

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tomí LEON

**RAZVOJ POSTOPKA ZA DOKAZOVANJE  
PLENILCEV DROBNICE IZ DNA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tomi LEON

**RAZVOJ POSTOPKA ZA DOKAZOVANJE PLENILCEV DROBNICE  
IZ DNA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**OPTIMISATION OF THE PROCEDURE TO PROVE LIVESTOCK  
PREDATORS FROM DNA**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

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. Rok KOSTANJŠEK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 26.9.2012

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tomí Leon

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Dn
DK	599.742.11: 636.3 (043.2) = 163.6
KG	plenjenje drobnice/ugrizna rana/vatiranec/slina/mikrosateliti/pomnoževanje DNA
AV	LEON, Tomi
SA	TRONTELJ, Peter (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2012
IN	RAZVOJ POSTOPKA ZA DOKAZOVANJE PLENILCEV DROBNICE IZ DNA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 54 str., 10 pregl., 22 sl., 1 pril., 73 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Rast populacije volka ( <i>Canis lupus</i> ) in z njo povezano povečano plenjenje drobnice veljata v Sloveniji za aktualno problematiko, kar se odraža v motenem upravljanju in ohranjanju teh živali. Ravno tako je zaradi prepovedi usmrtitve v porasti število psov ( <i>Canis lupus familiaris</i> ), ki občasno tudi zakrivijo škodo na domačih živalih. Določitev krivca je zahtevna, zato je nujna uporaba forenzičnih tehnik. Razvili smo protokol za odvzem sline z ugrizne rane, laboratorijski protokol za ekstrakcijo in pomnoževanje DNA iz vzorcev sline z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) ter preverili uspešnost pomnoževanja in učinkovitost protokolov. Vzorce smo jemali z roba ugriza z bombažnim vatirancem, shranjenim v sušilu in namočenim v 96 % etanol. Uporabljene vatirance smo do analize hranili v plastičnih vrečkah v zamrzovalniku. Rezultati so pokazali, da padavine nimajo pričakovanega vpliva na analizo DNA, medtem ko je vpliv odvzemnega mesta, števila odvzetih vzorcev in hitrosti posredovanja ob škodnih primerih očiten. Iz porazdelitve dobljenih rezultatov glede na mesto odvzema vzorcev sumimo zgolj ubijanje živali samo pri psu, pri volku na plenjenje in hranjenje s plenom ter na mrhovinarski način prehranjevanja pri lisici. Pomembni ugotovitvi naloge sta tudi nezahtevnost učinkovitega vzorčenja sline na mestu uboja brez predhodnih izkušenj in razmeroma visok odstotek pasjih ubojev drobnice.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn  
DC 599.742.11: 636.3 (043.2) = 163.6  
CX livestock predation/bite wound/swab/saliva/microsatellites/DNA amplification  
AU LEON, Tomi  
AA TRONTELJ, Peter (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2012  
TI OPTIMISATION OF THE PROCEDURE TO PROVE LIVESTOCK PREDATORS FROM DNA  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 54 p., 10 tab., 22 fig., 1 ann., 73 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Wolf (*Canis lupus*) population growth and associated increased predation on sheep are believed to be the current problem in Slovenia, which results in bad management and conservation of these animals. Because of the ban on executions there's also increasing the number of dogs (*Canis lupus familiaris*) who occasionally commit damage on domestic animals. Since determination of the culprit on the kill site is often difficult, the application of forensic approaches is required. We have developed a protocol for the collection of saliva from bite wounds, laboratory protocol for extraction and amplification of DNA from saliva and verified the effectiveness and efficiency of the amplification protocols. Samples were taken from the edge of the bite with a cotton swab, stored in dessicant and soaked in 96 % ethanol. Used swabs were kept in plastic bags in the freezer till the analysis. The results showed that weather conditions don't have expected impact on the analysis of DNA, while the impact of the extraction site, the number of samples and speed of intervention when the attack happens is obvious. Given the distribution patterns between the two extraction sites, we suspect dog to merely kill the animal, wolf to prey and feed on its prey and fox to feed on carcasses. An important findings of our work are the simplicity of sampling without required previous experience and a relatively high percentage of canine kills detected.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 PODATKI O VRSTI.....	3
1.2 EKOLOGIJA SIVEGA VOLKA .....	3
1.2.1 RAZŠIRJENOST V EVROPI IN SLOVENIJI .....	3
1.2.2 VOLČJI TROP .....	4
1.2.3 PREHRANA.....	7
1.2.4 HABITAT.....	8
1.3 SIVI VOLK IN ČLOVEK .....	8
1.4 SIVI VOLK IN DOMAČI PES.....	9
1.5 NEINVAZIVNA GENETIKA.....	10
1.5.1 MIKROSATELITSKA DNA .....	10
<b>2 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>14</b>
2.1 PRELIMINAREN POSKUS NA DOMAČEM PSU .....	14
2.2 ZBIRANJE VZORCEV .....	15
2.3 LABORATORIJSKI PROTOKOL EKSTRAKCIJE IN POMNOŽEVANJA DNA IZ SLINE.....	17
2.3.1 EKSTRAKCIJA (IZOLACIJA) DNA IZ SLINE.....	17
2.3.2 POMNOŽEVANJE DNA.....	18
2.4 DOLOČANJE GENOTIPOV .....	20
<b>3 REZULTATI.....</b>	<b>23</b>

