

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Barbara BOLJTE

**RAZLIKOVANJE GENETSKIH PROFILOV VOLKOV
(*Canis lupus*) IN PSOV (*Canis familiaris*) S POMOČJO
KRATKIH TANDEMskih PONOVI TEV DNA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Barbara BOLJTE

**RAZLIKOVANJE GENETSKIH PROFILOV VOLKOV (*Canis lupus*)
IN PSOV (*Canis familiaris*) S POMOČJO KRATKIH TANDEMskih
PONOVI TEV DNA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DISCRIMINATING BETWEEN GENETIC PROFILES OF WOLVES
(*Canis lupus*) AND DOGS (*Canis familiaris*) BASED ON SHORT
TANDEM REPEATS IN DNA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, Oddelku za biologijo, Katedri za ekologijo in varstvo okolja, v raziskovalni skupini za ekologijo živali.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Trontlja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Ivan KOS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter TRONTELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Rudi VEROVNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga 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.

Barbara Boljte

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK591.5:599.744.111.1:599.744.111.2(043.2)=163,6
KG	volk/pes/genetski profili/mikrosateliti/neinvazivna genetika
AV	BOLJTE, Barbara
SA	TRONTELJ, Peter (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2016
IN	RAZLIKOVANJE GENETSKIH PROFILOV VOLKOV (<i>Canis lupus</i>) IN PSOVI (<i>Canis familiaris</i>) S POMOČJO KRATKIH TANDEMskih PONOVI TEV DNA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 42 str., 6 pregl., 4 sl., 2 pril., 60 vir.
IJ	sl
JJ	sl/an
AI	Na območjih prisotnosti velikih zveri v Sloveniji se pojavljajo napadi na domače rejne živali. Večina nastale škode se avtomatsko pripisuje volkovom (<i>Canis lupus</i>), čeprav so lahko napadalci tudi psi (<i>Canis familiaris</i>). Na podlagi oglada kadavrov in okolice napada pogosto ne moremo zanesljivo določiti povzročitelja. Cilj te diplomske naloge je bil optimizacija genetske metode za razlikovanje med volkovi in psi, s katero bi lahko iz bioloških sledi zanesljivo določili napadalca. DNA, ki smo jo izolirali iz pasjih vzorcev dlak, smo pomnožili s štirimi hkratnimi PCR. Z Bayesovo metodo združevanja v skupine smo genotipe psov in volkov z visokim povprečnim deležem pripadnosti uvrstili v dve skupini, dva vzorca pa sta nakazovala mešane genotipe. Analizo smo ponovili z različnim številom lokusov in ugotovili, da bi lahko večino vzorcev uvrstili v izvirno skupino že z dvema lokusoma, z več lokusi pa smo dobili zanesljivejšo uvrstitev. Uspešnost metode smo potrdili z rezultati faktorske korespondenčne analize.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK591.5:599.744.111.1:599.744.111.2(043.2)=163,6
CX wolf/dog/genetic profiles/microsatellites/non-invasive genetics
AU BOLJTE, Barbara
AA TRONTELJ, Peter (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2016
TI DISCRIMINATING BETWEEN GENETIC PROFILES OF WOLVES (*Canis lupus*) AND DOGS (*Canis familiaris*) BASED ON SHORT TANDEM REPEATS IN DNA
DT Graduation thesis (University studies)
NO X , 42 p., 6 tab., 4 fig., 2 ann., 60 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Attacks on livestock in Slovenia are frequent in areas populated by large carnivores. Most attacks are automatically attributed to wolves (*Canis lupus*), although dogs (*Canis familiaris*) may also be responsible. Usually, cadaver examinations and visual analysis of area surrounding the attack are inadequate to confirm the predator. The aim of this graduation thesis was to optimize a method for genetic differentiation between wolves and dogs, which could reliably determine the attacker. To distinguish between wolf and dog genetic profiles, DNA was isolated from dogs hair samples. Isolated DNA was amplified with four multiplex PCR. We used the Bayesian clustering method to assign samples with high average share of membership into two predefined groups; however, two samples indicated mixed genotypes. Repeated analysis with different numbers of loci indicated that most samples could be assigned to the original group with only 2 loci, but analysis with multiple loci gave more reliable assignment. We verified assignment with factorial correspondence analysis.

.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 VOLKOVI V SLOVENIJI IN SVETU	2
1.2 NAPADI PLENILCEV NA DOMAČE ŽIVALI	3
1.3 UDOMAČITEV VOLKA	4
1.4 INTERAKCIJE MED VOLKOVI IN PSI	5
1.4.1 Križanje med volkom in psom	6
1.5 METODE ZA DOLOČANJE GENETSKE VARIABILNOSTI	7
1.5.1 Neinvazivno vzorčenje	7
1.5.2 Mikrosateliti – kratke tandemске ponovitve	8
1.6 IDENTIFIKACIJA NAPADALCEV DOMAČIH ŽIVALI Z UPORABO GENETSKIH OZNAČEVALCEV	9
1.7 CILJI NALOGE	11
2 MATERIAL IN METODE	12
2.1 ZBIRANJE VZORCEV	12
2.2 IZOLACIJA DNA IZ MEŠIČKOV DLAK	14
2.3 POMNOŽEVANJE DNA S PCR	15
2.4 DOLOČANJE GENOTIPOV	17
2.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	18
2.5.1 Izračun parametrov populacijske genetike	18
2.5.2 Preverjanje genetskih razlik med volkovi in psi	20
3 REZULTATI	22
3.1 SPLOŠNI PODATKI O ANALIZIRANIH LOKUSIH	22
3.2 STATISTIČNI PARAMETRI, KI OMOGOČAJO LOČEVANJE MED VOLKOVI IN PSI	24
3.3 ANALIZA GENETSKE RAZLIČNOSTI MED VOLKOVI IN PSI	26
4 RAZPRAVA IN SKLEPI	30

4.1	RAZPRAVA	30
4.1.1	Vrednotenje mikrosatelitnih lokusov	30
4.1.2	Primernost izbranih lokusov za genetsko ločevanje volkov in psov	32
4.1.3	Pojav in pogostost križanja pri slovenskih volkovih in psih	33
4.1.4	Predlogi za nadaljno rutinsko uporabo metode v veterinarsko-forenzičnih preiskavah	33
4.2	SKLEPI	35
5	POVZETEK.....	36
6	LITERATURA	37

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Končne koncentracije začetnih oligonukleotidov v posamezni PCR.	16
Preglednica 2: Protokoli za posamezne hkratne PCR.	17
Preglednica 3: Računalniški programi, ki smo jih uporabili za izračune posameznih genetskih parametrov.	20
Preglednica 4: Podatki o izbranih analiziranih lokusih pri volkovih in psih.	23
Preglednica 5: Primerjava specifičnih alelelov pri volkovih in psih ter izračunane vrednosti F_{ST} za posamezne lokuse.	25
Preglednica 6: Povprečni delež pripadnosti volkov in psov v vnaprej določene skupine z Bayesovim pristopom združevanja v skupine. Deleži pripadnosti so prikazani za različno število uporabljenih lokusov.	29

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prostorska razporeditev volčjih tropov v Sloveniji in sosednji Hrvaški (Potočnik in sod., 2014).	2
Slika 2: Zemljevid Slovenije z označenimi kraji vzorčenja pasjih dlak.....	13
Slika 3: Razporeditev genotipov volkov in psov na podlagi FCA.	26
Slika 4: Grafični prikaz analize z Bayesovo metodo združevanja v skupine.....	28

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Podatki o vzorcih psov.

PRILOGA B: Frekvence alelov na posameznih lokusih za volkove in pse.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DNA	deoksiribonukleinska kislina
FCA	faktorska korespondenčna analiza (ang. <u>f</u> actorial <u>c</u> orrespondence <u>a</u> nalysis)
F _{ST}	fiksacijski indeks
F _X	frekvenca alela
He	pričakovana heterozigotnost
Ho	opažena heterozigotnost
K	število skupin, v katere so uvrščeni osebki
MCMC	Markovska veriga Monte Carlo (ang. <u>M</u> arkov <u>C</u> hain <u>M</u> onte <u>C</u> arlo)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (ang. <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex)
mtDNA	mitohondrijska DNA
N	število vzorcev
Ne	efektivno število alelov na lokusu
PA _r	pestrost privatnih alelov
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PIC	informacijska vrednost polimorfizma
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (ang. <u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism)
STR	kratke tandemске ponovitve, mikrosateliti (ang. <u>s</u> hort <u>t</u> andem <u>r</u> epeat)

1 UVOD

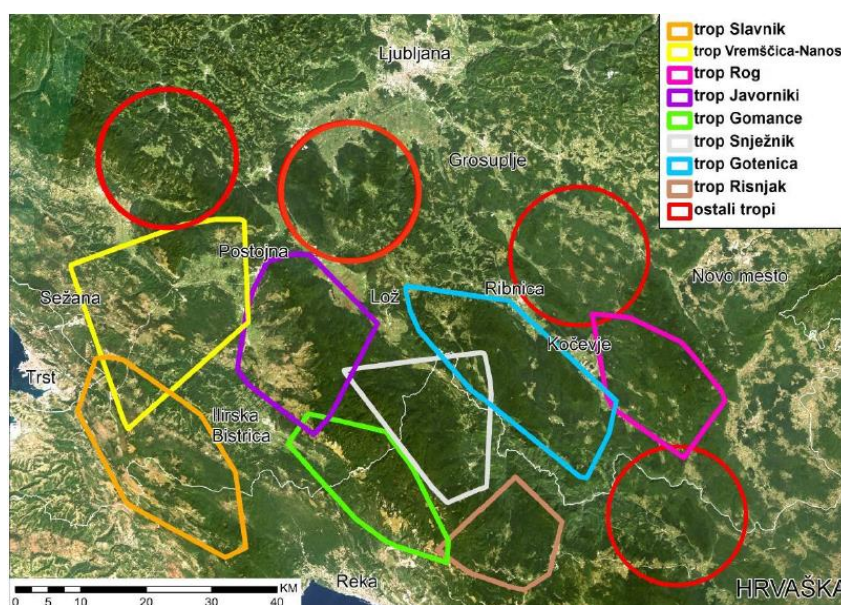
Na območjih pojavljanja volkov (*Canis lupus*) v Sloveniji se živinorejci soočajo s pokoli domačih pašnih živali, predvsem drobnice. Najpogostejše je vzrok napada slabo varovana drobnica, plenilec pa je le redko opažen. Na območjih pojavljanja volkov so prisotni tudi psi (*Canis familiaris*), ki so lahko prav tako napadalci drobnice, vendar se vsi napadi pripisujejo volkovom.

Na podlagi oglada kadavrov napadenih živali in uporabe patoanatomskih metod se napadalca ne da z gotovostjo določiti. Volkovi so bolj izkušeni lovci kot psi, sledi, ki jih pustijo za seboj pa navadno niso dovolj jasne, da bi jih lahko z gotovostjo potrdili kot napadalce (Černe in sod., 2011). Tudi razlikovanje z genetskimi metodami ni enostavno, ker sta si pes in njegov prednik volk sorodstveno blizu. Pravilna identifikacija napadalca je lahko tudi v ekonomskem interesu države, saj rejcem pripada odškodnina za izgubo drobnice le v primeru, če so napadalci volkovi. S tem bi se lahko preprečile zlorabe, kadar rejci za pokole drobnice neupravičeno in brez neposrednih dokazov krivijo volkove. Na podlagi pokolov drobnice se odreja tudi letni odstrel volkov z namenom preprečitve škod, vendar trajnostni odstrel volkov načeloma ne vpliva na zmanjševanje škode pri reji domačih živalih (Krofel in sod., 2011). Pravilna identifikacija napadalcev je zato predpogoj za učinkovito varstvo in upravljanje z volkovi.

Na poročju genetskega razlikovanja med volkovi in psi je bilo opravljenih več študij (Andersone in sod., 2002; Caniglia in sod., 2013; Godhino in sod., 2011; Kopaliani in sod., 2014; Lorenzini in sod., 2014; Sundqvist in sod., 2008), vendar nobene na volčji populaciji, ki se pojavlja na območju Slovenije. V preteklih študijah so različne raziskovalne skupine opravile analize z različnimi genetskimi označevalci, kar oteži primerjavo rezultatov med laboratoriji. Za identifikacijo osebkov so v teh študijah uporabili 10–15 genetskih označevalcev (Groot in sod., 2016).

1.1 VOLKOVI V SLOVENIJI IN SVETU

Od leta 1995 so volčji tropi ponovno stalno prisotni na območju Slovenije (Slika 1) in predstavljajo severozahodni del dinarsko-balkanske populacije. Njihovo življenjsko območje so strnjeni jelovo-bukovi (*Omphalodo-Fagetum*) gozdovi visokega krasa na Kočevskem in Notranjskem ter zaraščeni travnati predeli nizkega krasa na Primorskem (Jonozovič, 2003). Na Primorskem poseljujejo območje Slavnika, Vremščice in Kraškega roba. Volkove so opazili tudi v Triglavskem narodnem parku (Marenče, 2010).



Slika 1: Prostorska razporeditev volčjih tropov v Sloveniji in sosednji Hrvaški (Potočnik in sod., 2014).

Volkovi naseljujejo celotno severno zemeljsko poloblo – Severno Ameriko in Evrazijo. Na Japonskem sta dve podvrsti izumrli v začetku 20. stoletja. V preteklosti so zaradi preganjanja volčje populacije na velikem delu območja razširjenosti izginile, v zadnjih 20 letih pa je začelo število volčjih populacij naraščati, povečuje pa se tudi območje njihovega pojavljanja. Za naraščajočo številčnost je odgovorno predvsem dejstvo, da je volk v mnogih državah popolnoma zavarovana vrsta in da se je zmanjšal odklonilni odnos ljudi do volkov (Boitani, 2000).

V vzhodni Evropi so volčje populacije prisotne v Karpatih, na Balkanskem polotoku, na Poljskem in njenih vzhodnih sosednjih državah. V centralno-zahodni Evropi so območja razširjenosti razdrobljena, populacije pa so pogosto majhne in izolirane, volčje populacije so prisotne na Pirenejskem polotoku (Kaczensky in sod., 2012), iz italijanskih Apeninov pa se volkovi vračajo tudi v Alpe (Boitani, 2000; Fabbri in sod., 2007; Randi, 2011).

