129	0,02
	131	0,16	131	0,14	131	0,05	131	0,26
	133	0,26	133	0,05	133	0,26	133	0,28
	135	0,08	135	0,18	135	0,03	135	0,07
	137	0,25			137	0,23		
	139	0,21			139	0,05		
	141	0,03			141	0,12		
				143	0,07			
				147	0,01			
C20.253							92	0,06
							94	0,24
	94	0,23					98	0,13
	100	0,24			100	0,02	100	0,48
	102	0,16			102	0,04		
	104	0,21			104	0,03		
					106	0,10	106	0,09
108	0,12			108	0,66			
110	0,04			110	0,13			
112	0,005			112	0,03			
CPH12			181	1,00				
					193	0,14		
	195	0,43			195	0,61		
	197	0,28						
	199	0,04					199	0,98
	201	0,00					201	0,02
205	0,24			205	0,23			
				207	0,01			
				209	0,01			
CPH5	110	0,40			110	0,14		
	112	0,11			112	0,06	112	0,04
	114	0,23			114	0,68		
	116	0,05			116	0,10		
							118	0,69
	124	0,21			124	0,02	120	0,28
126	0,002							

LOKUS	Volkovi (N = 318)		Lisice (N = 11)		Psi (N = 52)		Šakali (N = 28)	
	A	F	A	F	A	F	A	F
CPH7			155	0,95				
			157	0,05				
					161	0,09		
	163	0,01			163	0,05		
	165	0,53			165	0,27		
	167	0,03			167	0,02	167	0,70
	169	0,13			169	0,21	169	0,30
171	0,30			171	0,37			
CPH8	200	0,03			200	0,24	200	0,02
			201	0,13				
					202	0,01	202	0,07
							204	0,89
							206	0,02
	208	0,35			208	0,43		
	210	0,03			210	0,10		
	212	0,13	212	0,38	212	0,07		
	214	0,42			214	0,15		
	218	0,05	216	0,06	216	0,01		
		218	0,19					
220	0,25							
CPH9	140	0,02			140	0,41	140	0,06
	142	0,06			142	0,03		
	144	0,56			144	0,06	144	0,31
	148	0,00	148	0,14	148	0,00		
	150	0,02			150	0,33		
			152	0,50	152	0,07	152	0,54
			154	0,27	154	0,11		
		156	0,09					
162	0,12					158	0,09	
164	0,22							
Cxx.121	81	0,13	81	0,09	91	0,01		
	91	0,10	91	0,09	91	0,01		
			93	0,09	93	0,01		
	95	0,00	95	0,14	95	0,04	95	0,04
	97	0,03			97	0,15	97	0,76
	99	0,04	99	0,09	99	0,11		
	101	0,24	101	0,23	101	0,06		
	103	0,01	103	0,09	103	0,34	103	0,07
	105	0,45	105	0,09	105	0,07	105	0,04
	107	0,002	107	0,05	107	0,13	107	0,02
			109	0,05	109	0,08	109	0,06
					111	0,01	111	0,02
					113	0,01		

LOKUS	Volkovi (N = 318)		Lisice (N = 11)		Psi (N = 52)		Šakali (N = 28)	
	A	F	A	F	A	F	A	F
FH210	212	0,01			212	0,03	212	0,07
	216	0,22	216	0,45				
	220	0,04	220	0,32	220	0,01	220	0,17
	224	0,03	224	0,23	224	0,22	224	0,17
	228	0,44			228	0,31	228	0,59
	232	0,26			232	0,13		
	236	0,005			236	0,31		
FH2145			246	0,10				
			247	0,25				
			249	0,15				
			251	0,25				
			252	0,20				
			254	0,05				
					272	0,10		
					276	0,10		
					278	0,01		
					280	0,03		
	281	0,18			281	0,02	281	0,07
	282	0,62			282	0,28		
	283	0,03			283	0,04		
					284	0,02		
	285	0,03			285	0,01		
	286	0,02			286	0,11		
	287	0,05			287	0,01		
288	0,01							
				289	0,02			
290	0,03			290	0,13			
				291	0,02			
294	0,04			294	0,07			
				298	0,02			
				302	0,02			
						293	0,04	

PRILOGA D

Uspešnost genotipizacije in ocene napak za referenčne vzorce.

Amplification success rates and genotyping errors.

Uspešnost genotipizacije za referenčne vzorce. Povpr. št. amplifikacij - povprečno število amplifikacij na vzorec; povprečno št. uspešnih amp - povprečno število uspešnih amplifikacij na vzorec; uspešnost amplifikacije % - delež uspešnih amplifikacij; Qi – indeks kvalitete vzorca (Miquel in sod., 2006); ID, A, B, C – posamezni multipleksi;

	povpr. št. amplifikacij	povprečno št. uspešnih amp	uspešnost amplifikacije [%]	Qi
neinvaz. ref. vzorci_multi ID	3,71	3,29	88,79	0,89
neinvaz. ref. vzorci_multi A	3,82	3,31	86,62	0,87
neinvaz. ref. vzorci_multi B	3,97	3,41	85,80	0,87
neinvaz. ref. vzorci_multi C	3,88	3,37	86,98	0,89
tkivo, kri, bris ustne sluznice_multi ID	1,81	1,76	97,16	0,98
tkivo, kri, bris ustne sluznic_multi A	1,76	1,72	97,35	0,98
tkivo, kri, bris ustne sluznic_multi B	1,72	1,67	97,12	0,98
tkivo, kri, bris ustne sluznic_multi C	1,77	1,72	97,08	0,98
vsi ref. vzorci_multi ID	2,23	2,10	94,03	0,96
vsi ref. vzorci_multi A	2,25	2,10	93,01	0,96
vsi ref. vzorci_multi B	2,27	2,09	92,31	0,95
vsi ref. vzorci_multi C	2,32	2,15	92,68	0,95
skupaj (vsi ref. vzorci, vsi multipleksi)	2,28	2,12	93,07	0,96

Ocena napak za posamezne lokuse. ADO – allelic dropout (izpad alelov)

tip vzorcev	ADO %
tkivo	0,39
kri	0,88
ustna sluznica	1,85
<hr/>	
vzorci z dobro kvaliteto DNA	0,47
razpadajoča trupla	5,39
dlaka	3,93
slina s kadavrov	2,94
iztrebki	3,20
urin	5,18
<hr/>	
vzorci s slabšo kvaliteto DNA	4,13
ref. vzorci skupaj	1,35

Ocena napak za posamezne lokuse in tipe vzorcev. FA – lažni aleli;

tip vzorca	lokus	FA %
kri*	INU055	20,00
bris ustne sluznice	CPH22	2,08
razpadajoče truplo	AHTh260	1,28
razpadajoče truplo	REN162C04	1,28
razpadajoče truplo	INU030	1,28
razpadajoče truplo	INRA21	1,28
razpadajoče truplo	FH2010	1,28
<hr/>		
skupaj		0,02

*n_(kri) = 5

PRILOGA E

Ocena frekvenc pojavljanja ničelnih alelov.

Estimation of null allele frequency.

PRILOGA E1

Vrednosti odklonov informacijskega kriterija (Δ DIC) za modele metode IIM (individual inbreeding model).

Values of DIC for models of IIM.

model	SZ Dinaridi	Dinaridi
nfb	0	0
fb	1,41	33,03
nb	72,80	133,01
b	81,22	233,33
nf	196,41	207,62
n	271,00	336,56
null	/	/
f	/	/

*n – ničelni aleli, f – parjenje v sokrvju, b – napake pri genotipizaciji

PRILOGA E2

Ocene frekvenc pojavljanja ničelnih alelov na vsakem od lokusov po metodah PIM in IIM za model nfb (n – ničelni aleli, f – parjenje v sokrvju, b – napake pri genotipizaciji).

Null allele frequencies for each locus estimated by PIM and IIM for nfb model for the whole Dinaric population and NW part of the population.

lokus	frekv. ničelnih alelov-S Dinaridi; nfb-IIM	frekv. ničelnih alelov-S Dinaridi; PIM modelu	SE - PIM	frekv. ničelnih alelov-celi Dinaridi; nfb-IIM	frekv. ničelnih alelov-celi Dinaridi; PIM modelu	SE - PIM
AHT137**‡	0,000	0,000	0,000	0,001	0,012	0,011
AHT260*†	0,000	0,000	0,000	0,001	0,009	0,012
AHTk211 ‡	0,004	0,030	0,030	0,020	0,058	0,022
AHTk253*	0,001	0,015	0,022	0,002	0,017	0,016
C09_250 †	0,001	0,000	0,000	0,001	0,004	0,013
C20_253	0,001	0,000	0,000	0,001	0,011	0,013
CPH12	0,001	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
CPH2**†	0,001	0,009	0,013	0,003	0,011	0,012
CPH22	0,001	0,000	0,000	0,002	0,019	0,016
CPH4**‡	0,001	0,011	0,017	0,003	0,019	0,014
CPH5	0,001	0,000	0,000	0,006	0,030	0,017
CPH6*†	0,002	0,010	0,021	0,002	0,000	0,000
CPH7	0,001	0,000	0,000	0,002	0,020	0,016
CPH8 ‡	0,002	0,000	0,000	0,052	0,075	0,022
CPH9 †	0,001	0,007	0,016	0,003	0,023	0,014
Cxx_121 †	0,001	0,007	0,020	0,024	0,045	0,018
Cxx_123*	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001	0,007
CXX279	0,001	0,000	0,000	0,005	0,014	0,016
FH2004**‡	0,049	0,074	0,020	0,091	0,110	0,017
FH2010**	0,001	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
FH2054	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
FH2088	0,001	0,008	0,013	0,002	0,014	0,015
FH2096 ‡	0,005	0,010	0,032	0,024	0,051	0,032
FH2137**‡	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
FH2145**‡	0,001	0,014	0,023	0,018	0,062	0,021
FH2848*	0,001	0,000	0,000	0,001	0,004	0,017
INRA21*	0,001	0,000	0,000	0,002	0,022	0,016
INU030 †	0,001	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
INU055 ‡	0,001	0,025	0,018	0,003	0,027	0,014
REN162C04	0,001	0,017	0,018	0,001	0,009	0,011
REN169D01 †	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
REN169O18**‡	0,005	0,045	0,019	0,007	0,044	0,015
REN247M23*†	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
REN54P11**†	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
VWF**†	0,000	0,000	0,000	0,001	0,007	0,013