3.1	VPLIV VREMENSKIH RAZMER .....	26
3.2	VPLIV ČASOVNE SPREMENLJIVKE .....	28
3.3	VPLIV ODVZEMNEGA MESTA .....	29
3.4	USPEŠNOST RAZLIČNIH VZORČEVALCEV .....	32
3.5	PRIKAZ VPLIVA SPREMENLJIVK Z MODELOM LOGISTIČNE REGRESIJE.....	32
3.6	OCENA NAJMANJŠE KOLIČINE VZORCEV.....	33
<b>4</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>36</b>
4.1	GENOTIPSKU NAPAKE: .....	36
4.2	RAZVOJ PROTOKOLA ZA ODVZEM SLINE:.....	38
4.3	NABOR MIKROSATELITNIH LOKUSOV: .....	39
4.4	USPEŠNOST POMNOŽEVANJA DNA, UPORABNOST PROTOKOLOV IN PRIPOROČILA: 40	
<b>5</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>47</b>

**KAZALO PREGLEDNIC**

<b>Preglednica 1:</b> Podatki o kompletu reagentov za ekstrakcijo DNA.....	18
<b>Preglednica 2:</b> Koncentracije začetnih oligonukleotidov v hkratni verižni reakciji s polimerazo .....	19
<b>Preglednica 3:</b> Protokol PCR .....	20
<b>Preglednica 4:</b> Zbrani vzorci po regijah (Obalno-kraška regija-OK, Notranjsko-kraška regija-NK, Jugovzhodna Slovenija-JV, Goriška-GŠ, Gorenjska-GJ, Osrednjeslovenska regija-OS) .....	24
<b>Preglednica 5:</b> Izmerjene in pričakovane (v oklepaju) vrednosti hi kvadrat testa za suho in vlažno vreme.....	27
<b>Preglednica 6:</b> Vrednost hi-kvadrat ( $\chi^2$ ), stopinj prostosti (SP), odstotka tveganja ( $\alpha$ ) in hi-kvadrat pri danem odstotku tveganja ter stopinjah prostosti ( $\chi^2_{0,95}(3)$ ).....	27
<b>Preglednica 7:</b> Model multivariatne logistične regresije po »backward stepwise« načinu za spremenljivke čas, padavine in mesto odvzema (računalniški izpis SPSS) (SN-standardna napaka, IZ-interval zaupanja) .....	33
<b>Preglednica 8:</b> Model univariatne logistične regresije za spremenljivko čas (računalniški izpis SPSS) (SN-standardna napaka, IZ-interval zaupanja) .....	33
<b>Preglednica 9:</b> Verjetnost, da v najmanj enem vzorcu zaznamo živalsko vrsto v odvisnosti od števila odvzetih vzorcev .....	34
<b>Preglednica 10:</b> Prikaz potrebnega števila vzorcev za najmanj 95% verjetnost zaznave vsaj enega genotipa.....	34



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Razporeditev volka v Evropi leta 1995 (Vir: LCIE v Action plan for the conservation of wolves in Europe) .....	4
<b>Slika 2:</b> Življenjski cikel volčje populacije (P-mladiči, J-juvenilni osebki, S-subadultni osebki, Di-samotarski osebki, A-odrasli osebki, Do-dominantni osebki), vsi stadiji so v tropu razen samotarjev.....	6
<b>Slika 3:</b> Ugriz psa na rjuhi (ZG-zgornji del ugriza, SP-spodnji del ugriza, s puščicami označeni odtisi zob).....	14
<b>Slika 4:</b> Deli kozlička.....	15
<b>Slika 5:</b> Jemanje vzorca volčje sline na terenu .....	16
<b>Slika 6:</b> Jemanje vzorca volčje sline z reber (v ozadju viden plastificiran karton).....	16
<b>Slika 7:</b> Primer protokola za pripravo PCR plošče (posamezno polje predstavlja jamico na mikrotiterski plošči).....	19
<b>Slika 8:</b> Algoritem za sprejemanje in označevanje alelov v izpisu sekvenatorja v programskem orodju GeneMapper (levo spodaj razlaga opozorilnih oznak) (Skrbinšek in sod., 2007) .....	22
<b>Slika 9:</b> Shematski prikaz poteka terenskih in laboratorijskih metod, ki smo jih uporabili tekom diplomskega dela .....	23
<b>Slika 10:</b> Prikaz območja vzorčenja.....	24
<b>Slika 11:</b> Zemljevid s kraji vzorčenja .....	25
<b>Slika 12:</b> Primeri izpisov iz sekvenatorja (elektroferogramov) in označevanja alelov z različnimi opozorilnimi oznakami (c) TA - trije aleli, b) U - nejasen alel, č) P - premočno pomnožen alel, d) L - nizek alel, e) LF - nizek prvi alel, a) LS - nizek drugi alel, f) OB - alel zunaj območja).....	26
<b>Slika 13:</b> Vpliv padavin na obstojnost DNA (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije) .....	27
<b>Slika 14:</b> Delež vzorcev, za katere smo lahko določili kateri živalski vrsti pripada zaznana DNA, v odvisnosti od časa, ki je pretekel od nastanka škode do odvzema vzorca (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije) .....	28