1.2 NAPADI PLENILCEV NA DOMAČE ŽIVALI

Volk je plenilec, klasični mesojed, ki se prehranjuje priložnostno z vsem, kar najde v svojem habitatu (Jonozovič, 2003). Glavna hrana volka v Sloveniji so veliki rastlinojedi sesalci, predvsem jelenjad, srnjad, divji prašiči in domače živali. Zaradi plenjenja divjadi lovci pogosto obravnavajo volka kot tekmeca, predvsem na območjih, kjer je populacijska gostota srnjadi in jelenjadi nižja (Krofel in Kos, 2010).

Najpogostejši vzrok za napade na domače živali je nevarovana ali slabo varovana živina, saj volkovi pri plenjenju izkoriščajo priložnosti, ki so jim dane (Mech in Boitani, 2003). Vendar pa so lahko vzrok tudi drugi dejavniki: povečan obseg intenzivne reje drobnice na območju pojavljanja volka, habituacija volkov na plenjenje drobnice in sprememba v razporeditvi ter številčnosti volkov (Krofel in Kos, 2010; Krofel in sod., 2011). Krofel in sod. (2011) so izpostavili tudi možnost načrtnih zlorab odškodninskega sistema s strani rejcev, ki so brez neposrednih dokazov napade pripisali volkovom.

Enega glavnih izzivov upravljanja z volkom v Sloveniji predstavlja škoda, ki jo volk povzroča v kmetijstvu in živinoreji, predvsem reji drobnice. Učinkovitost odškodninskih programov za sanacijo škode, ki nastane zaradi napadov plenilskih živali, je pogosto vprašljiva. Sistem kompenzacije škode ni usmerjen k boljši zaščiti domačih živali in ne nudi dolgoročne rešitve problematike napadov (Boitani, 2000). Poleg tega se letni odstrel volkov v Sloveniji prilagaja pogostosti napadov na domače živali (Černe in sod., 2010).

Javnomnenjska raziskava na območju stalne in občasne prisotnosti volkov v Sloveniji, ki sta jo opravili Marinko in Majič Skrbinšek (2011), je pokazala zelo odklonilno stališče rejcev drobnice do volkov. Rejci so izrazili negativno stališče do zavarovanja volčjih populacij izven območij gozdov in prepričanje, da so volkovi glavni povzročitelji ekonomske škode pri reji drobnice. Poleg volkov so kot škodljive zveri navedli tudi medvede (*Ursus arctos*), rise (*Lynx lynx*) in potepuške pse. Avtorici raziskave poudarjata, da je obstoj volkov v Sloveniji odvisen od mnogih dejavnikov, med drugim tudi od mnenja javnosti in odnosa družbe do volka ter upravljanja z njim.

Volkovi se lahko pojavljajo v bližini bivališč, kjer so prisotni tudi domači psi. Možni povzročitelji škodnih primerov na območju pojavljanja volka so lahko tudi podivjani, prosto spuščeni psi ali križanci med volkom in psom (Černe in sod., 2010). Plenilci drobnice so navadno redko opaženi, pravilno identifikacijo povzročitelja škode, z uporabo patoanatomskih metod, pa otežujejo tudi pogosto nejasne sledi, ki jih napadalec pusti na kadavrih domačih živali ali v okolici napada (Černe in sod., 2011).

Pravilna identifikacija napadalca je lahko tudi v ekonomskem interesu države, saj rejcem pripada odškodnina za izgubo drobnice, če so napadalci volkovi. Če je za pokol drobnice kriv pes, jim le-ta ne pripada, s tem pa so rejci spodbujeni k laganju pri prijavi napadalca in zlorabi državnih finančnih sredstev (Caniglia in sod., 2013; Sundqvist in sod., 2008). Posledično, je razvoj metod za točno in natančno identifikacijo ter razlikovanje med plenilci drobnice, predvsem volkovi in psi, nujen za korektno varstvo in upravljanje z volkovi.

1.3 UDOMAČITEV VOLKA

Po več desetletjih špekulacij so na podlagi obsežnih raziskav vedenja, morfologije in molekularne biologije potrdili, da je volk edini prednik domačega psa. Na podlagi analiz mitohondrijske DNA, poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) in kratkih tandemskih ponovitev so določili območje izvora psa, vzhodno Azijo (Vilá in sod., 1997; Savolainen in sod., 2002; Parker in sod., 2004). Lokacijsko pa so dogodek postavil na

Kitajsko, južno od reke Jangce, saj so bile analizirane pasme iz tega območja veliko bolj raznolike. Vendar je ena izmed zadnjih raziskav, ki pa so jo opravili Frantz in sod. (2016), pokazala, da je udomačevanje neodvisno potekalo tudi na območju zahodne Evrazije. Na podlagi polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP) so potrdili, da je udomačevanje volkov potekalo na različnih območjih, v različnih časovnih obdobjih in iz dveh ločenih volčjih populacij (Frantz in sod., 2016). Pang in sod. (2009) so na podlagi analiz več kot 1.500 vzorcev iz celega sveta postavili sklep, da so se domači psi pojavili pred približno 16.300 leti.

Raznolikost pasjih pasem je najverjetneje posledica večkratnega procesa udomačevanja volkov, povratnega križanja z divjimi populacijami, parjenja v sorodstvu, genetske variabilnosti predniških populacij volka in kasnejših mutacij, ki so nastale v kratkem času udomačevanja (Ostrander in Wayne, 2005; Vilá in sod., 1997).

1.4 INTERAKCIJE MED VOLKOVI IN PSI

Volk in pes sta bila v preteklosti podvržena različnim evlucijskim procesom, med njima pa še vedno prihaja do interakcij: križanja, sobivanja, prenosa bolezni, lahko sta v kompeticiji za naravne vire oziroma v odnosu plen-plenilec (Lescureux in Linnell, 2014; Vilá in Wayne, 1999). Pse so poleg varovanja uporabljali tudi za lov na volkove, pri tem pa je lahko prihajalo tudi do volčjih napadov na pse (Lescureux in Linnell, 2014). Predvideva se, da so za varovanje domačih živali pse začeli uporabljati na območju Evrazije, pasme psov pa so bile pogosto rezultat specifične selekcije. Karakteristike psov, ki se jih uporablja za varovanje domačih živali, so najverjetneje rezultat prilagoditve na sezonske selitve, življenje v visokogorju, soočanje s prostoživečimi zvermi in selekcije vedenjskih lastnosti, ki so jih opravili pastirji (Coppinger in Coppinger, 2005).

1.4.1 Križanje med volkom in psom

Pri začetkih udomačevanja volka je bil pogost pretok genov med volčjimi populacijami in zgodnjimi pasjimi populacijami. Morfološko si volk in zgodnja oblika psa nista bila zelo različna (Lescureux in Linnell, 2014), zato je med njima pogosto prihajalo do parjenja. Vrste znotraj družine psov (*Canidae*) se lahko med seboj pari in imajo plodne potomce. Domači pes in volk imata enak kariotip, lahko se parita in imata plodne potomce ob parjenju bodisi v ujetništvu bodisi v naravi (Vilá in Wayne, 1999). Volkovi, prosto spuščeni ali divji psi pogosto uporabljajo različne ekološke niše, med njimi pa vseeno prihaja do interakcij. Križanje med divjimi in udomačenimi vrstami lahko predstavlja veliko grožnjo naravnim populacijam. Prenašanje »udomačenih genov« v naravne populacije lahko ogrozi genetski sklad divjih populacij (Gottelli in sod., 1994), ogrozi lokalno adaptacijo ali poveča genetsko homogenizacijo (Godinho in sod., 2011; Rymer in Simberloff, 1996). Godinho in sod. (2011) so izpostavili tudi možnost izumrtja vrste v primeru križanja in s tem stabilnega vključevanja pasjih genov v volčji genom.

V Gruziji so izpostavili predvsem problem križanja med ovčarskimi psi in volkovi. Na podlagi analize mitohondrijske DNA (mtDNA) so ugotovili, da ima 10 % volkov in 20 % psov bližnje sorodstvo v nasprotni skupini, za 2–3 % osebkov pa so z visoko verjetnostjo potrdili, da so križanci prve generacije (Kopaliani in sod., 2014).

Glede na zgodovinske zapise so pse in volkove v preteklosti načrtno parili, danes pa obstajajo tudi registrirane pasme, ki so rezultat teh križanj. Takšni pasmi sta češkoslovaški in saarloški volčjak. V nekaterih državah so te pasme prepovedane, predvsem zaradi ogrožanja ljudi in ne zaradi povratnih križanj z volkovi. Le-ta potekajo tudi v naravi in predstavljajo pereč problem v Italiji, Španiji, Latviji in Estoniji (Andersone in sod., 2002; Godinho in sod., 2011; Hindrikson in sod., 2012; Lorenzini in sod., 2014).

1.5 METODE ZA DOLOČANJE GENETSKE VARIABILNOSTI

Genetske metode so z napredkom tehnologije postale uporabnejše, cenovno ugodnejše in posledično se je njihova uporaba razširila. Omogočajo vpogled v populacijske procese, genetsko pestrost, identifikacijo posameznih osebkov in populacij (DeYoung in Honeycutt 2005). Imajo pa tudi svoje prednosti, slabosti in določene omejitve (Hedrick, 1999). V večini primerov, podatki pridobljeni z genetskimi metodami, postanejo uporabni šele v kombinaciji z drugimi podatki in drugimi metodami (DeYoung in Honeycutt, 2005). K večji uporabnosti genetskih metod je pomembno prispeval tudi napredek v računalniški tehnologiji, ki je omogočil statistične pristope kot so največja verjetnost, Bayesova metoda združevanja v skupine (ang. Bayesian clustering) in randomizacija markovske verige po metodi Monte Carlo (ang. Markov Chain Monte Carlo – MCMC). Ti novi pristopi omogočajo analizo več podatkov v krajšem času (Selkoe in Toonen, 2006).

1.5.1 Neinvazivno vzorčenje

Z neinvazivnim vzorčenjem bioloških sledi lahko pridobimo podatke o prostoživečih populacijah brez lova, dotikanja ali opazovanja živali (Taberlet in sod. 1999; Waits in Paetkau, 2005). Iz mešičkov dlak, sline, iztrebkov, urina in drugih bioloških sledi, ki jih živali pustijo za seboj, lahko izoliramo genetski material, ki ga nato uporabimo v raziskavah etologije, varstvene biologije in populacijske genetike (Taberlet in sod., 1999). Neinvazivno vzorčenje je postalo zelo razširjeno na področju populacijske genetike, saj s tem pristopom ne vznemirjamo živali v njihovem naravnem okolju (Taberlet in Luikart, 1999). Izolacija DNA iz mešičkov dlak za namene genotipizacije je uveljavljena metoda tudi v forenzičnih raziskavah, količina izolirane DNA pa je lahko manjša, kot v vzorcih urina, brisov sline ali krvi (Ghatak in sod., 2013).

Pri vzorčenju in analiziranju neinvazivnih vzorcev je treba upoštevati in zmanjšati možnost napak pri shranjevanju vzorcev, izolaciji in pomnoževanju DNA. Genotipske napake največkrat nastanejo zaradi razlik v zaporedju DNA, nizke kvalitete in količine DNA v vzorcu, biokemijskih nepravilnosti in napak raziskovalca (Pompanon in sod., 2005). Pri

neinvazivnih vzorcih predstavlja največji problem kontaminacija vzorcev. Zato ima velik pomen pazljivost pri vzorčenju, shranjevanju vzorcev, delu v laboratoriju in analizi podatkov. Pri analizah je treba čim bolj zmanjšati napake pri določanju genotipov (Taberlet in Luikart, 1999). Poleg pazljivosti in doslednosti pri delu je treba opraviti analize z ustreznim številom lokusov v več ponovitvah, da lahko zanesljivo potrdimo genotipe (Taberlet in Luikart, 1999; Waits in Paetkau, 2005; Williams in sod., 2003).

1.5.2 Mikrosateliti – kratke tandemске ponovitve

Kratke tandemске ponovitve so prisotne v genomu vseh znanih organizmov. Njihova uporaba se je razširila v zadnjih treh desetletjih, saj so se izkazali kot zelo vsestransko molekularno orodje. Uporabni so tako za identifikacijo posameznih osebkov kot tudi za sledenje populacijam skozi daljše časovno obdobje, raziskovanje genetske variabilnosti, pretoka genov, filogenetskih odnosov, socialne strukture in v forenzičnih preiskavah (Chambers in MacAvoy, 2000; Waits in Paetkau, 2005).

Kratke tandemске ponovitve na splošno imenujemo tudi mikrosateliti ali STR (ang. short tandem repeats). Osnovna enota (motiv) od enega do šest baznih parov se ponovi v tandemu od 5 do 50-krat. Variacija med različnimi aleli je posledica razlike v številu ponavljajočih enot, zato se aleli razlikujejo v dolžini; tandemsko ponavljajoč se polimorfizem je znan tudi kot dolžinski polimorfizem. Kratke tandemске ponovitve so trenutno najbolj razširjene pri analizah genetskih polimorfizmov, saj se lokusi s STR nahajajo na vseh avtosomalnih in tudi spolnih kromosomih. Njihova uporaba se je razširila zaradi naslednjih prednosti (Goodwin in sod., 2007):

- so cenovno dostopni in enostavni za analiziranje,
- analiziramo lahko zelo raznolike biološke vzorce,
- rezultate lahko primerjamo z ostalimi laboratoriji,
- istočasno lahko analiziramo veliko število lokusov,
- z genetskim materialom iz majhnega števila celic lahko naredimo uspešne analize,
- selekcijski pritisk ne vpliva na veliko število kratkih tandemskih ponovitev.

Najpogosteje se pri analizah uporabljajo di-, tri- ali tetranukleotidi. Tarčne odseke DNA se pomnoži s PCR (verižna reakcija s polimerazo, ang. *polymerase chain reaction*), nato pa se jih loči glede na dolžino fragmentov. Na podlagi analiziranja pasem psov so pokazali, da so kratke tandemске ponovitve kodominantne in se dedujejo po Mendlovih zakonih. Na splošno so mikrosatelitni lokusi visoko polimorfni v naravnih populacijah, s pričakovano heterozigotnostjo nad 50 % (Jarne in Lagoda, 1996).