* odstopanje od HWE za S dinarski del populacije, ** odstopanje od HWE za S dinarski del populacije po Holm-Bonferroni korekciji, † odstopanje od HWE za celo dinarsko populacijo, ‡ odstopanje od HWE po Holm-Bonferroni korekciji za celo dinarsko populacijo;

PRILOGA E3

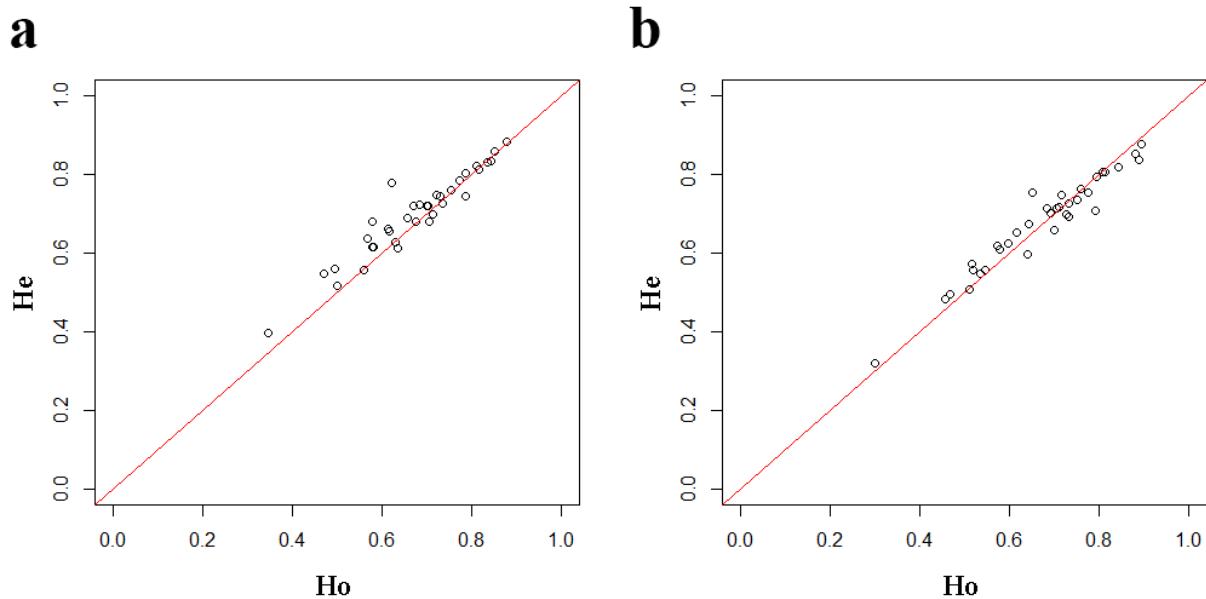
S programom Micro-checker ocenjene frekvence ničelnih alelov.**Estimation of null allele frequencies using program Micro-checker.**

Lokus	celi Dinaridi				Slovenija in Gorski Kotar			
	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
CPH9	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
CPH12	-0,02	-0,02	-0,02	0,03	-0,03	-0,03	-0,02	0,02
C20.253	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
C09.250	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
FH2010	0,01	0,00	0,00	0,04	0,03	0,02	0,02	0,06
CPH5	0,03	0,03	0,02	0,04	-0,01	-0,01	0,00	0,00
CPH7	0,03	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
Cxx.121	0,03	0,04	0,03	0,05	0,00	0,01	0,00	0,04
FH2137	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	0,00
CPH22	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
VWF	-0,01	-0,01	0,00	0,00	-0,02	-0,02	-0,02	0,00
Cxx.123	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
CPH2	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00	0,00
FH2004	0,10	0,11	0,09	0,10	0,07	0,07	0,06	0,08
FH2088	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
FH2096	0,07	0,07	0,04	0,06	0,03	0,03	0,02	0,06
CPH6	0,03	0,02	0,01	0,04	0,03	0,03	0,02	0,06
CPH4	-0,02	-0,01	-0,01	0,04	-0,04	-0,03	-0,02	0,04
REN169O18	0,05	0,06	0,04	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04
REN54P11	0,00	0,00	0,00	0,03	0,04	0,03	0,02	0,05
INRA21	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02
AHT137	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,02	-0,02	-0,01	0,00
REN169D01	-0,03	-0,03	-0,02	0,03	-0,06	-0,06	-0,05	0,02
AHTk253	0,01	0,01	0,01	0,08	0,02	0,02	0,02	0,09
FH2848	0,01	0,00	0,00	0,10	-0,01	-0,01	-0,01	0,09
REN162C04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
REN247M23	0,00	-0,01	0,00	0,10	-0,03	-0,03	-0,03	0,08
INU055	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
AHTh260	0,00	0,00	0,00	0,05	-0,02	-0,02	-0,02	0,06
INU030	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,04
AHTk211	0,07	0,08	0,05	0,07	0,04	0,04	0,03	0,06
CPH8	0,08	0,08	0,06	0,10	0,04	0,04	0,03	0,06
CXX279	0,02	0,02	0,02	0,03	-0,01	-0,01	-0,01	0,03
FH2145	0,07	0,06	0,04	0,17	0,04	0,03	0,02	0,12
FH2054	-0,02	-0,02	-0,01	0,02	-0,04	-0,03	-0,03	0,03

PRILOGA F

Razmerje med pričakovano in opaženo heterozigotnostjo za 35 lokusov analiziranih za celotno Dinarsko populacijo (a) in za SZ dinarsko subpopulacijo (b).

Ratio between H_e and H_o for 35 loci analyzed for the whole Dinaric population and the NW Dinaric subpopulation.



PRILOGA G

Mere genetske raznolikosti za celotno dinarsko populacijo in SZ dinarsko subpopulacijo

Genetic diversity indexes for the Dinaric population and NW Dinaric subpopulation

PRILOGA G1

Mere genske pestrosti za dinarsko populacijo: A - število alelov; Ae - efektivno število alelov; Ho - opažena heterozigotnost; He - pričakovana heterozigotnost; P - vrednosti HW testa; Fis - koeficient sokrvja, kot nenaključno parjenje znotraj subpopulacij; PI - verjetnost, da imata dva nesorodna osebkta identičen genotip; Pisib - verjetnost, da imajo bratje/sestre identične genotipe.

Genetic diversity indexes for the Dinaric population: A - number of alleles, Ae - effective number of alleles, Ho - observed heterozygosity, He - expected heterozygosity, P values of Hardy-Weinberg test, Fis - Wright's coefficient of inbreeding, PI - probability of identity, Pisib - probability of identity between sibs.