<b>Slika 15:</b> Uspešnost PCR v odvisnosti od stopnje razpada trupla (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije) .....	29
<b>Slika 16:</b> Uspešnost pomnoževanja DNA v odvisnosti od mesta odvzema vzorca (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije) .....	29
<b>Slika 17:</b> Delež vzorcev DNA, za katere smo lahko določili kateri živalski vrsti pripada, v odvisnosti od mesta odvzema vzorca (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije).....	30
<b>Slika 18:</b> Delež živalskih vrst pri vzorcih z vratu trupla (n predstavlja število vzorcev) ...	30
<b>Slika 19:</b> Delež živalskih vrst pri vzorcih z ostalih predelov trupla (n predstavlja število vzorcev) .....	31
<b>Slika 20:</b> Primerjava uspešnosti PCR med vzorci odvzetimi s strani uslužbencev ZGS-ja in vzorčevalci s katedre za ekologijo živali (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije).....	32
<b>Slika 21:</b> Napoved uspešnosti pomnoževanja DNA (skupaj s standardnimi napakami) glede na čas, ki preteče od nastanka škodnega primera do odvzema vzorca .....	35
<b>Slika 22:</b> Primer etiketiranja vrečk in vatrancev .....	38

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Podatki o posameznih vzorcih DNA

## 1 UVOD

Sivi volk (*Canis lupus*) velja za enega izmed najbolj poznanih in raziskanih divjih vrst sesalcev. Po stoletjih preganjanj, se v zadnjem desetletju razširja po Evropi in ZDA (Mech, 1995). Volčja populacija kaže pomembno rast v Evropi predvsem na področju zahodnih Alp in Skandinaviji (Wabakken in sod., 2001). Ne glede na to je današnja družba še vedno usmerjena proti volku (Ericsson in Heberlein, 2003), kar ovira programe pospeševanja dolgoročnega preživetja populacije volka. Ohranjanje velikih mesojedcev bi bilo na daljši rok namreč uspešno samo v primeru, da bi jih ljudje sprejeli na njihovem območju (Breitenmoser, 1998).

Na območju Slovenije se v zadnjih dveh desetletjih vzreja vedno več drobnice tam, kjer je prisoten volk. Po mnenju Ministrstva za kmetijstvo in gozdarstvo v Helsinkih (2005) se omenjeni pojav odraža v povečani verjetnosti plenjenja domačih živali, kar pogosto opravičuje povečano kontrolo številčnosti volkov in vodi v konflikt z ljudmi. Sočasno pa se povečuje tudi številčnost psov (*Canis lupus familiaris*), katere je po obstoječi zakonodaji (ZZZiv-B, 2007) prepovedano usmrtiti in so občasno prav tako krivi za napade na živino. Kljub temu, da se dokaz, puščen na kraju napada, običajno razlikuje med volkom, ki je spretnejši lovec, in psom, določitev krivca ni vedno jasna. Zato je potrebna zanesljivejša metoda, kot je uporaba forenzične genetike, ki bi lahko omogočila preprostejše prepoznavanje povzročitelja. V primeru, da je volk določen za krivca napada, ki ga ni storil, je njegovo ohranjanje in upravljanje lahko moteno. Poleg tega je pravilna identifikacija plenilca lahko povezana tudi z ekonomskim interesom, saj na številnih območjih kmetje dobijo odškodnino pri izgubi živine s strani volka, ne pa psa (Sundqvist in sod., 2008).

Ocenjevanje škod, ki jih povzročijo zavarovane živalske vrste v Sloveniji, od leta 1994 vršijo pooblaščenec uslužbenci ZGS (Zavod za gozdove Slovenije). Ti na kraju škodnega primera ugotovijo in zapišejo materialne dokaze, s pomočjo cenika določijo višino odškodnine ter sklenejo pisni sporazum z oškodovancem. O izplačilu odškodnine na podlagi zapisnika in sklenjenega sporazuma odloča Agencija republike Slovenije za okolje (ARSO) (Černe in sod., 2010).

Na ranah trupel sta prisotni tako DNA plena (v obliki krvi) kot plenilca (v obliki sline) (Pilgrim in sod., 1998). Za vir DNA se uporablja slina plenilca, pri izvajanju in analiziranju vzorcev pa je potrebna previdnost. Velja uporaba varnostnih ukrepov podobnih tistim, ki so priporočeni za ostale neinvazivne DNA vzorce (iztrebki, dlake), vključujoč primerno shranjevanje ter izogibanje kontaminacije vzorcev na terenu oziroma laboratoriju in zmanjšanje genotipskih napak (Taberlet in sod., 1999). Ugotavljanje vrste temelji na mitohondrijski DNA, prisotni v pomnoženi DNA (Pilgrim in sod., 1998).

O postopku jemanja vzorcev volčje sline ni poznanega veliko oziroma so napotki razloženi nenatančno, zato smo k razvijanju protokola morali pristopiti previdno in pričeti od samega začetka. Nekaj uporabnih informacij o rokovanju s forenzičnimi vzorci smo našli v člankih (Sundqvist in sod., 2008) in knjigah (*A physician`s guide to clinical forensic medicine*, 2000; *Encyclopedia of medical genomics and proteomics*, 2005), v pomoč pa so bili tudi nasveti Jean-Marca Webra ter dr. Luce Fumagallija. Slednja imata namreč kar nekaj izkušenj na področju upravljanja z volčjo populacijo. S pridobljenimi informacijami v kombinaciji z lastnimi zamislami smo tako preko preliminarnega poskusa na domačem psu razvili primerno tehniko odvzema sline.