Rezultate, pridobljene z analizami mikrosatelitov je med različnimi raziskovalnimi skupinami težko primerjati. Dolžine alelov, ki se jih določi po PCR, so odvisne od izkušenosti raziskovalca, saj je njihovo določevanje subjektivno. Razlike v dolžinah alelov med posameznimi raziskovalnimi skupinami pa nastanejo tudi zaradi različnih začetnih oligonukleotidov, ki se jih uporablja za pomnoževanje enakih mikrosatelitnih lokusov (Groot in sod., 2016).

1.6 IDENTIFIKACIJA NAPADALCEV DOMAČIH ŽIVALI Z UPORABO GENETSKIH OZNAČEVALCEV

Identifikacijo napadalcev na podlagi neinvazivnega vzorčenja (odvzema brisa slin iz ugriznih ran) so opravili v več študijah. Uspešnost identifikacije je odvisna od časa, ki je minil od napada do vzorčenja iz kadavra, od števila odvzetih vzorcev, usposobljenosti vzorčevalca, mesta odvzema vzorca in vremenskih pogojev. Identifikacija se je izkazala za najzaneslivejšo, če so bili vzorci slin iz ugriznih ran odvzeti v 24 urah od napada (Andersen in sod., 2015; Caniglia in sod., 2013; Leon, 2012). Poleg identifikacije napadalcev so raziskali tudi smer križanja med volkovi in psi. V Španiji so pokazali, da so bili njihovi osebki produkt križanja med volkuljo in psom (Godinho in sod., 2011), v Estoniji pa so z analizo kontrolne regije mtDNA (mitohondrijske DNA) opazili, da je križanje poteklo med volkom in psico (Hindrikson in sod., 2012).

V nasprotju z mtDNA se kratke tandemске ponovitve, ki so značilne samo za kromosom Y, dedujejo po očetu. Kromosom Y vsebuje manj polimorfnih mest v primerjavi z ostalim genomom, saj med mejozo po večini dolžine kromosoma Y ne prihaja do rekombinacij.

Največkrat uporabljena označevalca na kromosomu Y sta MS34A/B in MS41A/B. Z označevalci, ki se vežejo specifično na spolne kromosome, so določili dva samca, ki sta najverjetneje ponovno ustanovila populacijo volkov v Skandinaviji. (Sundqvist in sod., 2001). Ti označevalci omogočajo tudi boljše prepoznavanje smeri križanja in določitev izvora križancev (Godinho in sod., 2011).

Največ raziskav na področju ločevanja in identifikacije povzročiteljev napadov na domače živali je bilo narejenih v Italiji. Uspešno so določili povzročitelja napada na podlagi 12 avtosomalnih mikrosatelitnih lokusov, sekvenc kontrolne regije mtDNA in mikrosatelitov, ki so specifični za kromosom Y (Caniglia in sod., 2013). Lorenzini in sod. (2014) so na podlagi 18 lokusov, ki so jih razdelili v pet hkratnih PCR, uspešno določili tudi križance med volkom in psom. Na Švedskem so za določitev napadalcev na drobnico uporabili osem avtosomalnih mikrosatelitnih lokusov in uspešno določili psa kot napadalca. Na podlagi rezultatov njihove raziskave so podali zaključek, da je že šest mikrosatelitnih lokusov dovolj za uspešno razlikovanje med volkom in psom, vendar bi v primeru uporabe več mikrosatelitov dobili jasnejšo ločitev (Sundqvist in sod., 2008). Različne raziskovalne skupine v Evropi so uporabile povprečno 10–15 lokusov v posamezni raziskavi. Skupno pa je bilo za raziskave volčjih populacij v Evropi uporabljenih 118 mikrosatelitnih lokusov (Groot in sod., 2016).

1.7 CILJI NALOGE

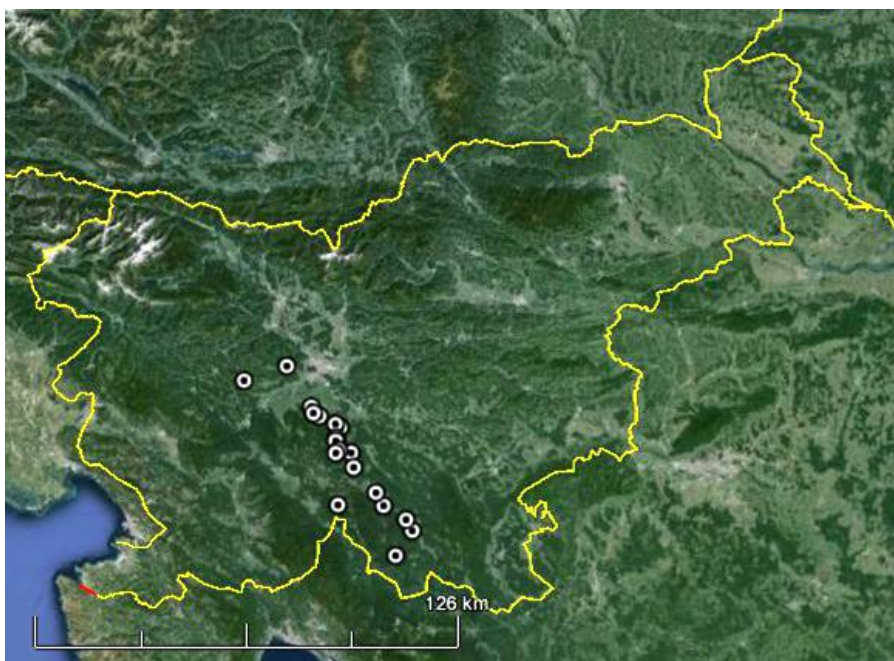
Diagnostiko za molekularno razlikovanje med volkovi in psi je treba prilagoditi lokalnim populacijam, zato je bil cilj te diplomske naloge uvedba postopka za genetsko razlikovanje med volkovi in psi v slovenskem prostoru. Optimizacijo metode identifikacije povzročiteljev škod v živinoreji smo izvedli z analizo 40 mikrosatelitnih lokusov. Z multivariantnimi statističnimi pristopi smo želeli preveriti ustreznost izbranih lokusov za ločevanje in preveriti prisotnost križancev med analiziranimi vzorci.

2 MATERIAL IN METODE

Za razlikovanje genetskih profilov volkov in psov se največkrat uporabljajo vzorci tkiv, iztrebkov, urina ali krvi. V okolici napada na živino lahko kot posledico boja najdemo tudi dlake napadalca. V sklopu naših analiz razlikovanja genetskih profilov smo uporabili genetski material iz vzorcev dlak, slin in tkiv. V nadaljevanju je opisan postopek določanja genotipov iz vzorcev dlak psov in primerjava genotipov volkov in psov. Genotipe iz volčjih tkivnih vzorcev in vzorcev slin psov so določili v predhodnih analizah in so shranjeni v podatkovni zbirki raziskovalne skupine za ekologijo živali na Oddelku za biologijo.

2.1 ZBIRANJE VZORCEV

Pri zbiranju vzorcev dlak psov smo se osredotočili na območje pojavljanja volka, območje severne Primorske in Kočevskega. V sodelovanju z Veterinarsko postajo Ljubljana smo pasje dlake zbirali na terenskem cepljenju psov v 19 vaseh: Dvorska vas, Retje, Male Lašče, Veliki Osolnik, Šentjošt, Hruševo, Želumlje, Vrh, Gradišče, Zapotok, Visoko, Iška vas, Vrbljenje in Tomišelj. Na Veterinarski postaji Kočevje pa so veterinarji zbirali dlake v ambulantni in nam poslali še vzorce iz Kočevja, Kočevske Reke, Dolenje vasi, Stare cerkve in Ribnice. Območja vzorčenja pasjih dlak so prikazana na sliki 2. Skupno smo zbrali 98 vzorcev pasjih dlak.



Slika 2: Zemljevid Slovenije z označenimi kraji vzorčenja pasjih dlak.

Dlake smo izpulili s pinceto in jih shranili v papirnate pisemske ovojnice. Na ovojnice smo zabeležili podatke o osebkih (datum odvzema vzorca, lokacijo odvzema, obarvanost kožuha, velikost, pasmo, ime in spol). Pinceto smo med posameznim jemanjem vzorcev pomočili v 70 % etanol in jo ožgali z ognjem. Papirnate pisemske ovojnice smo shranili na sobni temperaturi, v vrečki s silikagelom. Posamezni vzorec smo označili s šest-mestno specifično laboratorijsko kodo in ga vnesli v podatkovno bazo.

Med zbranimi vzorci dlak psov smo izbrali tiste vzorce, ki so bili za naše analize najbolj zanimivi in so prikazani v prilogi A. Izbrali smo si kriterije, za katere smo predvidevali, da nam bodo pomagali pri nadaljnjem določanju povzročiteljev škod na drobnici v slovenskem prostoru. Vzorce smo izbirali glede na prostorsko razporeditev, velikost pasme (velike rasti) in mešance. Želeli smo zajeti čim večjo genetsko variabilnost psov in najpogostejše pasme v območju pojavljanja volka, s fenotipsko podobnim ugrizom. Omejujoči dejavnik pri izbiri vzorcev za izolacijo DNA in nadaljnje analize, je bilo število izpuljenih mešičkov, saj se je velikokrat izkazalo, da jih je bilo premalo za uspešno izvedbo analiz. Koncentracija in kvaliteta izolirane DNA iz dlak, ki tekom fiziološkega procesa rasti odpadejo same, sta pogosto neustrezni za nadaljnje analize. Del vzorcev dlak

smo zbrali na terenskem obhodu veterinarjev, kjer smo dlake izpulili z namenom, da bi si zagotovili čim boljšo kvaliteto in količino izolirane DNA. Za del vzorcev, ki so nam jih poslali iz veterinarske postaje in jih nismo sami vzorčili, ne moremo z gotovostjo trditi, da je bil njihov odvzem skladen s priloženimi navodili.

2.2 IZOLACIJA DNA IZ MEŠIČKOV DLAK

Izolacijo DNA iz mešičkov dlak smo naredili na Oddelku za biologijo, v laboratoriju za neinvazivno genetiko. Laboratorij je ločen od prostorov, ki so namenjeni izolaciji DNA iz tkivnih vzorcev in delu s produkti PCR. V laboratoriju je vzpostavljen enosmerni pretok materiala med posameznimi koraki analize in prepovedan vnos visoko koncentrirane DNA. V posamezni seriji smo naredili izolacijo 23 vzorcev in ene negativne kontrole, s čimer smo želeli preprečiti možnost zamenjave vzorcev

DNA iz mešičkov dlak psov smo izolirali s komercialnim izolacijskim kompletom GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (G1N70, Sigma-Aldrich, Nemčija). Navodila proizvajalca za izolacijo DNA iz tkiv smo za naš tip vzorca ustrezno spremenili. V protokolu proizvajalca je predlagani čas inkubacije za tkiva, z dodanim liznim pufrom (Lysis T) in proteinazo K, od dve do štiri ure. Mi smo po pripravi 1,5 ml mikrocentrifugirk, ki so vsebovale lizni pufer, deset mešičkov dlak in proteinazo K, vzorce inkubirali čez noč v stresalnem inkubatorju pri 55 °C. Iz 200 µl končnega volumna izolirane DNA, smo pripravili 60 µl alikvote, za nadaljnje pomnoževanje s PCR. S tem smo preprečili večkratno odmrzovanje vzorca in ohranili visoko integriteto DNA. Izolirano DNA in alikvote smo shranili na -20 °C.

2.3 POMNOŽEVANJE DNA S PCR

DNA, izolirano iz pasjih vzorcev, smo pomnožili s štirimi hkratnimi PCR, ki smo jih označili z MultiD, MultiE, MultiF in MultiFinn. V posamezen hkratni PCR smo pare specifičnih začetnih oligonukleotidov razporedili glede na optimalno temperaturo prileganja in dolžinskega razpona alelov (Preglednica 1). Eden od para je bil označen s fluorescentnim barvilom. Uporabili smo modro (6-FAM), rdeče (PET), rumeno (NED) in zeleno (VIC) barvilo. Uporabljen dolžinski standard GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (4322682, Applied Biosystems, ZDA) je bil označen z oranžnim barvilom (LIZ). Za pomnoževanje DNA smo uporabili komplet QIAGEN Multiplex PCR Kit (206143, Qiagen, Nemčija). Posamezna 10 µl reakcija je vsebovala: 1 µl izolirane DNA, začetne oligonukleotide v točno določenih koncentracijah (Preglednica 1), vodo, *Taq* polimerazo, mešanico dNTP, magnezijeve ione in reakcijski pufer.

Preglednica 1: Končne koncentracije začetnih oligonukleotidov v posamezni PCR.

Hkratni PCR	Ime ¹	Koncentracija (μM) ²	Hkratni PCR	Ime ¹	Koncentracija (μM) ²
MultiD	CPH9	0,19	MultiFinn	AHTk211	0,10
	CPH8	0,40		CXX279	0,05
	SRY	0,08		INU055	0,07
	CPH12	0,15		REN169O18	0,05
	C20_253	0,08		REN54P11	0,05
	C09_250	0,25		AHT137	0,30
	FH2010	0,08		AHTh260	0,25
	CPH5	0,10		AHTk253	0,05
	CPH7	0,10		INRA21	0,20
	Cxx_121	0,29		REN169D01	0,05
	FH2145	0,35		AHT121	0,29
	CPH2	0,17		AHTh171	0,40
MultiE	FH2004	0,21		FH2054	0,10
	FH2088	0,37		REN162C04	0,40
	FH2096	0,08		REN247M23	0,30
	CPH6	0,10		amelogenin	0,05
	CPH4	0,47		FH2848	0,20
MultiF	FH2137	0,20		INU005	0,20
	CPH22	0,33		INU030	0,20
	VWF	0,30			
	Cxx_123	0,35			

¹ Ime začetnega oligonukleotida

² Končna koncentracija začetnega oligonukleotida v PCR, ki je bila enaka za smiselne (F, ang. forward) in protismiselne (R, ang. reverse) začetne oligonukleotide

PCR smo izvedli v 96-lukenjskih mikrotitrskih ploščah z napravo Eppendorf MasterCycler EP Gradient (Eppendorf, Nemčija). Na podlagi razporeditve začetnih oligonukleotidov v hkratnem PCR, smo prilagodili število ciklov in temperaturo prileganja (Preglednica 2) za posamezen PCR. Pri pomnoževanju DNA, ki smo jo izolirali iz mešičkov dlak, smo v primerjavi s protokoli za tkiva, povečali število ciklov, saj pri manjšem številu ciklov nismo dobili zaznavnega produkta oziroma je bil le-ta nejasen. Vzorce smo na mikrotitrsko ploščo nanegli z osemkanalno pipeto v vsaj dveh ponovitvah.