	A	Ae	He	Ho	P vrednost HW testa	Fis	GW-indeks	PI	Pisib
AHT137**	12	5,98	0,83	0,83	0,00	0,00	0,45	0,05	0,35
AHTh260*	14	7,36	0,86	0,85	0,02	0,01	/	0,04	0,33
AHTk211*	6	2,18	0,55	0,47	0,02	0,14	0,54	0,26	0,54
AHTk253	8	4,01	0,75	0,73	0,06	0,02	0,53	0,11	0,40
C09.250*	7	4,80	0,79	0,77	0,05	0,02	0,44	0,08	0,38
C20.253*	7	5,09	0,80	0,79	0,03	0,03	0,42	0,07	0,36
CPH12	5	3,11	0,68	0,71	0,17	-0,04	0,53	0,17	0,45
CPH2**	10	5,37	0,81	0,82	0,00	0,00	/	0,06	0,36
CPH22*	4	2,88	0,65	0,62	0,04	0,06	0,57	0,18	0,47
CPH4**	6	3,47	0,70	0,71	0,00	-0,02	/	0,14	0,44
CPH5	5	3,75	0,72	0,68	0,32	0,06	0,33	0,12	0,42
CPH6*	8	2,06	0,52	0,50	0,00	0,04	/	0,26	0,56
CPH7	5	2,59	0,62	0,58	0,20	0,06	0,55	0,21	0,50
CPH8**	7	3,24	0,68	0,58	0,00	0,15	0,47	0,16	0,45
CPH9*	7	2,65	0,62	0,58	0,01	0,06	0,36	0,19	0,49
Cxx.121*	9	3,47	0,72	0,67	0,01	0,07	0,42	0,12	0,42
Cxx.123	8	5,67	0,82	0,81	0,37	0,02	0,28	0,06	0,35
CXX279	10	3,97	0,75	0,72	0,30	0,04	0,38	0,10	0,40
FH2004**	-	-	-	-	< 0,00001	-	-	-	-
FH2010	7	3,25	0,68	0,67	0,18	0,01	0,28	0,16	0,45
FH2054	7	2,64	0,61	0,63	0,28	-0,03	0,27	0,19	0,49
FH2088	8	3,65	0,72	0,70	0,26	0,02	0,20	0,12	0,42
FH2096*	4	1,68	0,40	0,34	0,01	0,13	0,31	0,41	0,65
FH2137**	11	8,51	0,88	0,88	0,00	0,01	/	0,03	0,31
FH2145**	9	2,65	0,56	0,49	0,00	0,12	/	0,22	0,53
FH2848*	6	4,39	0,76	0,75	0,03	0,01	0,53	0,10	0,39
INRA21	5	2,99	0,66	0,61	0,06	0,08	0,54	0,18	0,46
INU030*	6	3,55	0,72	0,70	0,06	0,03	0,54	0,12	0,42
INU055**	5	3,17	0,69	0,66	0,00	0,05	0,54	0,14	0,44
REN162C04	8	2,17	0,56	0,56	0,46	0,00	0,37	0,24	0,53
REN169D01*	8	4,12	0,75	0,79	0,03	-0,05	0,43	0,11	0,40
REN169O18**	8	2,71	0,64	0,57	0,00	0,11	0,48	0,17	0,47
REN247M23	7	6,68	0,83	0,84	0,06	-0,01	0,53	0,05	0,35
RENS4P11**	6	2,68	0,63	0,63	0,01	0,00	0,47	0,17	0,48
VWF	6	3,70	0,73	0,73	0,29	-0,01	0,16	0,12	0,42
povprečje	7,32	3,85	0,70	0,68	/	0,03	0,43	/	/
st.dev	2,23	1,55	0,11	0,12	/	0,05	0,11	/	/
skupen PI in Pisib								1,0E-31	4,1E-13
skupen PI in Pisib za multipleks ID								2,70E-09	2,79E-04

*Lokusi, ki odstopajo od HW ravnovesja, ** lokusi, ki odstopajo od HW ravnovesja po narejeni Holm-Bonferronijevi korekciji; S sivo so obarvani lokusi, ki smo jih uporabili za individualno prepoznavanje osebkov v multipleksu ID.

PRILOGA G2

Mere genske pestrosti za SZ dinarsko subpopulacijo: A - število alelov; Ae - efektivno število alelov; Ho - opažena heterozigotnost; He - pričakovana heterozigotnost; P - vrednosti HW testa; Fis - koeficient sokrvja, kot nenaključno parjenje znotraj subpopulacij; GW indeks - Garza-Williamsonov indeks

Genetic diversity indexes for the NW Dinaric subpopulation: A - number of alleles, Ae - effective number of alleles, Ho - observed heterozygosity, He - expected heterozygosity, P values of Hardy-Weinberg test; Fis - Wright's coefficient of inbreeding, GW index - Garza-Williamson index.

Lokus	A	Ae	He	Ho	P vrednost HW testa	Fis	GW- indeks
AHT137*	9	5,45	0,82	0,84	0,00	-0,03	0,36
AHTh260**	12	7,06	0,85	0,88	0,01	-0,03	/
AHTk211	4	2,27	0,56	0,52	0,24	0,08	0,44
AHTk253**	7	4,12	0,75	0,72	0,01	0,05	0,37
C09.250*	6	4,22	0,76	0,76	0,05	0,01	0,55
C20.253	7	4,84	0,79	0,79	0,07	0,00	0,37
CPH12	5	3,28	0,69	0,73	0,16	-0,05	0,45
CPH2**	9	5,11	0,80	0,81	0,00	-0,01	/
CPH22	4	2,65	0,62	0,60	0,07	0,05	0,57
CPH4**	6	2,96	0,66	0,70	0,00	-0,06	/
CPH5	5	3,67	0,72	0,73	0,95	-0,01	0,33
CPH6*	5	1,96	0,49	0,47	0,01	0,06	/
CPH7	5	2,28	0,56	0,55	0,71	0,02	0,56
CPH8*	7	2,65	0,62	0,57	0,05	0,07	0,37
CPH9	7	2,22	0,55	0,54	0,19	0,03	0,28
Cxx.121*	8	3,52	0,72	0,71	0,02	0,01	0,32
Cxx.123*	8	5,20	0,81	0,81	0,04	0,00	0,28
CXX279	10	3,81	0,74	0,75	0,11	-0,02	0,48
FH2004**	-	-	-	-	< 0,0000	-	-
FH2010*	6	3,16	0,67	0,64	0,01	0,05	0,29
FH2054	7	2,52	0,60	0,64	0,29	-0,07	0,28
FH2088	6	3,40	0,70	0,69	0,15	0,02	0,15
FH2096	3	1,03	0,32	0,30	0,34	0,07	0,23
FH2137**	9	8,02	0,88	0,89	0,00	-0,02	/
FH2145*	7	2,05	0,48	0,46	0,02	0,06	/
FH2848*	6	4,37	0,75	0,77	0,01	-0,02	0,55
INRA21*	5	2,88	0,65	0,62	0,02	0,06	0,56
INU030	6	3,54	0,72	0,71	0,06	0,02	0,55
INU055	5	3,46	0,71	0,68	0,06	0,05	0,45
REN162C04*	8	1,99	0,51	0,51	0,01	0,00	0,42
REN169D01	8	3,46	0,71	0,79	0,14	-0,12	0,42
REN169O18*	7	2,36	0,57	0,52	0,01	0,10	0,47
REN247M23*	7	6,80	0,84	0,89	0,02	-0,06	0,47
REN54P11*	5	2,55	0,61	0,58	0,00	0,05	0,56
VWF**	6	3,30	0,70	0,73	0,00	-0,04	0,16
povprečje	6,62	3,59	0,67	0,67	/	0,01	0,40
st.dev.	1,86	1,55	0,12	0,14	/	0,05	0,12

*Lokusi, ki odstopajo od HW ravnovesja, ** lokusi, ki odstopajo od HW ravnovesja po narejeni Holm-Bonferronijevi korekciji

PRILOGA H

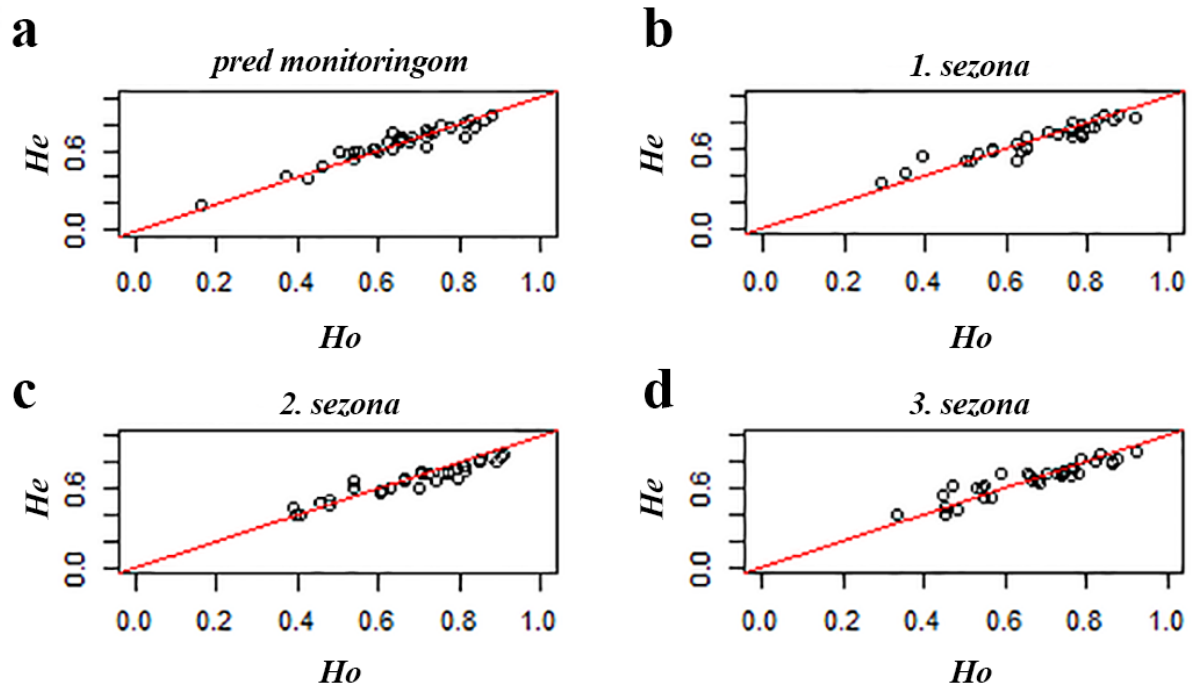
Primerjava genetske pestrosti SZ dinarske subpopulacije z drugimi populacijami.
Comparison of the genetic diversity of the NW Dinaric subpopulation to other European wolf populations.