Pred izvedbo poskusa smo predpostavili, da mesto odvzema vzorca vpliva na verjetnost pri zaznavi več različnih živali v vzorcu, da uspešnost analize upada s časom, preteklim od napada do odvzema vzorca ter da imajo vremenske razmere, katerim je truplo izpostavljeno pred odvzemom vzorca, vpliv na kvaliteto DNA in uspešnost analize.

## 1.1 PODATKI O VRSTI

**Strokovno ime:** *Canis lupus* Linnaeus, 1758

**Slovensko ime:** volk, sivi volk

### Sistematika

deblo: vretenčarji Vertebrata

razred: sesalci Mammalia

red: zveri Carnivora

družina: psi Canidae

rod: volk Canis

vrsta: sivi volk *Canis lupus*

## 1.2 EKOLOGIJA SIVEGA VOLKA

### 1.2.1 RAZŠIRJENOST V EVROPI IN SLOVENIJI

Številčno najbolj zastopane populacije najdemo danes v državah vzhodne Evrope, in sicer v Romuniji, na Balkanu ter Poljski in njenih vzhodnih sosedah. V centralni in zahodni Evropi je vzorec razporeditve zelo nepravilen, pogosto v obliki majhnih in izoliranih otočkov. Govorimo lahko o treh manjših subpopulacijah na Iberijskem polotoku, Skandinaviji in v Italiji/Franciji, ki so relativno izolirane od ostalih (Slika 1). Absolutno število volkov v Evropi sprva izgleda visoko, vendar pa naj bi le v šestih državah bilo nad 1000 osebkov, le 11 držav naj bi imelo več kot 500 osebkov in kar 8 držav manj kot 50 osebkov. Znanih je tudi nekaj območij, kjer trenutno volk ni prisoten. Mednje sodijo Belgija, Nizozemska, Danska, Luksemburg in Avstrija (Jonozovič, 2003).

Osrednje življenjsko območje volka danes predstavljajo dinarski bukovo-jelovi gozdovi južne Slovenije, ki se razprostirajo tudi v sosednjo Hrvaško (Huber in Adamič, 2000). Za razliko od začetka devetdesetih let, ko je populacija na ožjem področju Kočevske in Notranjske znašala 30–50 osebkov, se je do danes podvojila in jo lahko ocenjujemo na 70–100 osebkov. Zaradi omenjenega naraščanja številčnosti in zasedanja vedno večjega areala, je pričakovan prodor volka v vse smeri iz centralnega območja, tudi v Alpe (Adamič in Koren, 1998). O širitvi areala pričajo številni podatki iz severne strani avtoceste Ljubljana–Kozina predvsem v smeri Trnovskega gozda, Cerknega in do Jelovice. Njegovo stalno

teritorialno pojavljanje pa lahko v veliki meri primerjamo z osrednjim območjem rjavega medveda (Jonozovič, 2003).



**Slika 1:** Razporeditev volka v Evropi leta 1995 (Vir: LCIE v Action plan for the conservation of wolves in Europe)

### 1.2.2 VOLČJI TROP

Volk živi v socialnih skupnostih – krdelih oziroma tropih, katerih člani sodelujejo v lovu, razmnoževanju in varovanju teritorija. Naravna velikost tropa je volčji par skupaj s potomci ali družina (Murie, 1944). Dominantna odrasla samica vsakega tropa koti vsako

leto, običajno po en zarod (Smith in sod., 1997). Mladiči navadno ostanejo pri starših od 10 do 54 mesecev, vendar se razen v posebnih pogojih vsi razkropijo (Mech in sod., 1998). Volčja populacija obsega zgoščene teritorialne družbene skupine. Za uspešno rejo mora posamezen volk najti partnerja in teritorij z dovolj viri hrane (Rothman in Mech, 1979). Poznane so številne lokalne strategije vzreje:

-v določenih primerih volk zapusti svoj trop, vendar še vedno ostane na samem teritoriju domnevno čakajoč na možnost za rejo (Packard in Mech, 1980)

-v primeru množične reje odrasli volkovi ostanejo v rojstnem tropu in vzgajajo skupaj z ustanovitelji tropa (Meier in sod., 1995)

-pri cepitvi ločimo dva različna poteka:

1. samotarski volk in njegov partner skušata ustvariti teritorij vzdolž mej teritorija rojstnega tropa; pri tem žival pogosto obiskuje določen konec teritorija, se domnevno pari s članom sosednjega tropa in ustvari teritorij, ki je sosedni ali prekriva rojstni teritorij (Meier in sod., 1995)

2. skupina volkov se odcepi in zavzame nov teritorij (tega ne smemo enačiti z začasnim odcepom velikih tropov med zimo) (Carbyn in sod., 1993)

-samotarski volk lahko ustvari nov teritorij iz že obstoječega teritorialnega mozaika tropov (ti volkovi se potikajo med populacijo, obiskujejo vmesna območja med teritoriji (Meier in sod., 1995), srečujejo člane nasprotnega spola, se pari in skušajo ustvariti nov teritorij (Rothman in Mech, 1979))