Preglednica 2: Protokoli za posamezne hkratne PCR.

	MultiD		MultiE		MultiF		MultiFinn	
Začetna denaturacija	95 °C	15 min	95 °C	15 min	95 °C	15 min	95 °C	15 min
Število ciklov	45		45		44		50	
Denaturacija	94 °C	30 s	94 °C	30 s	94 °C	30 s	94 °C	30s
Prileganje	55 °C	90 s	61,9 °C	90 s	49,5 °C	90 s	60 °C	90 s
Podaljševanje	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	1 min
Končno podaljševanje	60 °C	30 min	60 °C	30 min	60 °C	30 min	60 °C	30 min
	4 °C	10 min	4 °C	10 min	4 °C	10 min	4 °C	10 min
	14 °C	∞	14 °C	∞	14 °C	∞	14 °C	∞

Po končani PCR smo po 1 µl posameznega produkta prenesli v 9 µl mešanice formamida in dolžinskega standarda GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (4322682, Applied Biosystems, ZDA) na 96-lukenjsko ploščo. Vzorce na plošči smo štiri minute denaturirali pri 95 °C in jo po končani denaturaciji prenesli na led. Ohlajene vzorce smo nato analizirali na sekvenatorju ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ZDA).

2.4 DOLOČANJE GENOTIPOV

Dolžine alelov za posamezne mikrosatelitne lokuse smo določali s 16 kapilarnim sekvenatorjem ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ZDA). Izpise (elektroferograme) iz sekvenatorja smo analizirali z računalniškim programskim orodjem GeneMapper (Applied Biosystems, ZDA). Genotipe smo sprejemali na podlagi algoritma, ki so ga razvili Skrbinšek in sod. (2007) in temelji na metodi največjega verjetja. Po pomnoževanju tarčnih odsekov DNA so bili genotipi nekaterih vzorcev nepopolni oziroma nismo dobili nobenega PCR produkta. Kljub večkratnemu pomnoževanju in povečanju števila ciklov pri PCR, določenih vzorcev v analizah nismo mogli uporabiti. Za statistične analize, ločevanje skupin in uvrščanje osebkov v skupine je pomembno, da so genotipi čim bolj popolni. S tem se prepreči napake pri obdelavi podatkov in interpretaciji rezultatov.

2.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za nadaljnje statistične analize smo izbrali genotipe 65 volkov in 46 psov, ki so imeli ustrezen nivo pomnoževanja mikrosatelitnih lokusov, z relativno popolnimi genotipi. Med vsemi mikrosatelitnimi lokusi, ki smo jih uporabili v analizah smo izbrali tiste, ki so bili za ločevanje med volkovi in psi najprimernejši. Primernost posameznih lokusov smo opisali z več statističnimi parametri.

2.5.1 Izračun parametrov populacijske genetike

- **Frekvenca alela (F_x).** Za vsak lokus smo izračunali frekvenco posameznega alela z enačbo 1. N predstavlja število osebkov, N_{xx} število homozigotnih osebkov in N_{xy} število heterozigotnih osebkov.

$$F_x = \frac{2N_{xx} + N_{xy}}{2N} \quad \dots (1)$$

- **Efektivno število alelov na lokusu (N_e)** je vrednost, ki pove največ o informativnosti lokusa. N_e izračunamo z enačbo 2 in je navadno nižje od dejanskega števila alelov na lokusu, razen, če imajo vsi aleli enako frekvenco (Frankham in sod., 2002). Število alelov na posameznem lokusu označimo s h .

$$N_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^h p_i^2} \quad \dots (2)$$

- **Opaženo heterozigotnost (H_o)** izračunamo za posamezni lokus v populaciji. N predstavlja število vzorcev znotraj populacije. H_o smo izračunali z enačbo 3.

$$H_o = \frac{\text{Število heterozigotov v populaciji}}{N} \quad \dots (3)$$

- **Pričakovano heterozigotnost (H_e)** smo izračunali za posamezni lokus z enačbo 4. Ocena pričakovane heterozigotnosti je zelo uporabna kot merilo genetske raznolikosti posameznega lokusa (Frankham in sod., 2002).

$$H_e = 1 - \sum p_i^2 \quad \dots (4)$$

- **Fiksacijski indeks (F_{ST})** je merilo genetske različnosti med populacijami. F_{ST} izračunamo z enačbo 5. H_t predstavlja celokupno pričakovano heterozigotnost, H_s pa povprečno pričakovano heterozigotnost. Vrednosti F_{ST} se gibljejo med 0 in 1. Če je vrednost F_{ST} 1 pomeni, da sta si populaciji popolnoma različni.

$$F_{ST} = \frac{H_t - H_s}{H_t} \quad \dots (5)$$

- **Informacijska vrednost polimorfizma (PIC)** predstavlja informativnost posameznega lokusa, ki jo izračunamo na podlagi števila in frekvenc alelov na posameznem lokusu.

$$PIC = 1 - \sum_i^n p_i^2 + \sum_{i,j}^n p_i^2 p_j^2 \quad \dots (6)$$

- **Pestrost privatnih alelov (PA_r)** je mera za število privatnih alelov, ki je korigirana na najmanjše število vzorcev (g). PA_r izračunamo z enačbo 7. N_{ij} predstavlja število i -tega alela v populaciji j , N_j pa skupno število alelov v populaciji. J predstavlja število različnih alelov na posameznem lokusu.

$$PA_r = \sum_{i=1}^I \left[1 - \frac{\binom{N_j - N_{ij}}{g}}{\binom{N_j}{g}} \left(\prod_{\substack{j'=1 \\ j' \neq j}}^J \frac{\binom{N_{j'} - N_{ij'}}{g}}{\binom{N_{j'}}{g}} \right) \right] \quad \dots (7)$$

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniške programe Cervus 3.0.7 (Marshall in sod., 1998), GenAlEx 6.5 (Peakall in Smouse, 2012), HP-Rare (Kalinowski, 2005) in FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Parametri, ki smo jih izračunali s temi programi so prikazani v preglednici 3. Z računalniškima programoma Genetix 4.03 (Belkhir in sod., 2004) in Structure 2.3 (Pritchard in sod., 2010) smo preverili delež pripadnosti osebkov v vnaprej določeno skupino. Za ovrednotenje in izris rezultatov iz programa Structure 2.3 (Pritchard in sod., 2010) smo uporabili program CLUMPAK 1.1 (Kopelman in sod., 2015).

Preglednica 3: Računalniški programi, ki smo jih uporabili za izračune posameznih genetskih parametrov.

RAČUNALNIŠKI PROGRAM	PARAMETRI
GenAlEx 6.5 (Peakall in Smouse, 2012)	Frekvence alelov (F_x)
	Efektivno število alelov (N_e)
	Pričakovana in opažena heterozigotnost (H_e in H_o)
Cervus 3.0.7 (Marshall in sod., 1998)	Informacijska vrednost polimorfizma (PIC)
FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001)	Fiksacijski indeks (F_{ST})
HP-Rare (Kalinowski, 2005)	Pestrost privatnih alelov (P_{Ar})

2.5.2 Preverjanje genetskih razlik med volkovi in psi

Multivariatna statistična metoda, factorska korespondenčna analiza (FCA), predstavlja glavno orodje za proučevanje genetske raznolikosti. FCA omogoča interpretacijo povezav med vrsticami in stolpci v matriki. Torej omogoča asociacijo med aleli na posameznih lokusih z genotipi. Dvodimenzionalni grafikon pojasni skupni delež celotne variance, na podlagi dveh po vrednosti največjih dejavnikov. FCA za analizirane genotipe smo izvedli z računalniškim programom Genetix 4.03 (Belkhir in sod., 2004).

Z Bayesovim metodo združevanja v skupine, lahko določimo strukturo populacije, uvrstimo posamezne osebe v določeno populacijo in identificiramo migrante ter hibride. Uporabili smo programsko orodje Structure 2.3 (Pritchard in sod., 2010), ki se uporablja za raziskovanje strukture populacij na podlagi frekvenc alelov na posameznem lokusu. Osebe lahko verjetnostno razporedimo v K skupin oziroma jih združimo v dve ali več, če genotipi nakazujejo hibridne osebe. Računalniški model predvideva, da so lokusi v populaciji v Hardy-Weinbergovem ravnovesju in vezavnem ravnovesju oziroma so osebe dodeljeni v skupine na način, da se ti dve ravnovesji vzpostavita.

V naši raziskavi smo uporabili genotipe, ki smo jih določili z 38 avtosomalnimi lokusi. Za analizo smo uporabili 46 psov in 65 volkov ter osebkom vnaprej določili izvorno populacijo. Pri analizi smo uporabili računalniški model Admixture, saj so imeli lahko osebkni mešane prednike. Naredili smo 10 ponovitev analiz in upoštevali, da lahko naši vzorci tvorijo od ene do pet skupin. Zavrgli smo 50.000 korakov v markovski verigi za stabilizacijo začetnih vrednosti in uporabili 150.000 korakov MCMC. Za izračun najbolj verjetnega števila skupin (K), ki so ga razvili Evanno in sod. (2005), smo uporabili program CLUMPAK 1.1 (Kopelman in sod., 2015), s katerim smo poravnali razporeditev skupin za 10 ponovljenih analiz in za izris rezultatov.

3 REZULTATI

3.1 SPLOŠNI PODATKI O ANALIZIRANIH LOKUSIH

Vsi analizirani avtosomalni lokusi so bili polimorfni. Na 38 avtosomalnih lokusih smo določili 348 alelov. Na posameznem lokusu smo določili 3–18 alelov. Izračunane frekvence alelov na posameznih lokusih so prikazane v prilogi B.

V preglednici 4 so prikazani splošni podatki o analiziranih lokusih. Povprečno število alelov na lokus je bilo 6,6 in povprečno efektivno število alelov na lokus 3,66. Pri psih je bilo povprečno število alelov na lokus 7,63; pri volkovih pa 5,58. Pri psih je bilo večje tudi efektivno število alelov. Na podlagi števila in frekvenc alelov smo izračunali informativne vrednosti polimorfizmov (PIC). Glede na te vrednosti so bili najbolj informativni lokusi FH2848, REN169D01, REN247M23, AHT121, AHT137 in AHTTh260 v MultiFinn, lokus FH2137 v MultiF, FH2004 v MultiE in Cxx_121 v MultiD. Pri vseh omenjenih lokusih je bila vrednost PIC večja od 0,799. Za lokusa CPH22 in FH2096 sta bili vrednosti PIC najnižji. Lokusi z visokimi vrednostmi PIC so primerni za gensko kartiranje.

Pri psih je bila pričakovana heterozigotnost višja od opažene na vseh lokusih, razen na lokusu VWF. Pri volkovih je bila na 23 lokusih pričakovana heterozigotnost višja od opažene. Povprečna opažena heterozigotnost je bila pri psih (0,576) nižja kot pri volkovih (0,635). Povprečna pričakovana heterozigotnost je bila višja pri psih.

Preglednica 4: Podatki o izbranih analiziranih lokusih pri volkovih in psih.

	LOKUS	VOLK					PES					PIC
		<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	
1	FH2848	65	5	4,161	0,815	0,760	38	8	5,408	0,684	0,815	0,802
	INRA21	65	4	2,686	0,600	0,628	44	7	3,585	0,614	0,721	0,619
	INU005	65	7	2,275	0,569	0,560	46	7	3,486	0,587	0,713	0,726
	INU030	65	6	3,074	0,646	0,675	46	5	3,768	0,478	0,735	0,718
	INU055	65	5	2,881	0,600	0,653	46	6	4,186	0,630	0,761	0,695
	REN162C04	65	6	1,881	0,415	0,468	34	6	4,671	0,559	0,786	0,638
	REN169D01	65	7	3,225	0,815	0,690	45	8	3,409	0,556	0,707	0,809
	REN169O18	65	5	2,562	0,569	0,610	45	8	3,924	0,533	0,745	0,717
	REN247M23	65	7	5,516	0,846	0,819	35	6	2,787	0,400	0,641	0,820
	REN54P11	65	5	2,599	0,600	0,615	46	9	4,198	0,630	0,762	0,760
	AHT121	65	7	4,096	0,692	0,756	44	12	5,948	0,523	0,832	0,852
	AHT137	65	6	5,156	0,877	0,806	46	11	6,028	0,783	0,834	0,860
	AHT171	65	5	3,387	0,738	0,705	46	9	5,532	0,652	0,819	0,790
	AHT260	65	9	5,997	0,815	0,833	46	9	5,944	0,761	0,832	0,869
	AHTk211	65	3	2,174	0,538	0,540	46	6	4,198	0,587	0,762	0,709
	AHTk253	65	5	3,512	0,754	0,715	46	8	2,937	0,543	0,659	0,795
	CXX279	65	6	3,581	0,585	0,721	45	8	5,777	0,600	0,827	0,783
	FH2054	64	7	2,511	0,703	0,602	31	9	3,703	0,548	0,730	0,713
2	VWF	65	5	2,892	0,677	0,654	46	5	2,793	0,870	0,642	0,724
	FH2137	65	9	7,432	0,862	0,865	46	18	9,043	0,674	0,889	0,911
	Cxx_123	27	8	5,045	0,926	0,802	46	5	3,915	0,565	0,745	0,773
	CPH22	65	4	2,962	0,615	0,662	46	3	1,401	0,217	0,286	0,551
3	CPH2	65	8	4,502	0,769	0,778	46	8	3,338	0,652	0,700	0,770
	CPH4	65	5	2,803	0,677	0,643	46	8	2,805	0,565	0,643	0,744
	CPH6	65	5	1,579	0,338	0,367	44	12	4,834	0,591	0,793	0,691
	FH2004	65	7	3,656	0,692	0,727	46	11	4,870	0,652	0,795	0,799
	FH2088	65	6	3,587	0,754	0,721	45	8	4,455	0,756	0,776	0,768
	FH2096	65	3	1,336	0,262	0,252	46	4	2,243	0,326	0,554	0,402
4	C09_250	65	7	4,082	0,692	0,755	46	10	5,525	0,783	0,819	0,777
	C20_253	65	6	5,078	0,738	0,803	46	7	2,256	0,478	0,557	0,771
	CPH12	65	4	3,202	0,708	0,688	46	5	2,394	0,435	0,582	0,637
	CPH5	65	5	3,119	0,723	0,679	46	5	1,999	0,413	0,500	0,657
	CPH7	65	4	2,386	0,538	0,581	46	6	3,809	0,587	0,737	0,606
	CPH8	65	6	2,525	0,554	0,604	46	7	3,452	0,543	0,710	0,620
	CPH9	65	4	2,422	0,569	0,587	46	6	3,541	0,674	0,718	0,766
	Cxx_121	65	6	3,969	0,677	0,748	46	12	5,919	0,587	0,831	0,849
	FH2010	65	6	2,922	0,615	0,658	46	5	3,865	0,696	0,741	0,710
	FH2145	65	7	1,741	0,385	0,426	45	15	6,830	0,689	0,854	0,652

* 1 – MultiFinn, 2 – MultiF, 3 – MultiE, 4 – MultiD, *N* – število vzorcev, *Na* – število alelov na lokusu, *Ne* – efektivno število alelov, *Ho* – opažena heterozigotnost, *He* – pričakovana heterozigotnost, *PIC* – informativna vrednost polimorfizma za posamezni lokus.