Populacija/območje	Št. osebkov	Št. analiziranih lokusov/št. skupnih lokusov	Indeksi genetske pestrosti poročani v posamezni študiji			Indeksi genetske pestrosti preračunani za lokuse skupne z referenčno populacijo			Indeksi genetske pestrosti, izračunane z metodo vzorčenja iz referenčne populacije			Relativna genetska pestrost posamezne populacije glede na referenčno populacijo			Lokusi skupni z referenčno populacijo
			A	He	Ho	A (s.e.)	He (s.e.)	Ho (s.e.)	res.A (s.e.)	res.He (s.e.)	res.Ho (s.e.)	Ar (s.e.)	Her (s.e.)	Hor (s.e.)	
Skandinavija (1991 - 2001)	87	31/8	3,52	0,55	0,58	4,13 (0,4)	0,69 (0,03)	0,72 (0,03)	5,96 (0,73)	0,64 (0,08)	0,75 (0,04)	0,69 (0,11)	1,08 (0,15)	0,96 (0,07)	C09.250, Cxx.121, Cxx.123, FH2010, FH2054, FH2088, FH2137, VWF
Skandinavija (1940 - 1980)	8,5	15/6	3,1	0,52	0,45	3,33 (0,33)	0,57 (0,04)	0,58 (0,1)	3,66 (0,61)	0,51 (0,11)	0,68 (0,1)	0,91 (0,18)	1,12 (0,25)	0,86 (0,2)	C09.250, C20.253, FH2054, FH2088, FH2096, VWF
Italija	282	12/10	5,8	0,58	0,56	5,8 (1,06)	0,56 (0,07)	0,54 (0,07)	6,3 (0,58)	0,69 (0,05)	0,69 (0,06)	0,92 (0,19)	0,81 (0,12)	0,78 (0,12)	C09.250, C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, CPH5, CPH8, FH2088, FH2096, FH2137
Iberski polotok	208	42/17	6,4	0,62	NA	6,47 (0,7)	0,63 (0,04)	NA	6,76 (0,45)	0,69 (0,02)	0,68 (0,03)	0,96 (0,12)	0,91 (0,07)	NA	AHT137, AHTh260, AHTk211, AHTk253, C20.253, FH2010, FH2054, FH2848, INRA21, INU030, INU055, REN162C04, REN169D01, REN169O18, REN247M23, REN54P11, VWF
Dinarid - Lika	34	34/34	5,91	0,69	0,69	5,91 (0,27)	0,69 (0,02)	0,7 (0,02)	5,59 (0,27)	0,64 (0,03)	0,67 (0,03)	1,06 (0,07)	1,06 (0,05)	1,04 (0,06)	CPH9, CPH12, C20.253, C09.250, FH2010, CPH5, CPH7, Cxx.121, FH2137, CPH22, VWF, Cxx.123, CPH2, FH2088, FH2096, CPH6, CPH4, REN169O18, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTk253, FH2848, REN162C04, REN247M23, INU055, AHTh260, INU030, AHTk211, CPH8, CXX279, FH2145, FH2054
S Dinaridi - referenčna populacija	199	34/34	6,62	0,67	0,67	6,62 (0,32)	0,67 (0,02)	0,67 (0,02)	6,18 (0,32)	0,65 (0,03)	0,68 (0,03)	1,07 (0,08)	1,03 (0,06)	1 (0,05)	CPH9, CPH12, C20.253, C09.250, FH2010, CPH5, CPH7, Cxx.121, FH2137, CPH22, VWF, Cxx.123, CPH2, FH2088, FH2096, CPH6, CPH4, REN169O18, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTk253, FH2848, REN162C04, REN247M23, INU055, AHTh260, INU030, AHTk211, CPH8, CXX279, FH2145, FH2054
Dinaridi - Dalmacija	56	34/34	6,47	0,7	0,68	6,47 (0,3)	0,7 (0,02)	0,68 (0,02)	5,75 (0,28)	0,65 (0,03)	0,67 (0,03)	1,12 (0,07)	1,09 (0,05)	1,01 (0,05)	CPH9, CPH12, C20.253, C09.250, FH2010, CPH5, CPH7, Cxx.121, FH2137, CPH22, VWF, Cxx.123, CPH2, FH2088, FH2096, CPH6, CPH4, REN169O18, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTk253, FH2848, REN162C04, REN247M23, INU055, AHTh260, INU030, AHTk211, CPH8, CXX279, FH2145, FH2054
Beloveški gozd, Poljska	35	20/8	6,85	0,73		6,38 (0,53)	0,72 (0,01)	NA	5,38 (0,76)	0,58 (0,08)	0,7 (0,06)	1,19 (0,19)	1,25 (0,18)	NA	CPH2, CPH4, CPH6, CPH7, CPH8, FH2010, FH2054, FH2137
Finska (2002 - 2004)	48	10/7	5,4	0,69	0,68	5,86 (0,34)	0,7 (0,03)	0,66 (0,03)	4,89 (0,77)	0,56 (0,1)	0,69 (0,08)	1,2 (0,2)	1,25 (0,22)	0,96 (0,12)	C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, CPH8, FH2088, FH2096
Finska (1996 - 1998)	31	10/7	5,6	0,66	0,71	5,57 (0,48)	0,66 (0,03)	0,67 (0,04)	4,65 (0,73)	0,56 (0,1)	0,69 (0,08)	1,2 (0,22)	1,19 (0,22)	0,97 (0,13)	C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, CPH8, FH2088, FH2096
Finska (2007-2009)	33	17/13	6	0,68	0,61	6,08 (0,46)	0,68 (0,03)	0,61 (0,04)	5,02 (0,49)	0,6 (0,06)	0,68 (0,05)	1,21 (0,15)	1,13 (0,12)	0,91 (0,09)	AHT137, AHTk211, C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, CPH8, Cxx.121, CXX279, FH2088, FH2096, INRA21, REN169O18
Archangelsk, Rusija	14	10/7	4,7	0,64	0,63	5 (0,44)	0,64 (0,04)	0,66 (0,06)	4,11 (0,66)	0,55 (0,1)	0,69 (0,09)	1,22 (0,22)	1,18 (0,22)	0,96 (0,15)	C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, CPH8, FH2088, FH2096
Finska (1999 - 2001)	39	10/7	5,3	0,66	0,71	5,86 (0,4)	0,68 (0,03)	0,72 (0,03)	4,78 (0,76)	0,56 (0,1)	0,69 (0,08)	1,23 (0,21)	1,22 (0,22)	1,04 (0,13)	C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, CPH8, FH2088, FH2096
Estonija, Latvija (skupina D)	37	16/9	6,38	0,65	0,7	6,11 (0,45)	0,65 (0,02)	0,7 (0,02)	4,91 (0,61)	0,58 (0,08)	0,69 (0,06)	1,25 (0,18)	1,12 (0,16)	1,02 (0,1)	C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, FH2010, FH2054, FH2088, FH2096, VWF
Finska	20,7	15/6	6,4	0,72	0,69	5,5 (0,43)	0,7 (0,03)	0,69 (0,05)	4,31 (0,72)	0,53 (0,11)	0,68 (0,09)	1,27 (0,23)	1,33 (0,28)	1,01 (0,15)	C09.250, C20.253, FH2054, FH2088, FH2096, VWF
Iberski polotok	47	13/4	5,5	0,65	0,53	5,75 (0,95)	0,64 (0,07)	0,59 (0,05)	4,51 (0,93)	0,51 (0,13)	0,71 (0,08)	1,28 (0,34)	1,26 (0,35)	0,82 (0,12)	CPH5, CPH9, FH2010, FH2054
Dinaridi	152	12/10	7,3	0,72	0,66	7,2 (0,85)	0,73 (0,04)	0,66 (0,03)	5,63 (0,69)	0,62 (0,08)	0,71 (0,06)	1,28 (0,22)	1,17 (0,16)	0,92 (0,09)	C09.250, C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, CPH5, CPH8, FH2088, FH2096, FH2137
Karelja, Rusija	37	17/13	6,29	0,73	0,69	6,54 (0,54)	0,74 (0,04)	0,71 (0,04)	5,1 (0,5)	0,61 (0,06)	0,68 (0,05)	1,28 (0,16)	1,22 (0,13)	1,05 (0,1)	AHT137, AHTk211, C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, CPH8, Cxx.121, CXX279, FH2088, FH2096, INRA21, REN169O18
Karelja	29	10/7	5,7	0,71	0,66	6 (0,53)	0,72 (0,05)	0,71 (0,05)	4,62 (0,73)	0,56 (0,1)	0,69 (0,08)	1,3 (0,24)	1,29 (0,25)	1,02 (0,14)	C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, CPH8, FH2088, FH2096
Dinaridi	294	34/34	9,68	0,7	0,68	9,68 (0,66)	0,7 (0,02)	0,68 (0,02)	6,62 (0,32)	0,67 (0,02)	0,66 (0,02)	1,46 (0,12)	1,04 (0,04)	1,02 (0,05)	CPH9, CPH12, C20.253, C09.250, FH2010, CPH5, CPH7, Cxx.121, FH2137, CPH22, VWF, Cxx.123, CPH2, FH2088, FH2096, CPH6, CPH4, REN169O18, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTk253, FH2848, REN162C04, REN247M23, INU055, AHTh260, INU030, AHTk211, CPH8, CXX279, FH2145, FH2054
Estonija, Latvija (skupina A)	52	16/9	7,63	0,72	0,76	7,67 (0,8)	0,74 (0,02)	0,77 (0,03)	5,08 (0,63)	0,58 (0,08)	0,69 (0,06)	1,51 (0,24)	1,28 (0,17)	1,13 (0,11)	C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, FH2010, FH2054, FH2088, FH2096, VWF
Estonija, Latvija (skupina B)	39	16/9	7,31	0,75	0,73	7,56 (0,44)	0,78 (0,01)	0,7 (0,04)	4,93 (0,62)	0,58 (0,08)	0,69 (0,06)	1,53 (0,21)	1,35 (0,18)	1,02 (0,11)	C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, FH2010, FH2054, FH2088, FH2096, VWF
Poljska	457	11/6	10,27	0,73	0,53	10,17 (1,94)	0,74 (0,04)	0,54 (0,04)	6,17 (0,79)	0,63 (0,08)	0,62 (0,08)	1,65 (0,38)	1,18 (0,16)	0,87 (0,14)	FH2010, FH2054, FH2088, FH2096, FH2137, VWF
Estonijaa, Latvija (skupina C)	38	16/9	10,81	0,79	0,8	10,56 (1,17)	0,79 (0,02)	0,8 (0,01)	4,91 (0,62)	0,58 (0,08)	0,69 (0,06)	2,15 (0,36)	1,37 (0,19)	1,17 (0,11)	C20.253, CPH12, CPH2, CPH4, FH2010, FH2054, FH2088, FH2096, VWF
Rusija	47	13/4	8,9	0,78	0,66	10,25 (1,93)	0,77 (0,05)	0,69 (0,06)	4,5 (0,93)	0,51 (0,13)	0,71 (0,08)	2,28 (0,64)	1,51 (0,4)	0,97 (0,14)	CPH5, CPH9, FH2010, FH2054
Bolgarija	102	14/7	8,5	0,73	0,65	NA	0,75 (0,03)	0,69 (0,03)	5,07 (0,72)	0,56 (0,1)	0,67 (0,08)	NA	1,35 (0,24)	1,03 (0,13)	C09.250, C20.253, FH2010, FH2054, FH2088, FH2096, VWF
Bolgarija (nesorodni osebki)	62	14/7	8,18	0,73	0,63	NA	0,75 (0,02)	0,67 (0,03)	4,9 (0,69)	0,55 (0,1)	0,67 (0,08)	NA	1,35 (0,24)	1 (0,13)	C09.250, C20.253, FH2010, FH2054, FH2088, FH2096, VWF
Italija	107	18/15	8,39	0,51	NA	NA	0,48 (0,05)	NA	5,22 (0,42)	0,59 (0,05)	0,65 (0,04)	NA	0,81 (0,11)	NA	C09.250, C20.253, CPH12, CPH2, CPH22, CPH4, CPH5, CPH6, CPH7, CPH8, CPH9, FH2010, FH2088, FH2096, VWF