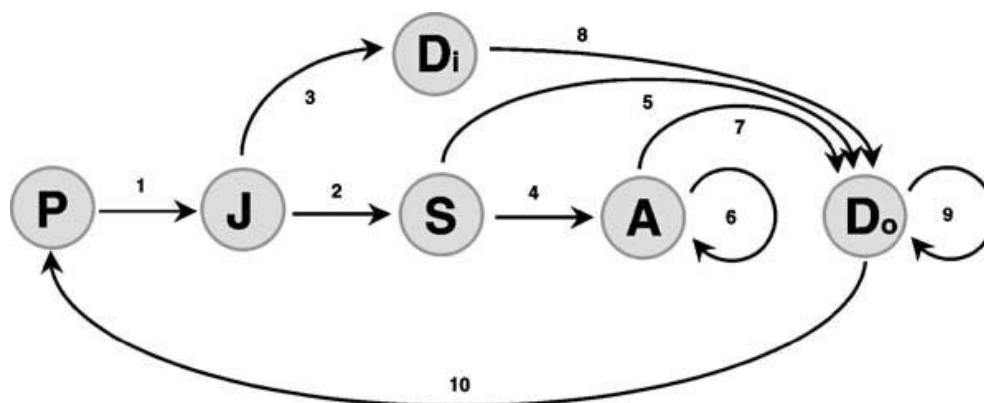
-zadnji način predstavlja polastitev vloge rejnika z izzvanjem obstoječega rejnika (Mech in Hertel, 1983)

Poleg zgoraj navedenih strategij za pridobitev mesta rejnika v lokalni populaciji, se pri volku pojavlja tudi usmerjena disperzija. Gre za težnjo po premikanju na dolge razdalje v bolj ali manj eni smeri (Mech, 1987).

Velikost volčjega tropa naj bi bila odvisna od velikosti plena, in sicer naj bi se spreminjala z velikostjo plena vse do optimalne količine, ki omogoča plenjenje z najmanjšo porabo in največjo možno povrnitvijo energije (Macdonald, 1983). Trop teži k temu, da je največji



tam, kjer volk pleni največje kopitarje. Kakor koli pa povezava med velikostjo tropa in plena ni dokončno določena (Mech in Boitani, 2003).



**Slika 2:** Življenjski cikel volčje populacije (P-mladiči, J-juvenilni osebki, S-subadultni osebki, Di-samotarski osebki, A-odrasli osebki, Do-dominantni osebki), vsi stadiji so v tropu razen samotarjev

1. preživeli mladiči postanejo juvenilni osebki
2. preživeli juvenilni osebki, ki se ne razpodiijo, postanejo subadultni osebki
3. preživeli juvenilni osebki, ki se razpodiijo, postanejo samotarski volkovi
4. preživeli subadultni osebki, ki se ne razpodiijo, postanejo odrasli osebki
5. preživeli subadultni osebki, ki se razpodiijo ter najdejo teritorij in par, postanejo rejniki tropa
6. preživeli odrasli osebki, ki se ne razpodiijo, ostanejo v odraslem razredu
7. preživeli odrasli osebki, ki se razpodiijo ter najdejo teritorij in par, postanejo rejniki tropa
8. samotarski volkovi, ki najdejo teritorij in par, postanejo rejniki tropa
9. preživeli rejniki tropa ohranijo isti položaj
10. preživeli rejniki tropa imajo mladiče

Na sliki 2 je prikazan življenjski cikel sivega volka. Večina volkov se iz rojstnega tropa razkropi. Razen v redkih primerih, ko volk prevzame vlogo rejnika v tropu, bo vsak volk rojen v tropu slednjega tudi zapustil (Mech in Boitani, 2003). Disperzija predstavlja kontinuum od enojnih, kratkih odhajanj iz rojstnega tropa, preko pretrganih in množičnih daljših plenjaj, do trajnih, daljših izselitev (Woollard in Harris, 1990). Razkropitev poteka pri obeh spolih, pri čemer se samci in samice ne razlikujejo po dolžini razkropitve. Rojstni trop zapustijo volkovi pri različnih starostih (večinoma med 11 in 24 meseci), razlog pa je najbrž tekmovanje za hrano med posameznimi tropi (Hayes in Harestad, 2000). Čeprav se razkropitve dogajajo preko celega leta, volkovi večinoma zapuščajo svoje trope v jeseni in zgodnji zimi ali v obdobju jesenske sezone brlogov (Ballard in sod., 1997).

Navadno je volk zelo teritorialna žival (Mech, 1994). Njegov teritorij obsega široko območje (od 10 do 1000 km<sup>2</sup>), ki je oskrbljeno z velikim številom plena (Lewis in Murray,

1993). Kljub obširnemu teritoriju, ki pomeni porabo časa in energije, so se pri volku razvile uspešne morfološke in vedenjske prilagoditve. Fizična postava živali, dolge noge, kockasta stopala in močne mišice mu omogočajo neutrudno potovati 8 km/h več kilometrov na dan v kakršnih koli vremenskih razmerah (Mech, 1994). Ker volk pri potovanju tako lovi kot markira in ker so oznake učinkovite daljše obdobje (Peters in Mech, 1975), tako vedenje omogoča boljšo zaščito teritorija. To dopolnjuje tuljenje na različnih lokacijah po poti, vključno z domačim okolišem (Mech in Boitani, 2003). Težnja posameznega volka po razširjanju je dolgo znana (Schenkel, 1947) in prav ta težnja omogoča volčji populaciji, da se nenehno prilagaja kot »fleksibilni strateg« (Von Schantz, 1984) na spremembe v razpoložljivosti plena.