3.2 STATISTIČNI PARAMETRI, KI OMOGOČAJO LOČEVANJE MED VOLKOVI IN PSI

V preglednici 5 so prikazani podatki za specifične alele, ki smo jih določili samo pri psih oziroma samo pri volkovih. Na 24 lokusih so bili specifični aleli volkov, na 35 lokusih pa specifični aleli psov. Pri psih smo skupno našli največ specifičnih alelov na lokusu FH2137. Najvišje skupne frekvence specifičnih alelov pri psih so bile na lokusih CPH9 (0,902), CPH6 (0,702), VWF (0,696) in FH2137 (0,696). Pri volkovih je bilo največ specifičnih alelov na lokusu AHTh260, kjer smo izračunali najvišjo frekvenco (0,423) in lokusu FH2004. Najvišje frekvence smo izračunali še na lokusih REN169D01 (0,408) in CPH9 (0,408).

Zaradi različnega števila vzorcev, smo število specifičnih alelov izračunali tudi s korigiranim parametrom, pestrostjo specifičnega alela. Kljub temu, da na določenih lokusih nismo zaznali nobenega specifičnega alela, je bila vrednost PAr večja od nič. Računalniški program je v tem primeru upošteval, da je bil na lokusu prisoten vsaj en specifični alel. Pri psih je bila pestrost specifičnega alela na 17 lokusih nižja od dejanskega števila specifičnih alelov. Pri volkovih je bila pestrost specifičnih alelov na 14 lokusih nižja od dejanskega števila.

Na podlagi vrednosti F_{ST} smo ocenili genetske razdalje med psi in volkovi za posamezne lokuse. Na 12 lokusih (INU005, REN169D01, AHTk211, AHTk253, FH2054, VWF, CPH22, CPH4, CPH6, FH2096, CPH5, CPH9) so bile F_{ST} vrednosti večje od 0,25; kar je nakazovalo na največjo razliko med psom in volkom na teh lokusih. Na lokusu CPH6 je bila vrednost F_{ST} najvišja (0,403). Največja podobnost na podlagi izračunane vrednosti F_{ST} med volkom in psom je bila na sedmih lokusih: INRA21, INU055, AHTh 260, Cxx279, FH2137, Cxx_123, C09_250, CPH7 in CPH8. Ti lokusi so imeli vrednosti F_{ST} nižje od 0,1. Povprečna vrednost F_{ST} med volkovi in psi je bila 0,102.

Vrednost F_{ST} je bila med volkovi in psi pri analiziranih lokusih med 0,018 na lokusu INRA21 in 0,403 na lokusu CPH6. Povprečna vrednost je bila 0,102. Na lokusu CPH9 in CPH6 so bile poleg F_{ST} najvišje tudi frekvence specifičnih alelov (0,902 in 0,727).

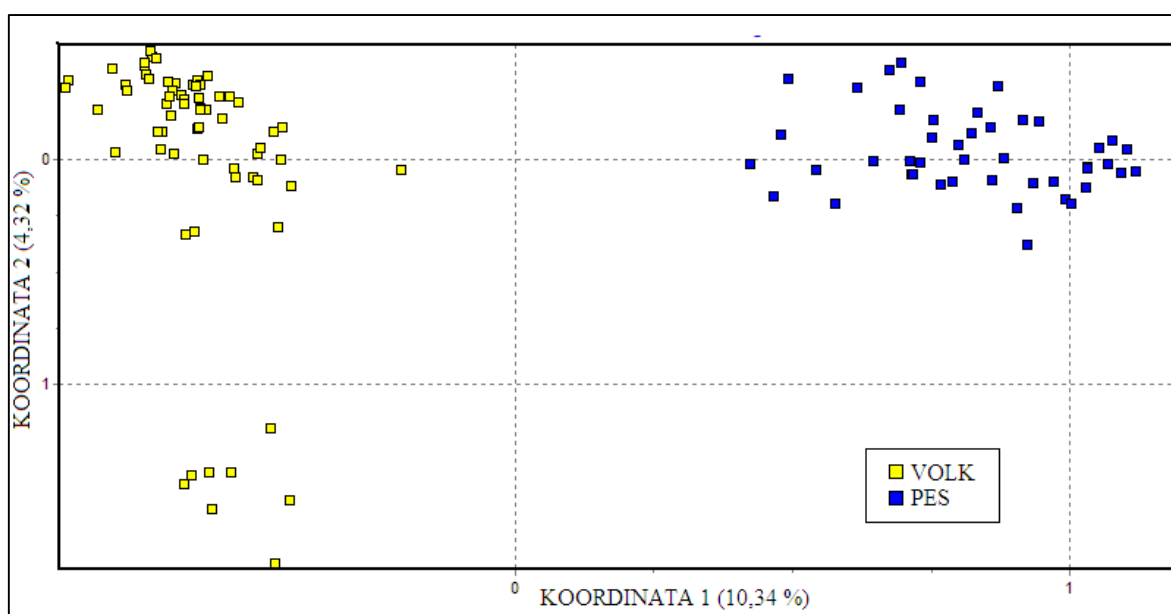
Preglednica 5: Primerjava specifičnih alelov pri volkovih in psih ter izračunane vrednosti F_{ST} za posamezne lokuse.

	LOKUS	VOLK			PES			F_{ST}
		N_{PAL}	FREKVENCA _{PAL}	P_{Ar}	N_{PAL}	FREKVENCA _{PAL}	P_{Ar}	
1	FH2848			0,001	3	0,237	3,114	0,103
	INRA21			0,051	3	0,080	2,566	0,018
	INU005	3	0,231	2,949	3	0,620	3,114	0,291
	INU030	2	0,115	1,978	1	0,152	1,057	0,132
	INU055			0,028	1	0,283	1,309	0,080
	REN162C04	2	0,254	1,888	2	0,485	3,232	0,241
	REN169D01	2	0,408	1,889	3	0,156	4,187	0,278
	REN169O18			0,159	3	0,200	2,668	0,197
	REN247M23	2	0,246	2,332	1	0,500	1,451	0,185
	REN54P11			0,445	4	0,435	3,759	0,245
	AHT121	1	0,254	1,459	6	0,591	5,649	0,163
	AHT137	1	0,146	1,328	6	0,641	5,829	0,115
	AHT171	1	0,038	0,972	5	0,620	4,848	0,136
	AHT260	4	0,423	3,093	4	0,391	3,918	0,097
	AHTk211			0,067	3	0,620	2,974	0,258
	AHTk253			0,441	3	0,239	3,104	0,269
	CXX279	1	0,023	1,128	3	0,433	3,107	0,099
	FH2054			0,215	2	0,065	2,707	0,251
2	VWF	3	0,185	2,901	3	0,696	2,832	0,255
	FH2137	3	0,377	4,015	12	0,696	10,472	0,080
	Cxx_123	3	0,241	3,001			0,000	0,073
	CPH22	1	0,015	1,002			0,037	0,295
3	CPH2			1,935	1	0,315	1,161	0,111
	CPH4			0,300	3	0,076	2,225	0,297
	CPH6	1	0,008	0,817	8	0,727	7,343	0,403
	FH2004	4	0,269	3,948	8	0,424	6,105	0,142
	FH2088	1	0,046	0,965	3	0,089	2,568	0,121
	FH2096			0,010	1	0,011	1,172	0,264
4	C09_250			0,144	3	0,076	3,109	0,043
	C20_253	1	0,238	1,262	2	0,120	2,129	0,209
	CPH12	2	0,331	1,936	3	0,174	2,174	0,123
	CPH5			0,172			0,119	0,251
	CPH7			0,273	2	0,141	2,191	0,055
	CPH8	1	0,015	0,663	2	0,022	1,716	0,056
	CPH9	2	0,408	2,066	4	0,902	4,059	0,320
	Cxx_121	1	0,246	1,443	7	0,587	5,951	0,166
	FH2010	2	0,192	1,873	1	0,293	1,551	0,125
	FH2145	1	0,008	0,999	9	0,433	8,933	0,179

* 1 – MultiFinn, 2 – MultiF, 3 – MultiE, 4 – MultiD, N_{PAL} – število specifičnih alelov na lokusu, FREKVENCA_{PAL} – frekvenca specifičnih alelov na lokusu, P_{Ar} – pestrost specifičnih alelov, F_{ST} – fiksacijski indeks

3.3 ANALIZA GENETSKE RAZLIČNOSTI MED VOLKOVI IN PSI

Rezultat FCA je prikazan na sliki 3. Koordinati 1 in 2 prikazujeta odstotek skupne variabilnosti frekvenc alelov na vseh lokusih. Posamezni osebki so označeni z obarvanimi kvadrati. Koordinata 1 prikazuje razliknost med volkovi in psi, koordinata 2 pa variabilnost med osebki znotraj skupine. Volkovi so na sliki 3 razdeljeni v dve ločeni skupini, kar je najverjetneje posledica velikih genetskih razlik med posameznimi tropi v Sloveniji. Na osnovi FCA nismo mogli potrditi prisotnosti križancev med našimi vzorci. Obe osi sta skupaj razložili 14,66 % celotne genetske variabilnosti.



Slika 3: Razporeditev genotipov volkov in psov na podlagi FCA.

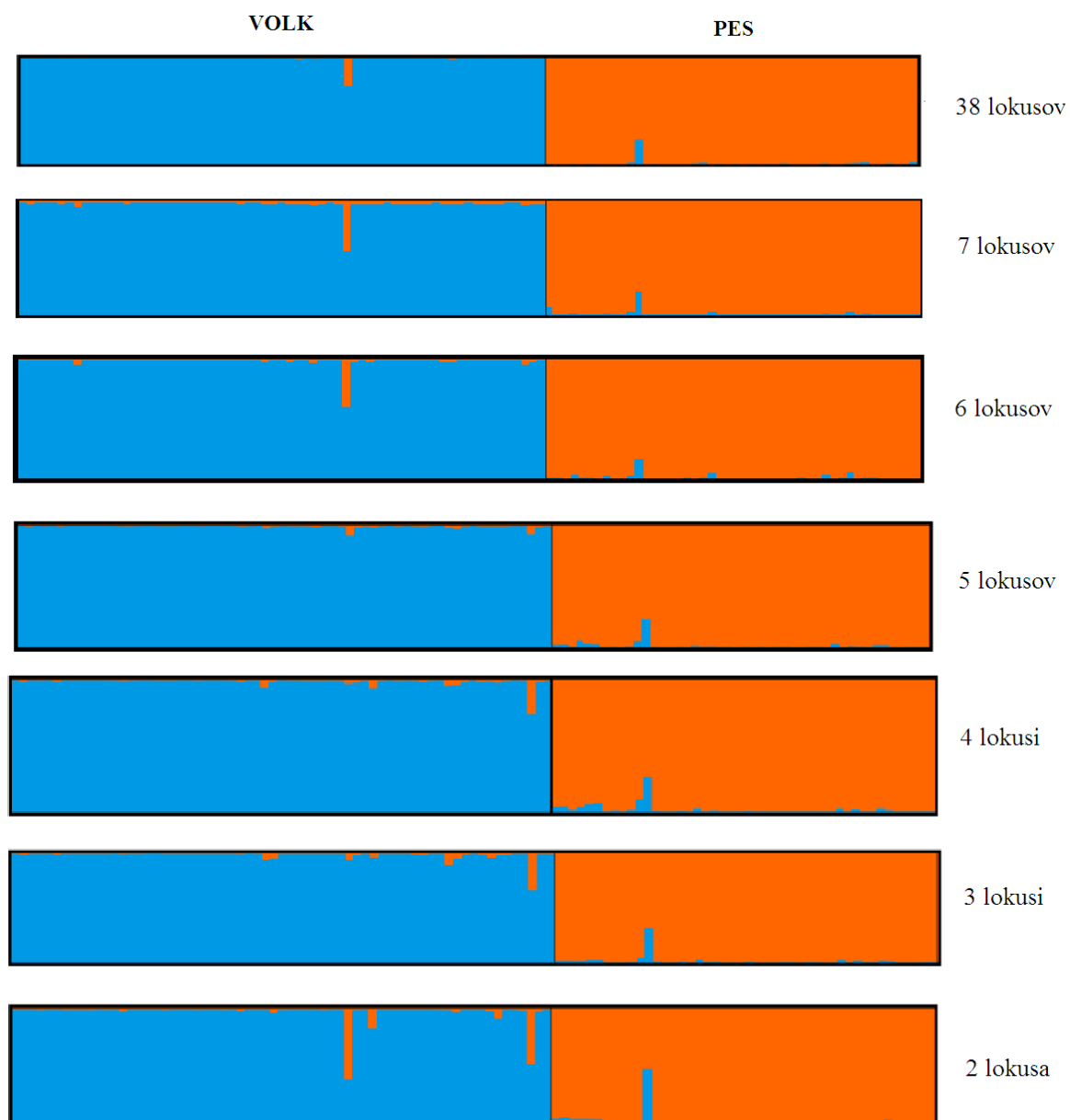
Z računalniškim programom Structure 2.3 (Pritchard in sod., 2010) smo določili število skupin in uvrstili vzorce v skupine. Z 38 avtosomalnimi lokusi smo uvrstili 111 vzorcev z vnaprej določenimi oznakami pripadnosti (65 volkov in 46 psov). Z metodo ΔK (Evanno in sod., 2005) smo določili K na podlagi izračuna verjetnosti, da naši vzorci tvorijo od ene do pet skupin. Določili smo dve skupini ($K = 2$). Rezultat analize je prikazan na sliki 4, kjer vsak stolpec predstavlja posamezni osebek.