PRILOGA J

Razmerje med pričakovano in opaženo heterozigotnostjo za posamezno časovno populacijo pred aktivnim spremljanjem volkov in od 2010 do 2013.

Ratio between observed and expected heterozygosity for each of the time populations before intensive population monitoring and during it, cut in three seasons.



PRILOGA K

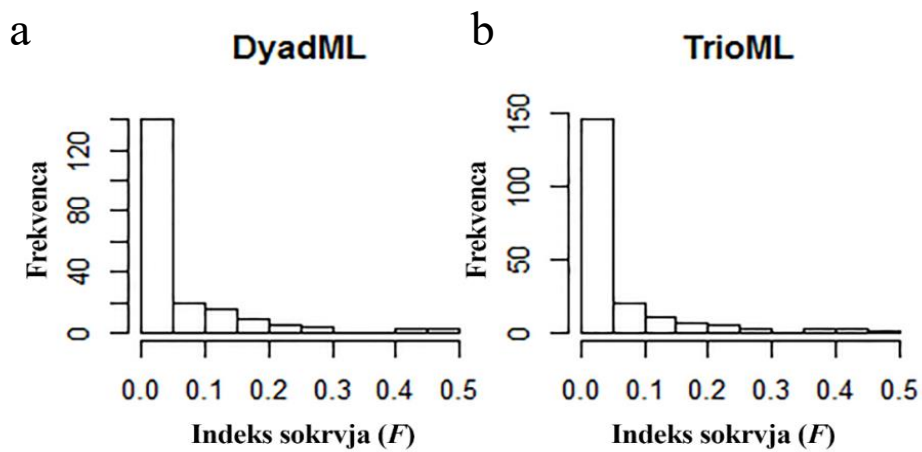
Ocena koeficienta sokrvja F

Estimation of inbreeding coefficient F

PRILOGA K1

Porazdelitev vrednosti koeficienta sokrvja (F), izračunanega po dveh metodah (a - DyadML in b - TrioML).

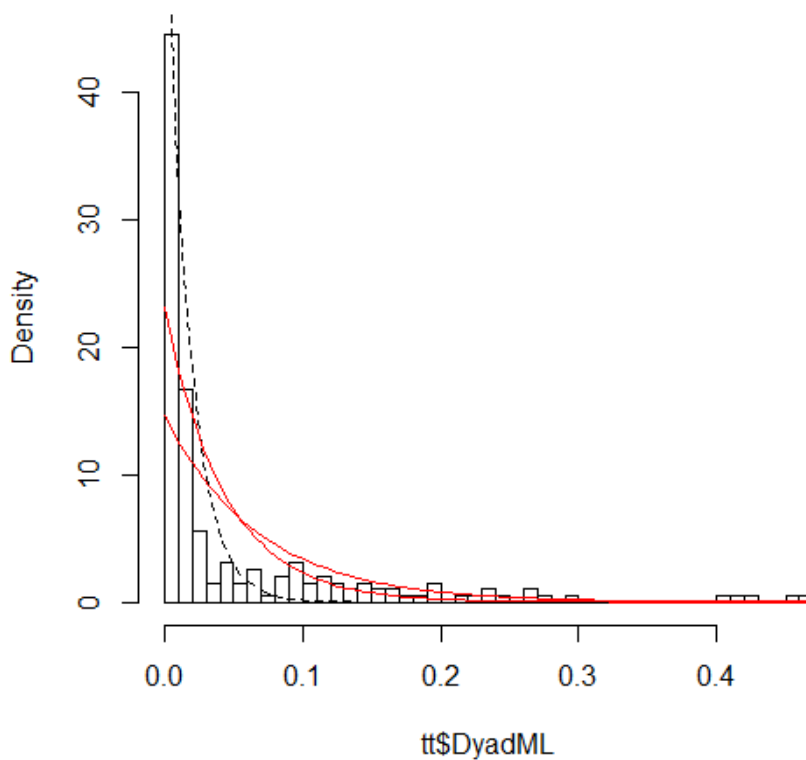
Distribution of values of inbreeding coefficient (F), calculated by two methods (a - DyadML and b - TrioML).



PRILOGA K2

Histogram razporejanja vrednosti koeficienta F_{DyadML} ; črtkano - eksponentna funkcija ($\lambda = 60$) (krivulja ničelne hipoteze); rdeče - interval zaupanja ocenjen iz vzorca s pomočjo metode zankanja.

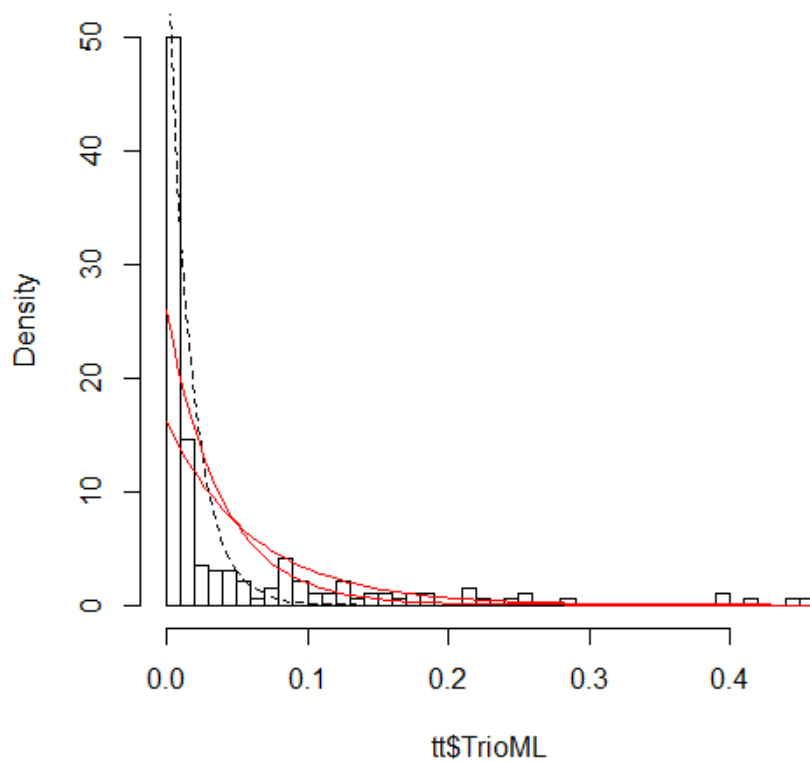
Distribution of values of inbreeding coefficient F calculated by DyadML. Dashed line - exponential function, curve of the null hypothesis ($\lambda = 60$); red lines - confidence interval estimated by bootstrapping method.