### 1.2.3 PREHRANA

Volk spada med oportuniste z izjemno sposobnostjo iskanja hrane. V splošnem velja, da je prehrana volka toliko obsežna kolikor znaša njegova geografska razsežnost. V področjih Evrazije, kjer ima človek največji vpliv, so volkovi prisiljeni živeti od domačih živali in smeti, čeprav je v najbolj odročnih predelih (Rusija in gorski predeli vzhodne Evrope) in kjer si je opomogel, pomemben tudi naravni plen (Mech in Boitani, 2003). Naravni divji kopitarji, ki so pomemben del volčje prehrane, so severnoameriški los, jelen, srnjak in divji prašič (Okarma, 1995). Za razliko od Evrazije živijo volkovi na območju Severne Amerike večinoma od divjega plena in se hranijo s smetmi in domačo živino le v izoliranem stanju (Mech in Boitani, 2003).

Volk največkrat pleni v tropu in pri tem opravlja tudi t.i. poskusne gonje. V tem primeru zasleduje svoj plen nekaj sto metrov in na tak način ugotovi v kakšni kondiciji je le-ta. Ob tem tečejo živali ob strani hitreje kot sredinske in tako preprečujejo, da bi plen ušel. Ponavadi ga prepodijo v kotanje ali prostor, od koder se žival ne more umakniti (Jonozovič, 2003).

Tehnika lova se pri volku razlikuje od tistih pri predstavnikih iz družine mačk, ki pogosto plen ubijejo z enim samim prodornim ugrizom v predel glave ali vratu. Predstavniki iz družine psov plen navadno usmrtijo s številnimi, plitvejšimi ugrizi, ki jih zadajo oportunistično (Biknevicius in Van Valkenburgh, 1996) in z manjšo natančnostjo ter se zanašajo na številne ureznine zob (Mech in Boitani, 2003). Ti so prilagojeni za ubijanje in požiranje plena kot heterodontno zobovje, ki ga sestavlja več različnih tipov zob. Volk reže

in stiska mišice ter kožo plena z ostrimi, rezilu podobnimi zobmi, medtem ko za lomljenje kosti uporablja močne, stožčaste zobe (Biknevicius in Van Valkenburgh, 1996).

#### 1.2.4 HABITAT

Volk lahko živi v zelo raznolikih tipih habitata in je sposoben preživeti v različnih razmerah, kar je razvidno iz njegove razširjenosti v Evropi (Boitani, 2000). Kljub temu mora njegov habitat izpolnjevati nekatere osnovne karakteristike, kot so razpoložljivost in gostota plena, velikost razpoložljivega prostora za bivanje in življenje (dnevni počitek, razmnoževanje, kotenje zaroda ...) ter odsotnost motenj s strani človeka. Zanj so torej primerna široka gozdnata prostranstva, ki ustrezajo tem kriterijem, z vmesnim pojavljanjem grmišč in jas kot življenjskega prostora osnovnega plena volka, srnjadi in jelenjadi (Jonozovič, 2003).

### 1.3 SIVI VOLK IN ČLOVEK

Plenjenje živine predstavlja glavni problem pri ohranjanju volka. Volk pleni domače živali povsod, kjer obe strani sobivata (Ginsberg in Macdonald, 1990) in ubije katerokoli vrsto živine, ki mu je na razpolago. Najpogostejši plen v Evropi so zaradi svoje ranljivosti in številčnosti na volčjem ozemlju ovce, v Severni Ameriki pa poleg puranov prevladuje še govedo in močno zmanjšana populacija ovac. Število ubitih živali med napadom je povezano z velikostjo in številčnostjo plena. V primeru napada na govedo ali konje je večinoma ubita ali ranjena ena žival, po drugi strani pa je pri napadu na ovce ponavadi več žrtev (Mech in Boitani, 2003). Pogosto ubije volk veliko več domačih živali kot jih lahko poje, predvsem ko gre za ovce (Boitani, 1982), severne jelene (Bjarvall in Nilsson 1976) in purane (Fritts in sod., 1992). V večini primerov se napadi vršijo bolj ali manj stalno na določenem področju, pretežno poleti in v zgodnji jeseni. Za večje izgube je ponavadi krivo pomanjkanje zaščitnih ukrepov, kar je še posebej vidno pri prosti paši brez nadzora. Poleg neposredne pa nastane tudi posredna škoda, ki se odraža v posameznih ranjenih, razpršenih ali trajno izgubljenih živalih in živalih, ki zaradi stresa splavijo, zbolijo in imajo manj mleka (Jonozovič, 2003).

Lastniki živine ob neukrepanju oblasti pogosto poskušajo rešiti problem plenjenj na lastno pest z:

-letalnimi metodami (odstrel v času napada, jeklene pasti, strupi: cianid in strihnin, antikoagulanti)

-neletalnimi metodami (pes čuvaj, odpor do okušanja, utripajoče luči na avtocestah, zvočne naprave, nadzor z zastavicami na ograjah, ograjevanje, propanski eksplozivi, pirotehnika, kontrola plodnosti ...) (Mech in Boitani, 2003)

Ena izmed pogostejših oblik povračil nastale škode s strani evropskih držav so denarna nadomestila, vendar v splošnem ta ukrep ne predstavlja rešitve problema (Jonozovič, 2003).