Na podlagi najvišjih vrednosti F_{ST} smo izbrali 7 lokusov. Ponovili smo Bayesovo analizo združevanja v skupine z računalniškim programom Structure 2.3, ki smo jo naredili z vsemi 38 lokusi. Kot prikazuje slika 4, smo lahko na podlagi dveh lokusov (CPH6 in CPH9) osebkke uspešno uvrstili v izvirno skupino. Lokusa CPH6 in CPH9 sta imela najvišji vrednosti F_{ST} in najvišji skupni frekvenci specifičnih alelov pri psih. Lokus CPH9 je imel pri volkovih najvišjo skupno frekvenco specifičnih alelov, CPH6 pa najnižjo. Osebkke so sicer kazali določeno stopnjo mešanega genotipa, kljub temu pa bi lahko z lokusoma CPH9 in CPH6 uvrstili kar 95 % osebkov z deležem pripadnosti izvorni skupini večjim od 0,950.

Grafična primerjava analiz je prikazana na sliki 4. Pri ponovitvi analiz smo uporabili sledeče kombinacije lokusov:

- Analiza s 7 lokusi: CPH6, CPH9, CPH22, AHTk253, REN169D01, INU005 in CPH4;
- Analiza s 6 lokusi: CPH6, CPH9, CPH22, REN169D01, INU005 in CPH4;
- Analiza s 5 lokusi: CPH6, CPH9, CPH22, INU005 in CPH4;
- Analiza s 4 lokusi: CPH6, CPH9, CPH22 in CPH4;
- Analiza s 3 lokusi: CPH6, CPH9, CPH4;
- Analiza z 2 lokusoma: CPH6, CPH9.

Uvrstitev osebkov volkov in psov je bila najzanesljivejša v primeru analize z vsemi 38 lokusi. Z manjšanjem števila lokusov se je zniževala tudi zanesljivost uvrstitve osebkov v izvirno skupino, ki pa ni bila zvezna.



Slika 4: Grafični prikaz analize z Bayesovo metodo združevanja v skupine.

Na podlagi analize z vsemi 38 avtosomalnimi lokusi je bil povprečni delež pripadnosti volkov in psov v dve vnaprej določeni skupini najvišji (za volkove 0,994 in za pse 0,992). En vzorec pri volkovih in en pri psih nakazujeta višji delež pripadnosti nasprotni skupini. Pri volkovih je ta delež 0,264 in nakazuje na pripadnost psom; pri psih pa 0,231 in nakazuje pripadnost volkovom. V preglednici 6 so prikazani povprečni deleži pripadnosti volkov in psov v izvirno skupino, za različne kombinacije lokusov.

Preglednica 6: Povprečni delež pripadnosti volkov in psov v vnaprej določene skupine z Bayesovim pristopom združevanja v skupine. Deleži pripadnosti so prikazani za različno število uporabljenih lokusov.

ŠTEVILO LOKUSOV	POVPREČEN DELEŽ	POVPREČEN DELEŽ
	PRIPADNOSTI VOLKOV IZVORNI SKUPINI	PRIPADNOSTI PSOV IZVORNI SKUPINI
38	0,994	0,992
7	0,988	0,987
6	0,987	0,987
5	0,990	0,984
4	0,983	0,979
3	0,980	0,980
2	0,967	0,974

4 RAZPRAVA IN SKLEPI

4.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo z rezultati pokazali, da lahko v slovenskem prostoru s pomočjo neinvazivnih genetskih tehnik uspešno ločimo med škodnimi primeri, ki jih povzročijo psi in škodo, ki jo povzročijo volkovi. Na podlagi naših vzorcev in rezultatov smo pokazali, da do križanja med njima v Sloveniji ne prihaja ali pa je tako redko, da ga z vzorci, ki smo jih zajeli v raziskavi nismo zaznali. V nadaljevanju razprave obravnavam primernost preizkušene metode in podajam predloge za nadaljno rutinsko uporabo v preiskovanjih povzročitelja škode na domačih rejnih živalih.

4.1.1 Vrednotenje mikrosatelitnih lokusov

Mikrosatelitske označevalce smo v naši študiji ovrednotili z različnimi statističnimi parametri in med njimi izbrali tiste, ki omogočajo zanesljivo razlikovanje med volkovi in psi na območju Slovenije. Večja odstopanja v primerjavi z drugimi raziskavami smo opazili pri izračunih frekvenc alelov, izračunu opažene in pričakovane heterozigotnosti ter vrednosti F_{ST} . Pri psih smo določili več alelov na posameznih lokusih kot pri volkovih, kar so pri analizah razlikovanja ugotovili tudi Verardi in sod. (2006) ter Randi in Lcchini (2002). V nasprotju z omenjenima raziskavama in našimi analizami so Kopaliani in sod. (2014) pri volkovih določili več alelov kot pri psih. Pri tem je potrebno upoštevati dejstvo, da so v raziskavi, ki so jo opravili Kopaliani in sod. (2014) v Gruziji, potrdili zelo visok odstotek (več kot 10 %) volčjih prednikov v vzorcih ovčarskih psov, ki so jih analizirali. Prav tako so v več kot 13 % vzorcev volkov določili ovčarskega psa kot bližnjega prednika. Na podlagi sorodstvenega indeksa si je bilo namreč kar 21 % psov v bližjem sorodstvenem odnosu z volkovi, v primerjavi s preostalimi psi. To kaže na zelo velik pretok genov in stabilno vključevanje genov v genom pri parjenju med volkovi in psi (Kopaliani in sod., 2014).

V sklopu analiz smo izračunali tudi efektivno število alelov, ki je korigirana vrednost števila alelov glede na njihovo pogostost in je mera o informativnosti lokusa. Efektivno število alelov na vseh analiziranih lokusih je bilo manjše od dejanskega števila alelov. Lokusi, na katerih so frekvence alelov pri psih in volkovih enakomerno razporejene, za ločevanje niso primerni. Za ločevanje volkov in psov so primerni predvsem aleli, ki se pojavljajo samo pri psih oziroma samo pri volkovih in da so le-ti prisotni pri večini vzorcev. Frekvence alelov pri volkovih in psih so bile enakomerno razporejene le na lokusu CPH5, na vseh ostalih lokusih pa smo določili specifične alele. Lokus CPH5 zato za razlikovanje ni bil ustrezen. Alele, specifične samo za pse smo našli na 35 lokusih, pri volkovih pa na 24 lokusih, od skupno 38 analiziranih lokusov. Specifični aleli so bili pri psih zastopani v višji frekvenci kot pri volkovih, o čemer so poročali tudi Godinho in sod. (2011). Zaradi različnega števila osebkov, smo izračunali korigirano vrednost privatnih alelov, ki nam je podala bolj primerljive vrednosti med volkovi in psi.

Heterozigotnost je mera genetske raznolikosti populacije. Nizka heterozigotnost je pokazatelj izgube genetske raznolikosti in je značilna za majhne izolirane populacije, lahko pa je tudi posledica parjenja v sorodstvu (Frankham in sod., 2002). Pri izolaciji DNA iz neinvazivnih vzorcev je lahko nizka koncentracija DNA razlog za pojavljanje lažnih alelov oziroma izpada alelov. Posledično lahko dobimo napake pri izračunih opažene in pričakovane heterozigotnosti (Taberlet in Luikart, 1999). Opaženo in pričakovano heterozigotnost smo izračunali ločeno za volkove in pse. Pri volkovih je bila povprečna pričakovana heterozigotnost podobna opaženi, pri psih pa je bila razlika večja. Pri obeh je bila povprečna pričakovana heterozigotnost višja od opažene, čeprav je bilo na posameznih lokusih tudi obratno. Naši rezultati so primerljivi z rezultati raziskave, ki so jo opravili Caniglia in sod. (2014). V svoji študiji so prav tako opazili veliko razliko med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo pri psih in majhno razliko pri volkovih (Caniglia in sod., 2014). Zanimiva je primerjava z raziskavo, ki so jo opravili Verardi in sod. (2006). Na lokusu C20_253, ki smo ga uporabili tudi v naših analizah, so pri volkovih izračunali najnižjo pričakovano heterozigotnost (0,11) (Verardi in sod., 2006). Mi smo na tem lokusu izračunali vrednost, ki je bila med najvišjimi (0,803). Najvišja pričakovana heterozigotnost je bila tudi v njihovi raziskavi pri psih (Verardi in sod., 2006), vendar na drugem lokusu kot pri nas.

4.1.2 Primernost izbranih lokusov za genetsko ločevanje volkov in psov

Jakobsson in sod. (2013) so proučili korelacijo med vrednostjo F_{ST} in frekvenco najpogostejših alelov, saj naj bi bil razpon vrednosti F_{ST} omejen prav s porazdelitvijo frekvenc alelov. Vrednost F_{ST} se pogosto uporablja pri analizah razlik med posameznimi skupinami. Razlike med našimi vzorci so bile primerljive z raziskavo, ki so jo opravili v Španiji (Godinho in sod., 2011). Raziskava v Gruziji, kjer so izračunali razliko med lokalno volčjo populacijo in psi, ki varujejo domače živali, je pokazala zelo majhno razliko vrednosti F_{ST} med volkovi in psi (0,0637). Med njihovimi vzorci volkov in psov, so na podlagi analiz mtDNA zaznali stabilno vključevanje pasjih genov v volčji genom (Kopaliani in sod., 2014), kar je lahko vzrok visoke variabilnosti. Na podlagi izračuna vrednosti F_{ST} lahko potrdimo, da so volkovi in psi, ki so bili zajeti v naši raziskavi, genetsko različni.

Rezultat FCA na sliki 3 prikazuje celotno genetsko variabilnost, ki pa je višja kot v raziskavi, ki so jo opravili Godinho in sod. (2011), kjer je bila 8,7 %. Nižji odstotek variabilnosti je lahko posledica prisotnosti hibridnih osebkov in posledično mešanih genotipov v njihovi raziskavi. Na podlagi pomnoženih lokusov smo v naši študiji dobili jasno ločitev med volkovi in psi, brez prekrivanja skupin točk. Zanimiva pa je razporeditev točk, s katerimi so označeni volkovi, saj je na sliki 3 razvidno, da so si tropi volkov v Sloveniji različni. Skupina osmih volkov, ki na sliki izstopa, je verjetno priseljena, saj so osebki sorodstveno povezani. V tej skupini sta namreč tudi volkova Tonka in Vojko, ki sta bila med projektom Life+ SloWolf odlovljena in opremljena s telemetrično ovratnico (Potočnik in sod., 2014). Za Tonko in Vojka so v predhodnih genetskih analizah potrdili, da sta iz istega legla. V tej skupini osmih volkov pa so tudi trije Tonkini mladiči, zato lahko tudi za preostale tri osebke predvidevamo, da so v sorodstvenih odnosi s petimi, zgoraj omenjenimi volkovi. Glede na veliko odstopanje te skupine, lahko tudi predvidevamo, da so ti volkovi tropa Vremščica-Nanos priseljeni iz tropov sosednjih držav.

Ločitev volkov in psov v dve skupini smo potrdili tudi z Bayesovo metodo združevanja v skupine. Ločitev v dve skupini na podlagi analize je bila jasna. Raziskovalci, ki so proučevali razlike med volkovi, psi in hibridi so večinoma delali z manjšim številom lokusov, zato nas je zanimalo najmanjše število lokusov s katerimi bi lahko še zanesljivo ločili volka in psa. Sundqvist in sod. (2008) je v svoji raziskavi ugotovil, da se lahko na podlagi šestih mikrosatelitnih lokusov zanesljivo loči volkove in pse, vendar v primeru več lokusov dobimo boljšo ločitev. Z našimi analizami smo prav tako potrdili zanesljivejšo določitev deleža pripadnosti z več lokusi.

4.1.3 Pojav in pogostost križanja pri slovenskih volkovi in psih

Pojav križanja med volkovi in psi je pereč problem v drugih Evropskih državah (Andersone in sod., 2002; Godinho in sod., 2011; Hindrikson in sod., 2012; Lorenzini in sod., 2014). Na podlagi FCA (Slika 3) ne moremo potrditi prisotnosti križancev med našimi vzorci. V primeru hibridnih osebkov z mešanimi genotipi, bi na grafu križance opazili kot prekrivanje točk obeh skupin. Z Bayesovo metodo smo pri dveh vzorcih dobili mešane genotipe z določeno stopnjo pripadnosti nasprotni skupini. V okviru projekta Life+ SloWolf so opravili obširnejšo študijo severozahodne Dinarske populacije volkov in ugotovili, da v Sloveniji pojava križanja med volkom in psom praktično ni. Opazili pa so, da lahko volkove iz drugih populacij zaznamo podobno kot križance med hibridom in volkom (Potočnik in sod., 2014). Med našimi pasjimi vzorci smo imeli tudi češkoslovaške volčjake, vendar smo vse te vzorce z visoko stopnjo pripadnosti uvrstili med pse.

4.1.4 Predlogi za nadaljno rutinsko uporabo metode v veterinarsko-forenzičnih preiskavah

Z našo analizo smo potrdili primernost lokusov za razlikovanje med volkovi in psi. V primeru rutinske uporabe metode, bi bilo smiselno optimizirati PCR protokol za manjše število lokusov, s čimer bi se zmanjšali tudi stroški analize. V naši raziskavi so bili namreč za razlikovanje genotipov najustreznejši lokusi iz vseh štirih hkratnih PCR, ki imajo različne temperature prileganja v začetni fazi PCR.

Smiselno bi bilo tudi preveriti postopek določevanja vrst s pregledovanjem genotipov in iskanjem specifičnih alelov, ki smo jih našli samo pri volkovih ali samo pri psih, v visokih frekvencah. S tem pristopom bi zmanjšali čas analiziranja vzorcev, saj so analize z računalniškimi programi, kot je Structure 2.3 (Pritchard in sod., 2010), dolgotrajne. Za takšen način ločevanja, bi bilo potrebno testirati metodo na velikem podatkovnem setu, da bi lahko z zagotovostjo tudi naprej določevali povzročitelja škode.