PRILOGA K3

Histogram razporejanja vrednosti koeficienta F_{TrioML} ; črtkano - eksponentna funkcija ($\lambda = 60$) (krivulja ničelne hipoteze); rdeče - interval zaupanja ocenjen iz vzorca s pomočjo metode zankanja.

Distribution of values of inbreeding coefficient F calculated by TrioML. Dashed line - exponential function, curve of the null hypothesis ($\lambda = 60$); red lines - confidence interval estimated by bootstrapping method.



PRILOGA L

Ocena efektivne velikosti populacije (N_e) s pripadajočimi intervali zaupanja za posamezne časovne populacije v obdobju od leta 2003 do 2013.

Estimates of effective population size (N_e) with confidence intervals for three time populations between 2010 and 2013 and for time populations between 2001 and 2013 using the method of three- and four-year sliding window.

časovno okno/sezona	časovna populacija	velikost vzorca	N_e	95 % CI
sezona 1	2010 - 2011	51	36,3	34,1-38,8
sezona 2	2011 - 2012	54	27	25,6-28,4
sezona 3	2012 - 2013	50	23	21,7-24,4
4 letno okno	2003-2006	8*	48,6	33,4-84,1
4 letno okno	2004-2007	18*	21,5	18,8-24,9
4 letno okno	2005-2008	25	20,5	18,8-22,3
4 letno okno	2006-2009	19*	35,3	30,3-41,9
4 letno okno	2007-2010	20*	84,1	67,6-109,3
4 letno okno	2008-2011	54	46,6	43,3-50,3
4 letno okno	2009-2012	72	41,4	38,9-44
4 letno okno	2010-2013	73	34,4	32,6-36,4
3 letno okno	2003-2005	2*	/	/
3 letno okno	2004-2006	6*	35,8	23,5-67,5
3 letno okno	2005-2007	12*	13,5	11,4-16
3 letno okno	2006-2008	13*	23,3	19,5-28,2
3 letno okno	2007-2009	6*	/	/
3 letno okno	2008-2010	14*	60,9	47,8-82
3 letno okno	2009-2011	40	35,8	33-38,9
3 letno okno	2010-2012	32	33,7	30,8-37
3 letno okno	2011-2013	41	30	28,1-32,1

*označuje vzorce, za katere imamo v vzorcu premajhno število osebkov za bolj zanesljivo oceno; 95% CI - 95 % interval zaupanja ocenjen z Jackknife metodo.

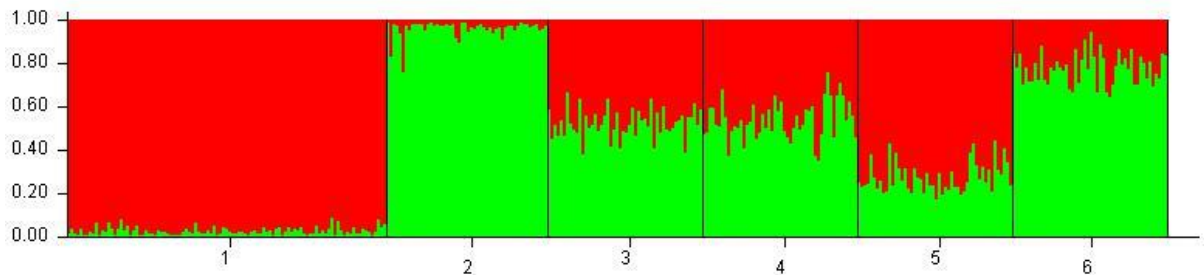
PRILOGA M

Razlikovanje volkov in psov ter prepoznavanje križancev.
Distinction of wolves and dogs and identification of hybrids.

PRILOGA M1

Grafični prikaz dodelitvenega testa (Structure) za simulirane podatke (1 - volkovi, 2 - psi, 3 - križanci *F1* generacije, 4 - križanci *F2* generacije, 5 - povratni križanci z volkom, 6 - povratni križanci s psom).

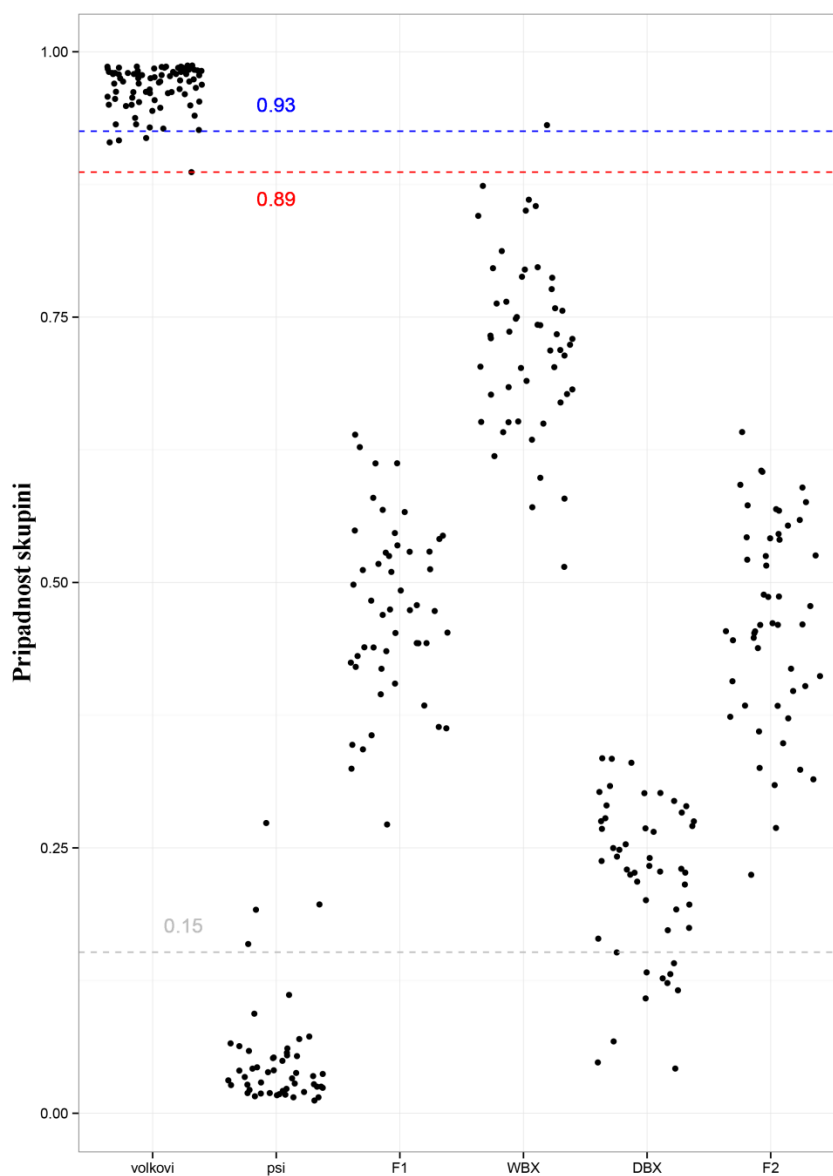
Assignment scores (Structure) for simulated data of wolf, dog and hybrid samples in order to calculate critical values for affiliation to one of the groups (1 - wolves, 2 - dogs, 3 - *F1* hybrids, 4 - *F2* hybrids, 5 - wolf backcrosses, 6 - dog backcrosses).



PRILOGA M2

Razporeditev p vrednosti Structure analize simuliranih podatkov in določitev verjetnosti, da je vzorec volčji. Na grafu so vzorci volkov, psov in simuliranih križancev (prve in druge generacije, povratni križanci z volkom in psom). Siva črtkana črta označuje najvišjo vrednost, da gre še za psa, rdeča črtkana črta označuje najnižjo vrednost, da je vzorec volčji, modra črtkana črta pa označuje 95 % verjetnost, da vzorec pripada volku.

P - values for individual animals from simulated data. In the figure simulated data are organized in groups of wolves, dogs, F1 hybrids and F2 hybrids, and wolf and dog backcrosses. The grey line indicates the highest value when an individual is assigned to dogs, red line indicates the lowest p -value and the blue the p -value of 95 % probability for an individual to be recognized as a wolf.



PRILOGA M3

Vrednosti kvartilov določene s simuliranimi podatki za dodelitev osebkov posamezni skupini.

Values of quartiles determined by simulated data for assignment of specimens to different clusters.