#### 1.4 SIVI VOLK IN DOMAČI PES

Vrsta najbolj sorodna sivemu volku je udomačen pes. Obsežna raziskava sekvenc mitohondrijske kontrolne regije je pokazala, da je sivi volk prednik psa (Vilà in sod., 1997), kar je v raziskavi potrdil Savolainen s sodelavci (2002). Te študije so ovrgle prejšnje teorije, ki so predlagale med prednike psa tudi zlatega šakala (Lorenz, 1954). Med najbližje divje sorodnike sivega volka štejemo kojota in etiopskega volka. Pri teh je razlika v sekvencah mitohondrijskih kontrolnih regij s sivim volkom večja od 4 %, za razliko od tiste pri psu, ki znaša približno 1,8 % (Vilà in sod., 1997). Kljub temu pes in volk ne veljata za monofiletični skupini (Mech in Boitani, 2003).

Zaradi njune bližnje sorodnosti sta se volk in pes v preteklosti lahko večkrat križala (Vilà in sod., 1997). Tako rejci psov kot številna domorodna ameriška plemena so priložnostno križala svoje pse z volkovi za povečanje učinkovitosti (Schwartz, 1997). V naravi je križanje med sivim volkom in psom verjetno pogostejše v bližini človeških naselbin, kjer je gostota volkov nizka in so prisotni številni podivjani ter udomačeni psi (Nowak, 2003). Kljub temu je analiza sekvenc mitohondrijske DNA pokazala, da je hibridizacija med volkom in psom redka (Randi in sod., 2000).

## 1.5 NEINVAZIVNA GENETIKA

Genetski podatki služijo kot koristno orodje tistim, ki jih zanimata ekologija in upravljanje divjih živali, še posebno, če se jih kombinira z vedenjskimi, demografskimi ter prostorskimi informacijami. V preteklosti so bile genetske metode nedodelane, drage ter uporabne le v določenih primerih, postopoma pa so se z izboljšanjem tehnologije razvile v bolj uporabne, cenovno učinkovite in močno razširjene (DeYoung in Honeycutt, 2005). Ta napredek je vodil v hitro širjenje vloge molekularnih markerjev, izmed katerih so se za najbolj priljubljenega in vsestranskega izkazali mikrosateliti (Selkoe in Toonen, 2006).

### 1.5.1 MIKROSATELITSKA DNA

Mikrosateliti so večkratne ponovitve 1–6 nukleotidov, zelo pogosto prisotne v jedrnih genomih večine taksonov. Poznani so tudi kot SSR (»simple sequence repeats«), VNTR (»variable number tandem repeats«) ali STR (»short tandem repeats«) (Ellegren, 2004). Običajno variirajo v dolžini med 5 in 40 ponovitvami, možni pa so tudi daljši lokusi. Pri genetskih študijah se najpogosteje uporablja dinukleotide, trinukleotide in tetranukleotide. Med njimi veljajo za najštevilčnejše dinukleotidi, medtem ko so mononukleotidne ter daljše ponovitve manj zanesljive (Li in sod., 2002).

Mikrosatelitni lokus obdaja DNA, imenovana bočna regija, katere sekvenca se navadno pri posameznikih iste in včasih tudi različnih vrst ne spreminja. To omogoča identifikacijo posameznega mikrosatelita s pomočjo načrtovanja začetnih oligonukleotidov, ki se vežejo na bočno regijo in vodijo pomnoževanje mikrosatelitnega lokusa z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) (Selkoe in Toonen, 2006). Za razliko od bočnih regij, ponavljajoče sekvence mikrosatelitov med podvojevanjem DNA pogosto mutirajo zaradi zdrs in napak pri branju (Eisen, 1999). Visoka stopnja mutacij je prisotna pri številnih mikrosatelitih in znaša med  $10^{-2}$  in  $10^{-6}$  mutacij na lokus na generacijo, v povprečju pa  $5 \times 10^{-4}$  (Schlötterer, 2000).

Ker so običajno kratki in enostavni za pomnoževanje s PCR, se mikrosatelite uporablja pri hitrejših in cenejših analizah starejših vzorcev DNA ter analizah neinvazivnih vzorcev (Taberlet in sod., 1999). So tudi vrstno specifični, tako da je navzkrižna kontaminacija z netarčnimi organizmi nemogoča (Selkoe in Toonen, 2006). Slaba stran te lastnosti se kaže kot dejstvo, da se mesto vezave začetnega oligonukleotida pri posameznikih v veliki večini

razlikuje in zato ne moremo uporabiti istega začetnega oligonukleotida (Glenn in Schable, 2005). Med slabosti štejemo še možno kompleksnost mutacijskih procesov mirkosatelitov (Ellegren, 2004), problem prikrivanja raznolikosti alelov populacij zaradi homoplazije (Epperson, 2005) in nenazadnje probleme povezane s pomnoževanjem.