4.2 SKLEPI

Za namen genotipizacije so se mešički dlak izkazali kot ustezen vir DNA v primeru pravilnega vzorčenja. To pomeni, da so izpuljene dlake skupaj z mešički in pazljivosti pri izolaciji ter pomnoževanju DNA.

Vseh 38 izbranih avtosomálnih mikrosatelitnih lokusov (AHT121, AHT137, AHT171, AHT260, AHTk211, AHTk253, CXX279, FH2054, FH2848, INRA21, INU005, INU030, INU055, REN162C04, REN169D01, REN169O18, REN247M23, REN54P11, C09_250, C20_253, CPH12, CPH5, CPH7, CPH8, CPH9, Cxx_121, FH2145, CPH2, CPH4, CPH6, FH2088, FH2096, FH2137, CPH22, FH2004, FH2137, FH2145, VWF) je primernih za genetsko ločevanje med volkovi in psi v slovenskem prostoru.

Kot najmanj primerni mikrosatelitni lokusi za genetsko razlikovanje med volkovi in psi so se pri naših analizah izkazali: CPH5, INRA21, INU055, AHT260, CXX279, FH2137, CPH22, C09_250, CPH7 in CPH8. Ti lokusi so imeli nizko skupno frekvenco specifičnih alelov in najnižje vrednosti F_{ST} .

Za razlikovanje med volkovi in psi je najbolj primernih 7 mikrosatelitnih lokusov: CPH6, CPH9, CPH22, AHTk253, REN169D01, INU005 in CPH4.

Na podlagi dveh lokusov, CPH6 in CPH9, smo 95 % osebkov uspešno določili delež pripadnosti, izvorni skupini, večjim od 0,95. Z uporabo več analiziranih mikrosatelitnih lokusov smo dobili zanesljivejšo uvrstitev, z večjim deležem pripadnosti izvorni skupini.

Na osnovi naših analiz prisotnosti križancev med volkovi in psi v Sloveniji ne moremo zanesljivo potrditi.

5 POVZETEK

Napadi volkov na domače pašne živali predstavljajo pereč problem na praktično vseh območjih pojavljanja volka. Za pokole drobnice so lahko odgovorni tudi psi, vendar se vsa škoda, ki nastane v živinoreji zaradi napadov v veliki meri pripisuje volkovom. Sistem kompenzacij škod je usmerjen v povračilo stroškov za nastalo škodo le v primeru, če je povzročitelj napada volk. Posledično je pravilna identifikacija povzročiteljev napadov tudi v ekonomskem interesu države in ključna za korektno varstvo in upravljanje z volkovi v Sloveniji.

Biološke sledi, ki jih napadalec pusti na kadavru in v okolici napada, navadno niso dovolj jasne za zanesljivo identifikacijo povzročitelja napada. Cilj diplomske naloge je bil vzpostavitev genetske metode, ki bi omogočila zanesljivo identifikacijo in razlikovanje med volkom in psom.

Z izbranimi 38 avtosomalnimi mikrosatelitnimi lokusi smo pomnožili tarčne odseke DNA, ki smo jo izolirali iz dlak psov, s sekvenatorjem določili dolžine alelov in jih ovrednotili z ustreznimi računalniškimi programskimi orodji. Za primerjavo smo izbrali genotipe določene iz vzorcev dlak in slin psov in vzorcev volčjih tkiv.

Z različnimi statističnimi pristopi smo ovrednotili nabor mikrosatelitnih lokusov in izbrali tiste, ki so najbolj primerni za ločevanje med volkovi in psi. Vrednost F_{ST} in frekvence specifičnih alelov sta bila parametra, ki sta nam omogočila oceno genetskih razlik med volkovi in psi na posameznih analiziranih lokusih. S faktorsko korespondenčno analizo smo uspešno določili razlike med psi in volkovi in določili dve jasni skupini, kar smo potrdili tudi z Bayesovim pristopom združevanja v skupine. V sklopu diplomske naloge smo tako razvili in optimizirali postopek za uspešno genetsko razlikovanje med volkom in psom na območju Slovenije.

6 LITERATURA

- Andersen L. W., Harms V., Caniglia R., Czarnomska S.D., Fabbri E., Jędrzejewska B., Kluth G., Madsen A.B., Nowak C., Pertoldi C., Randi E., Reinhardt I., Stronen A.V. 2015. Long-distance dispersal of a wolf, *Canis lupus*, in northwestern Europe. *Mammal Research*, 60, 2: 163-168
- Andersone 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, 2: 79-90
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Boitani L. 2000. Action Plan for the conservation of wolves in Europe (*Canis lupus*). Nature and Environment Series, no. 113: Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Strasbourg, Council of Europe: 81 str.
- 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, 3: 397-404
- Chambers G.K., MacAvoy E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126, 4: 455-476
- Coppinger R., Coppinger L. 2005. Livestock guarding dogs: from the transhumance to prezygotic selection. *Carnivore Damage Prevention News*, 9: 2-8
- Černe R., Jerina K., Jonozovič M., Kavčič I., Stergar M., Krofel M., Marenče M., Potočnik H. 2010. Škode od volkov v Sloveniji (Analiza v okviru projekta LIFE+ SloWolf Akcija A4).
<http://www.volkovi.si/wp-content/uploads/2014/10/2010-cerne-et-al.-analiza-skod-po-volkovih.pdf> (15. feb. 2015)
- Černe R., Krofel M., Jonozovič M., Sila A., Potočnik H., Marenče M., Molinari P. 2011. Prepoznavanje znakov prisotnosti in plenjenja večjih zveri. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije: 77 str.
- DeYoung R.W., Honeycutt R.L. 2005. The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management*, 69, 4: 1362-1384

- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 8: 2611-2620
- Fabbri E., Miquel C., Lucchini V. 2007. From the Apennines to the Alps: Colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology*, 16, 8: 1661-1671
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. New York, Cambridge University Press: 617 str.
- Frantz L.A., Mullin V.E., Pionnier-Captain M., Labrasseur O., Olliver M., Perri A., Linderholm A., Mattiangeli V., Teasdale M.D., Dimopoulos E.A., Tresset A., Duffraisse M., McCormick F., Bartosiewicz L., Gál E., Nyerges É.A., Sablin M.V., Bréhard S., Mashkour M., Bălăsescu A., Gillet B., Hughes S., Chassaing O., Hitte C., Vigne J.D., Dobney K., Hänni C., Bradley D.G., Larson G. 2016. Genomic and archeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science*, 352, 3290:1228-1231
- Ghatak S., Muthukumaran R.B., Nachimuthu S.K. 2013. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*, 24, 4: 224-231
- Goudet J. 2001. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)
<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (10. maj 2016)
- Godinho R., Llaneza L., Blanco J.C., Lopes S., Álvares F., García E.J., Palacios V., Cortés Y., Tategón J., Ferrand N. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20, 24: 5154-5166
- Goodwin W., Linacre A., Hadi S. 2007. *An introduction to forensic genetics*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd: 170 str.
- Gottelli D., Sillero-Zubiri C., Applebaum G.D., Roy 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

- 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., Myslajek R.W., Nowak S., Pilot M., Randi E., Reinhardt Lupus I., Smietana W., Szewczyk M., Taberlet P., Vilá C., Munoz-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
- Hedrick P.W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53, 2: 313-318
- 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: 1-12
- Jacobson M., Edge M.D., Rosenberg N.A. 2013. The relationship Between F_{ST} and the Frequency of the Most Frequent Allele. *Genetics*, 193, 2: 515-528
- Jarne P., Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to population and back. *Tree*, 11, 10: 424-429
- Jonozovič M. 2003. Strokovno izhodišče za vzpostavljjanje omrežja NATURA 2000: VOLK (*Canis lupus* L.). Ljubljana 2003.
http://www.natura2000.si/uploads/tx_library/volk.pdf (5. feb. 2014)
- Kaczensky P., Chapron G., von Arx M., Huber D., Andrén H., Linnell J. 2012. Status, Management and Distribution of Large Carnivores – Bear, Lynx, Wolf & Wolverine in Europe - Part 1.
http://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/carnivores/pdf/task_1_part_1_statusoflaineurope.pdf (15. feb. 2015)
- Kalinowski S.T. 2005. HP – Rare: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology*, 14, 1: 187-189
- Kopaliani N., Shakarashvili M., Gurielidze Z., Qurhuli T., Tarkhnishvili D. 2014. Gene flow between wolf and shepherddog populations in Georgia (Caucasus). *Journal of Heredity*, 105, 3: 345-353
- Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N.A., Mayrose I. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15, 5: 1179-1191
- Krofel M., Černe R., Jerina K. 2011. Učinkovitost odstrela volkov (*Canis lupus*) kot ukrepa za zmanjševanje škode na domačih živalih. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 95: 11-22

- Krofel M., Kos I. 2010. Analiza vsebine iztrebkov volka (*Canis lupus*) v Sloveniji. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 91: 85-88
- 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
- Leon T. 2012. Razvoj postopka za dokazovanje plenilcev drobnice iz DNA. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Oddelek za biologijo: 54 str.
- Lorenzini R., Fanelli R., Grifono G., Scholl F., Fico R. 2014. Wolf–dog crossbreeding: “Smelling” a hybrid may not be easy. Mammalian Biology, 79, 2: 149-156
- Marenče, M., 2010. Kako je z veliki zvermi v Triglavskem narodnem parku. Lovec, 5: 248-251
- Marinko U., Majič-Skrbinšek A. 2011. Raziskava odnosa rejcev drobnice, lovcev in širše javnosti do volka in upravljanja z njim – Končno poročilo akcije A.6 projekta LIFE+ SloWolf, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo: 142 str.
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, 7, 5: 639-655
- Mech L.D., Boitani L. 2003. Wolves: behavior, ecology, and conservation. Chicago, University of Chicago Press: 472 str.
- Ostrander E.A., Wayne R.K. 2005. The canine genome. Genome research, 15, 12: 1706-1716
- Pang J.F., Kluetsch C., Zou X.J. Zhang A.B., Luo L.Y., Angebly H., Ardlan A., Ekström C., Skölleremo A., Lundeberg J., Matsumura S., Leitner T., Zhang Y.P., Savolainen P. 2009. mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze river, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. Molecular Biology and Evolution, 26, 12: 2849-2864
- Parker H.G., Kim L.V., Sutter N.B., Carlson S., Lorentzen T.D., Malek T.B., Johnson G.S., DeFrance H.B., Ostrander E.A., Kruglyak L. 2004. Genetic structure of the purebred domestic dog. Science, 304, 5674: 1160-1164
- Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. Bioinformatics, 18, 19: 2537-2539

- Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews*, 6, 11: 1-14
- Potočnik H., Krofel M., Skrbinšek T., Ražen N., Jelenčič M., Kljun F., Žele D., Vengušt G., Kos I. 2014. Spremljanje populacije volka v Sloveniji (3) 1., 2. in 3. sezona – 2010/11, 2011/12 in 2012/13. Projektno poročilo za Akcijo C1 (LIFE08 NAT/SLO/000244 Slo Wolf): 63 str.
http://www.volkovi.si/wp-content/uploads/2014/10/porocilo_c1_koncno.pdf (15. maj 2016)
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.J. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 2: 945-959
- Randi E. 2011. Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Review*, 41, 2: 99-111
- 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, 1: 29-43
- Rymer J.M., Simberloff D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 27, 1: 83-109
- Savolainen P., Zhang Y., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298, 5598: 1610-1613
- Selkoe K.A., Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9, 5: 615-629
- Skrbinšek T., Potočnik H., Kos I., Trontelj P. 2007. Varstvena genetika medveda. Končno poročilo projekta »Varstvena genetika medveda, risa in jelenjadi v Sloveniji«, Ljubljana, 49 str.
http://web.bf.uni-lj.si/bi/zoologija/peter_trontelj/PDFs/vg_medveda_in_risa_2004-2007-koncno.pdf (5. feb. 2014)
- Sundqvist A.K., Ellegren H., Oliver M., Vilà C. 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian Wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 10, 8:1959-66
- Sundqvist A.K., Ellegren H., Vilà C. 2008. Wolf or dog? Genetic identification of predators from saliva collected around bite wounds on prey. *Conservation Genetics*, 9, 5: 1275-1279

- Taberlet P., Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 1-2: 41-55
- Taberlet P., Waits L.P., Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Tree*, 14, 8: 323-327
- 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, 5319: 1687-1689
- Vilá C., Wayne R.K. 1999. Hybridization between wolves and dogs. *Conservation Biology*, 13, 1: 195-198
- Waits L.P., Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, 69, 4: 1419-1433
- 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

ZAHVALA

Hvala mentorju prof. dr. Petru Trontlju za pomoč in nasvete pri pisanju diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem tudi recenzentu izr. prof. dr. Rudiju Verovniku in predsedniku komisije izr. prof. dr. Ivanu Kosu.

Hvala Maji Jelenčič in Tomažu Skrbinšku za tehnično pomoč pri laboratorijskem delu, za vse nasvete in predloge. Hvala tudi celi skupini za ekologijo živali, super ste.

Hvala prijateljem, cimrom in sošolcem za vse kar smo preživeli skupaj.

Bolha, hvala za “brco v rit”, konstruktivne debate, pomoč, razumevanje in moralno podporo v celonočnih študijskih podvigih. Brez tebe mi ne bi uspelo.

Posebna zahvala gre seveda družini. Hvala za potrpljenje in podporo.

PRILOGE

Priloga A:

Podatki o vzorcih psov.