Skupina	Min.	1. kvartil	Mediana	Povprečje	3. kvartil	Maks.
volkovi	0,89	0,96	0,97	0,97	0,98	0,99
povratni križanci z volkom	0,51	0,68	0,73	0,73	0,77	0,93
F1	0,27	0,43	0,47	0,47	0,53	0,64
F2	0,22	0,40	0,46	0,46	0,54	0,64
povratni križanci s psom	0,04	0,17	0,23	0,22	0,28	0,33
psi	0,01	0,02	0,04	0,05	0,06	0,27

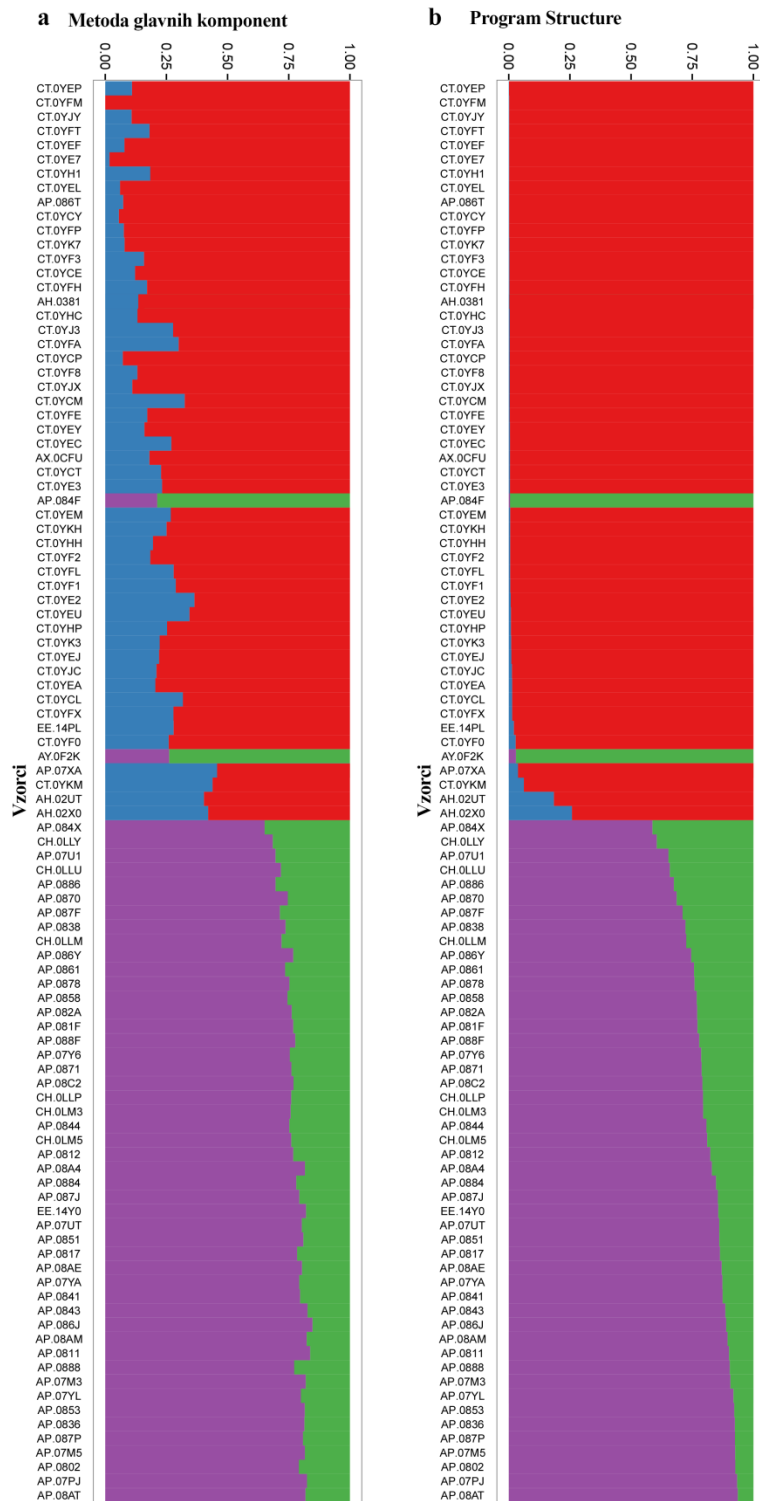
PRILOGA M4

Rezultati PCA in Structure analize za posamezne osebke.

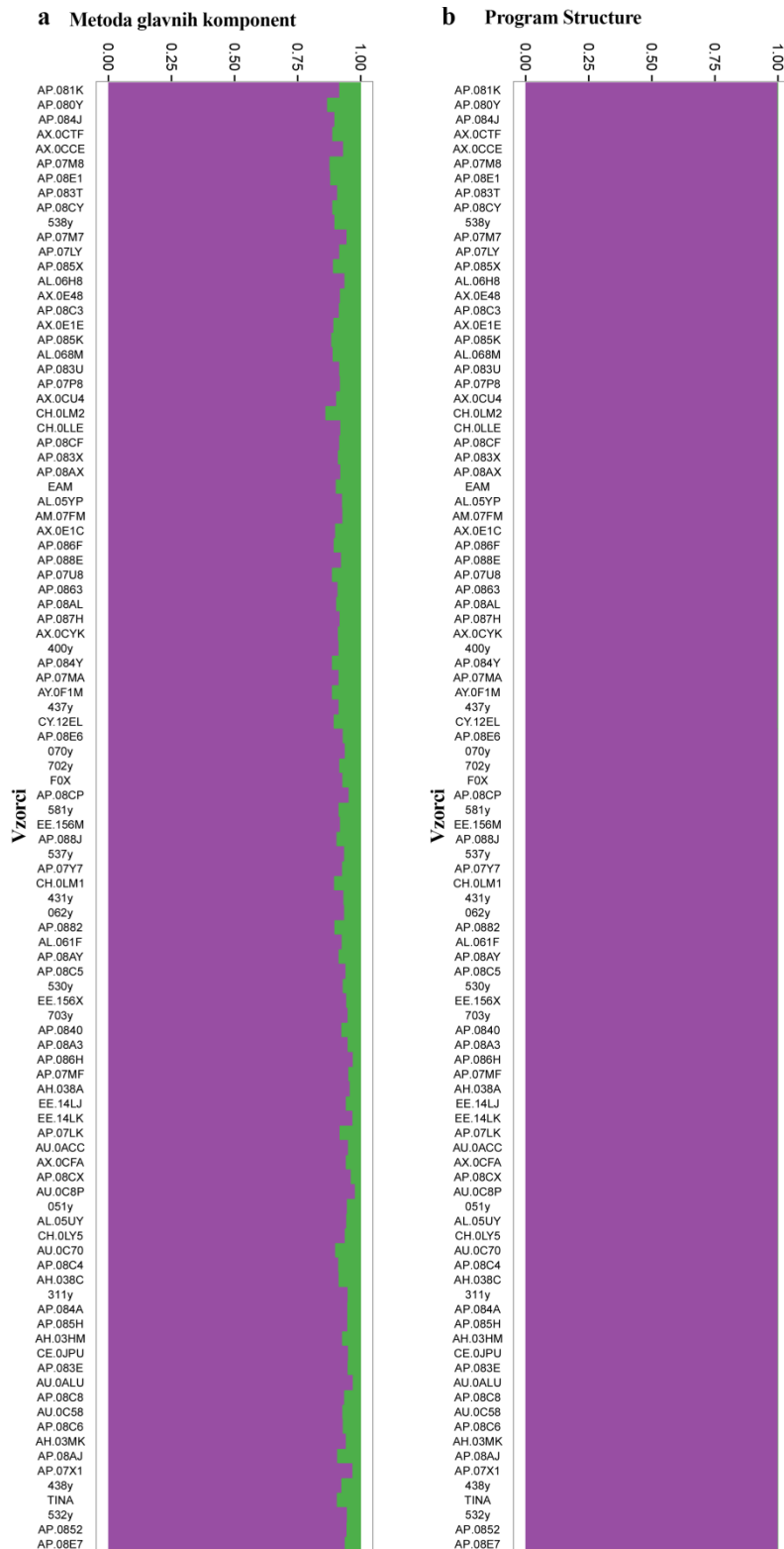
PCA and Structure assignment scores for individual animals.