Laboratorijska oznaka	Tip vzorca	Datum odvzema vzorca	Obarvanost	Velikost psa	Pasma psa	Ime
AH.02UT	slina					Dudi
AH.02X0	slina					Sila
CT.0YCE	slina					Jaron
CT.0YCL	slina					Ula
CT.0YCM	slina					Ala
CT.0YCP	slina					Jazon
CT.0YCT	slina					Jopa
CT.0YCY	dlaka	24.avg.10	Črno rjav	Velik	Nemški ovčar	Ron
CT.0YE2	dlaka	24.nov.10	Črna	Zelo velik	Črni ruski terier	Flora
CT.0YE3	dlaka	16.jul.10	Trikolor	Velik	Škotski ovčar	Luna
CT.0YE7	dlaka	19.nov.10	Sivo rjav	Velik	Mešanec: Nemški ovčar x Šarplaninec	Bear
CT.0YEA	dlaka					
CT.0YEC	dlaka	14.okt.10	Črna	Velik	Labradorec	Tor
CT.0YEF	dlaka	19.okt.10	Črno rjava	Velik	Črno rjava	Rona
CT.0YEJ	dlaka	23.nov.10	Črno rjava	Velik	Mešanec: Am. Stafford x Nemški ovčar	Sila
CT.0YEL	dlaka	7.dec.10	Črno rjava	Velik	Nemški ovčar	Lola
CT.0YEM	dlaka	6.okt.10	/	Srednji	Mešanec	Džoni
CT.0YEP	dlaka	8.dec.10	Črno rjava	Velik	Nemški ovčar	Reks
CT.0YEU	dlaka	20.okt.10	Črno, rjava, bela	Zelo velik	Bernski planšar	Ron
CT.0YFY	dlaka	24.avg.10	Rumeno rjava	Srednji	Mešanec	Šeli
CT.0YF0	dlaka	17.sep.10	Črna z rjavimi ožigi	Zelo velik	Beauceron	Rolf
CT.0YF1	dlaka	19.nov.10	Svetlo rjava	Velik	Zlati prinašalec	Aron
CT.0YF2	dlaka	21.dec.10	Rjava	Velik	Mešanec: Belgijski ovčar x Nemški ovčar	Medo
CT.0YF3	dlaka	6.jul.10	Čokoladno rjava	Velik	Mešanec: Am. Stafford	Brina
CT.0YF8	dlaka				Češkoslovaški volčjak	
CT.0YFA	dlaka				Češkoslovaški volčjak	
CT.0YFE	dlaka					
CT.0YFH	dlaka				Češkoslovaški volčjak	
CT.0YFL	dlaka				Češkoslovaški volčjak	
CT.0YFM	dlaka					
CT.0YFP	dlaka					
CT.0YFT	dlaka					

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Podatki o vzorcih psov.

Laboratorijska oznaka	Tip vzorca	Datum odvzema vzorca	Obarvanost	Velikost psa	Pasma psa	Ime
CT.0YFU	dlaka					
CT.0YFX	dlaka	24.apr.10	Rjav, črne lise	Velik	Bokser	Oro
CT.0YH1	dlaka	24.apr.10	črna	Velik	Mešanec: N.ovčar x novofundlanec	Skaj
CT.0YHC	dlaka	24.apr.10	Črno rjav	Velik	Mešanec:N. Ovčar x ?	Reks
CT.0YHH	dlaka	24.apr.10	Črno siv	Zelo velik	Irski volčji hrt	Tara
CT.0YHP	dlaka	19.apr.10	Črna	Zelo velik	Mešanec	Ares
CT.0YJ3	dlaka					
CT.0YJC	dlaka	24.apr.10	Črno rjav	Velik	Mešanec	Runo
CT.0YJX	dlaka	19.apr.10	Črno - bel	Velik	Mešanec	Taček
CT.0YJY	dlaka	19.apr.10	Črno - rjav	Velik	Mešanec	Maks
CT.0YK3	dlaka	21.apr.10	Svetla, rumena	Velik	Meš: Zlati prinašalec x Labradorec	Riki
CT.0YK7	dlaka	21.apr.10	Črno - rjava	Zelo velik	Meš: Doga x N. ovčar	Švrk
CT.0YKH	dlaka	19.apr.10	Črno - rjav	Velik	Mešanec	Reksi
CT.0YKM	dlaka	21.apr.10	Črna, bela lisa	Velik	Mešanec	Lola

Priloga B:

Frekvence alelov na posameznih lokusih za volkove in pse.

Lokus	Alel (bp)	Volkovi	Psi	Lokus	Alel (bp)	Volkovi	Psi
FH2848 N		65	38	INU055 N		65	46
	228	0,000	0,026		198	0,485	0,337
	230	0,231	0,132		200	0,185	0,043
	232	0,262	0,079		202	0,277	0,174
	234	0,223	0,079		204	0,031	0,087
	236	0,262	0,145		206	0,000	0,283
	238	0,023	0,329		208	0,023	0,076
	240	0,000	0,145	REN162C04 N		65	34
INRA21 N	242	0,000	0,066		190	0,031	0,000
		65	44		196	0,223	0,000
	88	0,000	0,034		200	0,008	0,059
	90	0,000	0,011		202	0,692	0,250
	92	0,146	0,273		204	0,038	0,147
	94	0,000	0,034		206	0,000	0,294
	96	0,315	0,227		208	0,008	0,059
	98	0,500	0,386		212	0,000	0,191
INU005 N	100	0,038	0,034	REN169D01 N		65	45
		65	46		198	0,308	0,022
	110	0,077	0,163		200	0,015	0,000
	112	0,138	0,000		204	0,392	0,000
	118	0,031	0,000		206	0,000	0,078
	120	0,062	0,000		208	0,008	0,333
	122	0,046	0,065		210	0,023	0,033
	124	0,638	0,130		212	0,008	0,411
INU030 N	126	0,000	0,467	REN169O18 N		65	45
	128	0,000	0,141		154	0,000	0,056
	130	0,000	0,011		156	0,162	0,022
	132	0,008	0,022		158	0,062	0,433
		65	46		160	0,000	0,133
	139	0,062	0,000		162	0,162	0,089
	141	0,054	0,000		164	0,577	0,178
	143	0,338	0,174		166	0,038	0,078
	145	0,446	0,217		174	0,000	0,011
	147	0,046	0,054				
	149	0,054	0,402				
	151	0,000	0,152				

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Frekvence alelov na posameznih lokusih za volkove in pse.

Lokus	Alel (bp)	Volkovi	Psi	Lokus	Alel (bp)	Volkovi	Psi
REN247M23	N	65	35	REN54P11	N	65	46
	267	0,162	0,000		223	0,000	0,054
	269	0,000	0,500		227	0,000	0,315
	271	0,200	0,300		229	0,000	0,054
	273	0,108	0,129		231	0,000	0,011
	275	0,008	0,014		233	0,108	0,120
	277	0,208	0,014		235	0,108	0,337
	279	0,231	0,043		237	0,569	0,054
	281	0,085	0,000		239	0,192	0,011
AHT121	N	65	44		241	0,023	0,043
	82	0,254	0,000	AHTh260	N	65	46
	92	0,108	0,023		232	0,115	0,000
	94	0,000	0,011		236	0,100	0,272
	96	0,000	0,045		238	0,123	0,065
	98	0,023	0,182		240	0,000	0,217
	100	0,046	0,091		242	0,062	0,054
	102	0,200	0,034		243	0,285	0,000
	104	0,000	0,307		244	0,131	0,152
	106	0,354	0,068		246	0,000	0,098
	108	0,000	0,125		248	0,162	0,065
	110	0,000	0,091		250	0,000	0,043
	112	0,015	0,011		252	0,000	0,033
	114	0,000	0,011		264	0,008	0,000
AHT137	N	65	46		266	0,015	0,000
	130	0,000	0,272	AHTk253	N	65	46
	132	0,200	0,087		280	0,346	0,011
	134	0,223	0,022		284	0,346	0,043
	136	0,000	0,207		286	0,146	0,098
	138	0,031	0,022		288	0,008	0,533
	140	0,000	0,043		290	0,154	0,076
	142	0,146	0,000		292	0,000	0,196
	144	0,000	0,022		294	0,000	0,033
	146	0,169	0,174		296	0,000	0,011
	148	0,231	0,054	AHTh171	N	65	46
	150	0,000	0,033		216	0,038	0,000
	152	0,000	0,065		218	0,362	0,141
FH2010	N	65	46		222	0,000	0,174
	212	0,008	0,022		224	0,338	0,141
	216	0,169	0,000		226	0,046	0,054
	220	0,023	0,000		228	0,000	0,022
	224	0,038	0,250		230	0,215	0,043
	228	0,485	0,304		232	0,000	0,315
	232	0,277	0,130		234	0,000	0,054
	236	0,000	0,293		236	0,000	0,054

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Frekvence alelov na posameznih lokusih za volkove in pse.

Lokus		Alel (bp)	Volkovi	Psi	Lokus		Alel (bp)	Volkovi	Psi
AHTk211	N		65	46	CXX279	N		65	45
		85	0,169	0,228			114	0,000	0,244
		87	0,000	0,250			116	0,000	0,144
		89	0,623	0,120			118	0,354	0,156
		91	0,208	0,033			120	0,000	0,044
		93	0,000	0,326			122	0,223	0,222
		95	0,000	0,043			124	0,062	0,111
FH2054	N		64	31			126	0,023	0,011
		146	0,227	0,016			128	0,315	0,067
		150	0,031	0,113			134	0,023	0,000
		154	0,031	0,468	CPH22	N		65	46
		158	0,578	0,129			110	0,446	0,087
		162	0,102	0,097			112	0,315	0,837
		166	0,016	0,016			114	0,046	0,076
		170	0,016	0,097			116	0,192	0,000
		174	0,000	0,048	CPH2	N		65	46
		178	0,000	0,016			94	0,308	0,098
VWF	N		65	46			96	0,285	0,424
		142	0,062	0,000			98	0,031	0,098
		148	0,000	0,163			100	0,062	0,011
		154	0,031	0,000			102	0,077	0,033
		160	0,000	0,511			104	0,185	0,011
		166	0,400	0,261			106	0,000	0,315
		172	0,415	0,043			107	0,015	0,000
		178	0,092	0,000			110	0,038	0,011
		190	0,000	0,022	CPH4	N		65	46
CPH6	N		65	44			134	0,000	0,011
		121	0,031	0,091			140	0,000	0,011
		123	0,169	0,148			142	0,000	0,054
		125	0,000	0,068			144	0,385	0,022
		127	0,000	0,068			146	0,054	0,435
		128	0,000	0,023			148	0,069	0,402
		129	0,000	0,386			149	0,046	0,033
		130	0,015	0,011			150	0,446	0,033
		131	0,000	0,125	Cxx_123	N		27	46
		132	0,777	0,023			123	0,019	0,000
		133	0,000	0,011			131	0,148	0,000
		134	0,000	0,034			139	0,019	0,304
		138	0,000	0,011			141	0,259	0,087
		139	0,008	0,000			143	0,259	0,337
							145	0,185	0,185
							147	0,037	0,087
							151	0,074	0,000

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Frekvence alelov na posameznih lokusih za volkove in pse.

Lokus	Alel (bp)	Volkovi	Psi	Lokus	Alel (bp)	Volkovi	Psi
FH2137	N	65	46	FH2088	N	65	45
	151	0,000	0,011		94	0,046	0,000
	156	0,000	0,011		110	0,000	0,056
	157	0,000	0,033		114	0,000	0,011
	159	0,000	0,011		118	0,315	0,089
	161	0,038	0,011		122	0,177	0,078
	163	0,200	0,033		126	0,377	0,211
	164	0,000	0,065		130	0,031	0,367
	165	0,000	0,098		134	0,054	0,167
	167	0,123	0,011		138	0,000	0,022
	168	0,000	0,054	CPH5	N	65	46
	169	0,146	0,141		110	0,469	0,130
	171	0,100	0,000		112	0,069	0,065
	173	0,085	0,087		114	0,185	0,685
	175	0,131	0,000		116	0,031	0,098
	176	0,000	0,022		124	0,246	0,022
	177	0,000	0,065	CPH7	N	65	46
	179	0,031	0,022		161	0,000	0,087
	181	0,000	0,228		163	0,000	0,054
	183	0,146	0,000		165	0,508	0,261
	185	0,000	0,076		167	0,015	0,011
	188	0,000	0,022		169	0,085	0,217
FH2004	N	65	46		171	0,392	0,370
	107	0,000	0,011	CPH8	N	65	46
	111	0,023	0,272		200	0,069	0,217
	115	0,315	0,261		202	0,000	0,011
	119	0,000	0,217		208	0,492	0,457
	123	0,000	0,109		210	0,015	0,098
	147	0,069	0,000		212	0,023	0,065
	151	0,092	0,000		214	0,385	0,141
	155	0,069	0,000		216	0,000	0,011
	169	0,000	0,011		218	0,015	0,000
	171	0,038	0,000	CPH9	N	65	46
	175	0,392	0,043		140	0,000	0,391
	183	0,000	0,011		142	0,038	0,033
	187	0,000	0,043		144	0,554	0,065
	191	0,000	0,011		150	0,000	0,326
	203	0,000	0,011		152	0,000	0,076
FH2096	N	65	46		154	0,000	0,109
	98	0,138	0,054		162	0,100	0,000
	102	0,854	0,522		164	0,308	0,000
	106	0,008	0,413				
	110	0,000	0,011				

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Frekvence alelov na posameznih lokusih za volkove in pse.

Lokus	Alel (bp)	Volkovi	Psi	Lokus	Alel (bp)	Volkovi	Psi
C09_250	N	65	46	Cxx_121	N	65	46
	123	0,000	0,011		81	0,246	0,000
	127	0,008	0,196		91	0,108	0,011
	131	0,054	0,054		93	0,000	0,011
	133	0,323	0,228		95	0,000	0,043
	135	0,146	0,033		97	0,023	0,185
	137	0,308	0,261		99	0,054	0,109
	139	0,146	0,033		101	0,200	0,043
	141	0,015	0,120		103	0,000	0,304
	143	0,000	0,054		105	0,369	0,065
	147	0,000	0,011		107	0,000	0,120
C20_253	N	65	46		109	0,000	0,087
	94	0,238	0,000		111	0,000	0,011
	100	0,154	0,022		113	0,000	0,011
	102	0,200	0,043	FH2145	N	65	45
	104	0,223	0,033		272	0,000	0,078
	106	0,000	0,087		276	0,000	0,111
	108	0,162	0,641		278	0,000	0,011
	110	0,023	0,141		280	0,000	0,022
	112	0,000	0,033		281	0,162	0,022
CPH12	N	65	46		282	0,738	0,289
	193	0,000	0,152		283	0,015	0,033
	195	0,308	0,576		284	0,000	0,022
	197	0,292	0,000		286	0,000	0,122
	199	0,038	0,000		287	0,046	0,011
	205	0,362	0,250		288	0,008	0,000
	207	0,000	0,011		289	0,000	0,022
	209	0,000	0,011		290	0,023	0,144
					291	0,000	0,022
					294	0,008	0,067
					302	0,000	0,022