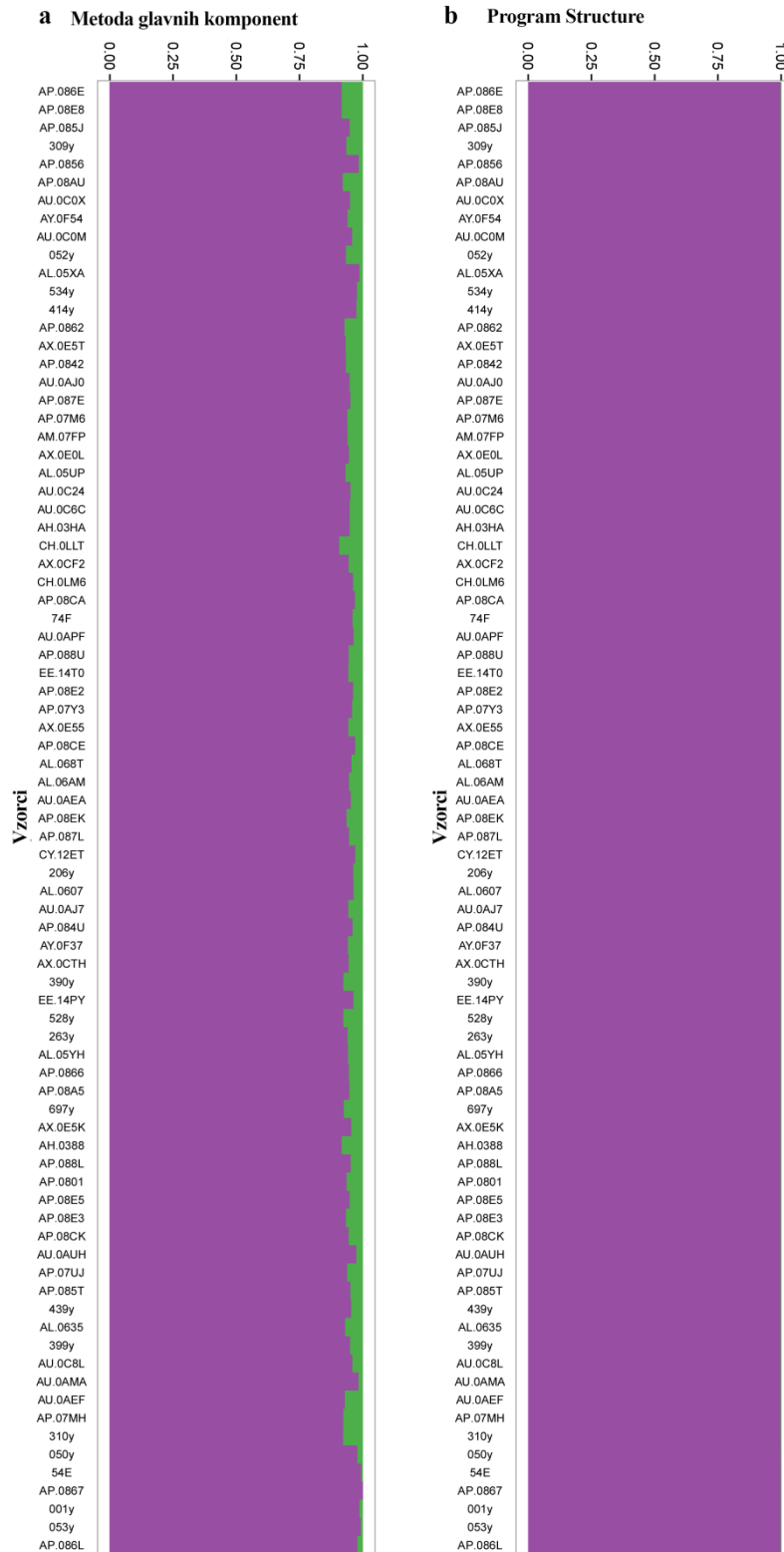
V modro-rdeči barvni kombinaciji so prikazani osebki, ki smo jih v laboratorij prejeli kot pse, v vijolično-zeleni pa kot volkove. Vsak stolpec predstavlja en osebek in oceno koeficienta pripadnosti psom (rdeča in zelena) oziroma volkovom (modra in vijolična). Prepoznavanje posameznih osebkov s tega grafikona je mogoče s prilogo M4.

The blue-red combination shows specimens which were received at the laboratory as dogs, and purple-green as wolves. Each column represents a single specimen and probabilistic assignment to dogs (red and green) and wolves (blue and purple). Individual wolves from this figure can be recognized in Annex M4.









PRILOGA M5

Vzorci, ki smo jih prepoznali kot križance oziroma migrante s pripadajočimi p vrednostmi.

List of samples recognized as wolf-dog hybrids with p values.

Vzorec	Populacija	Študija	Regija	pVolk	Datum
AH.02UT	Psi	Psi	Psi	0,18	/
AH.02X0	Psi	Psi	Psi	0,26	/
AP.084X	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,59	1.5.2009
CH.0LLY	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,61	4.1.2013
AP.07U1	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,65	15.7.2003
CH.0LLU	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,66	17.1.2006
AP.0886	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,67	26.2.2011
AP.0870	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,69	29.10.2010
AP.087F	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,71	27.10.2010
AP.0838	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,72	12.1.2009
CH.0LLM	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,73	19.9.2005
AP.086Y	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,75	11.1.2010
AP.0861	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,76	28.11.2012
AP.0878	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,76	27.10.2010
AP.0858	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,77	24.12.2008
AP.082A	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,77	27.2.2006
AP.081F	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,77	31.12.2007
AP.088F	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,78	16.11.2010
AP.07Y6	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,79	14.12.2003
AP.0871	Dinarska	Smrtnost-HR	HR_Ostalo	0,79	15.11.2010
AP.08C2	Dinarska	Smrtnost-SLO	Slovenija	0,79	29.1.2012
CH.0LLP	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,79	17.3.2012
CH.0LM3	Dinarska	Smrtnost-HR	Lika	0,79	14.2.2013
AP.0844	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,81	8.12.2009
CH.0LM5	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,81	25.1.2013
AP.0812	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,82	18.4.2005
AP.08A4	Dinarska	Smrtnost-HR	Lika	0,83	1.3.2011
AP.0884	Dinarska	Smrtnost-HR	Lika	0,85	31.10.2011
AP.087J	Dinarska	Smrtnost-HR	HR_Ostalo	0,85	30.1.2011
EE.14Y0	Dinarska	Škode	Slovenija	0,86	31.5.2013
AP.07UT	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,86	24.12.2005
AP.0851	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,86	7.4.2009
AP.0817	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,86	27.3.2008
AP.08AE	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,87	15.9.2010
AP.07YA	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,87	21.9.2005
AP.0841	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,87	21.9.2009
AP.0843	Dinarska	Smrtnost-HR	Dalmacija	0,89	31.12.2009

PRILOGA N

Volkovi, ki smo jih zaznali na škodah.

Wolves that were detected at damage cases.

Ozn. živali	ALFA	SPOL	TROP	ZADNJE OPAŽANJE	DODATNE INFORMACIJE	število vzorcev na škodnih primerih		
						1. sez.	2. sez.	3. sez.
428	DA	M	Vremščica	Izginil pozimi 2013.	Stari alfa, zelo pogosto zaznan na škodah.	2	27	11
429	DA	F	Slavnik	Izginila avgusta 2012.	Veliko potomcev. Pogosto zaznana na škodah.	2	3	1
430	DA	M	Suha krajina	Izginil avgusta 2012.	Prihaja iz Javorniškega tropa.	0	1	1
431	NE	M		Izginil pozimi 2011/2012.		0	2	0
432	DA	M	Slavnik	Izginil sredi 3. sezone.	Glavni alfa samec tropa Slavnik. Zaznan na več škodah.	4	1	0
435	NE	M		Odstrel sredina 3. sezone (29.5kg, 3+ let)	Tonkin mladič (brlog).	0	0	1
436	DA	F	Vremščica	Povoz konec 3.sezone.	Volkulja Tonka, zaznana vse 3 sezone.	0	5	3
437	NE	M		Sredi druge sezone.	Slavc - ni reprod.; dispergira jeseni 2012.	0	1	0
438	NE	F	Vremščica		Nereprod. Vidimo jo samo v prvi polovici 2.sezone.	3	4	0
439	DA	M	Javorniki		Reprod. samec (prihaja iz Vremščice); v vzorcih smo ga dobivali samo še poleti 2011 (prvi del druge sezone)	1	1	0
440	DA	F	Rog		Dobivali od druge polovice prve sezone in potem še v prvi polovici tretje sezone.	0	2	3
441	DA	F	Gotenica			0	1	0
442	NE	M	Rog		V tem tropu ni bila zaznana reprodukcija - smo pa odlovili Tio, ki sicer ni potomka tega samca.	0	1	0
443	NE	M	Slavnik	Odstrel v 3. sezoni.		1	1	0
445	NE	F	Slavnik*		Verjetno disperger iz tropa Slavnika, izven znanih teritorijev.	5	0	0
447	DA	F	Slavnik		Verjetno sočasna druga alfa samica iz tropa Slavnik.	3	0	0
450	NE	M	Slavnik	Odstrel v 1. sezoni (40 kg, 3+ let)		3	0	0
452	NE	M	Slavnik		Mladič.	2	0	0
457	NE	M	Vremščica		Novi alfa – v času škod je bil prisoten še stari alfa @428.	0	0	2
462	NE	M	Vremščica		Mladič.	0	0	1
637	NE	M	Javorniki	Odstrel sredina 3. sezone (38kg, 3+ let)	Slavniški volk v disperziji na Javornike.	0	0	8
731	DA	F	Menišija			0	0	6
735	DA	F	Suha krajina			0	2	0
739	NE	M	Vremščica	Izginil sredi 3. sezone.		0	0	2
740	NE	F	Suha krajina		Rojena v tem tropu.	0	0	15
774	NE	M			Možno iz druge populacije ali povratni križanec.	0	0	2