Neinvazivno genetsko vzorčenje velja za relativno nov pristop pridobivanja podatkov, ki se vse bolj uporablja na področju biologije divjih živalskih vrst. Ekstrakcija genetskega materiala iz dlak, iztrebkov, urina, sline ter drugih virov DNA zalaga raziskovalce s pomembnimi podatki o populacijah divjih živali (prisotnost redkih vrst, določitev spola, analiza prehrane, genetska diverzitet, struktura populacije), pri tem pa jim ni potrebno živali uloviti ali dlje časa opazovati (Waits in Paetkau, 2005). Sprva je prevladovalo mnenje, da lahko tak način vzorčenja izkorišča celoten potencial DNA analiz in oskrbuje z enakimi informacijami kot DNA, pridobljena iz krvnih ali tkivnih vzorcev, kar se je delno izkazalo kot resnično. Številni ekologi so posledično opuščali jemanje krvi in tkiv ter namesto teh pričeli zbirati dlako, perje ali iztrebke. Navkljub spodbudnemu začetku so se sčasoma začele pojavljati številne slabosti, kot so nizka stopnja uspešnosti (slaba kvaliteta DNA ali ekstrakta, majhna količina DNA), problem kontaminacije in visoka stopnja napak pri genotipizaciji. S to problematiko so se in se še vedno ukvarjajo številne študije, ki predlagajo primerne rešitve (Taberlet in sod., 1999).

O forenzičnem razlikovanju žrtev napadov na podlagi izolacije DNA iz sline ni veliko raziskanega in napisanega, se pa najde nekaj člankov, ki se dotikajo te tematike.

Williams in sodelavci (2003) so se ukvarjali s plenjenjem ovac s strani kojota, in sicer so določali vpliv ovčje DNA na pravilno identifikacijo plenilca. Zbiranje vzorcev je potekalo s suhimi, sterilnimi bombažnimi vatiranci v različnih vremenskih okoliščinah. Slini mrhovinarjev so se izognili z odiranjem kože ob ugrizih in z jemanjem brisov samo pri ugrizih, ki so bili prepoznani kot posledica napada. Vatirance so 24 ur posamično sušili na zraku in jih do analize hranili v papirnatih ovojnicah pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Izolacijo DNA so izvedli s kompletom reagentov QIAamp DNA minikit (Qiagen), za ločevanje med domačim psom in kojotom so uporabili restrikcijske profile pomnožkov mitohondrijske DNA, pridobljene z restrikcijski encimom Hinf I, določitev spola pa je temeljila na pomnoževanju lokusa SRY ter na sekvencah ZFX/ZFY, ki so specifične za kojota.

Raziskava je pokazala, da je slina uporabna kot vir DNA, a je še vedno potrebna previdnost, kot velja za ostale neinvazivne vzorce. Nadaljnji zaključki kažejo na potrebo po večjem številu pomnoževanj za potrditev genotipov zaradi majhne količine uporabne DNA, pridobljene iz vatrancev. Vremenske razmere naj bi imele manjši vpliv na uspešnost analize DNA kot jih imajo najdba trupel, uspešna identifikacija in odvzem brisa z rane, število udeleženih plenilcev ter odložitvev plenilčeve DNA na truplo. Z odvzemom vzorcev z različnih vbodnih ran na posameznem truplu bi bila mogoča identifikacija več različnih plenilcev. V raziskavi uporabljena določitev vrste plenilca bi lahko bila koristna na območjih, kjer prihaja do plenjenja živine (preverjanje verodostojnosti poročil o živini pobiti s strani volka), uporabo izvedenih metod pa bi se lahko razširilo na ostale kombinacije plena in plenilca.

Cilj Blejwasa in sod. (2006) je bila določitev vzorcev plenjenja kojota na ovcah z analizo DNA iz slina in primerjava ugotovitev s študijo radiotelemetrije. Sline so uporabili tudi za določitev vrste plenilca odgovornega za poboje ter določitev spola in identitete posameznega osebka. Metode terenskega in laboratorijskega dela (izolacija DNA, identifikacija vrste z RFLP (»Restriction Fragment Length Polymorphism«) in spola na podlagi lokusa SRY, genotipizacija na 3 kanidnih mikrosatelitnih lokusih) ustrezajo tistim pri Williamsu in sod. (2006), dodatno so izvedli pomnoževanje genov še na štirih drugih lokusih.

Dobljena visoka uspešnost pomnoževanja v povezavi z razpoložljivostjo začetnih oligonukleotidov za širok spekter mesojedih živali pričata o koristnosti uporabljene tehnike v primeru problematične identifikacije vrste plenilca. Uspešno so pomnožili vzorce, pobrane v suhem in vlažnem vremenu in pri velikih temperaturnih razlikah, kar kaže na prilagojenost tehnike različnim terenskim razmeram. Rezultati so potrdili, da ovce raje plenijo samci kot samice kojota. Identifikacija plenilcev iz slina se je izkazala za primernejšo od radiotelemetrije, kljub temu pa je za popolno razumevanje vzorcev plenjenja priporočena kombinacija obojega.

Študija Sundqvistove in sodelavcev (2008) je bila osredotočena na najdbo metode, ki bi omogočila identifikacijo ne samo volka in psa, ampak tudi križancev obeh vrst.

Vzorci so bili pobrani z bombažnimi vatiranci 6 do 10 ur po napadu z robov ugriznih ran, pri čemer so se izogibali krvi ovce. Vatirance so takoj shranili v plastične epruvete, jih pustili sušiti na sobni temperaturi in jih naslednji dan postavili v zamrzovalnik. Sledila je izolacija DNA, pomnoževanje 8 mikrosatelitnih lokusov ter elektroforeza. Zaradi problema izpada alelov so za vsak vzorec in lokus pripravili po tri ponovitve. Zanesljivost genotipa z enim lokusom je bila dosežena pri dveh ponovitvah z identičnim genotipom za heterozigote in treh za homozigote.

Ugotovili so, da pomnoževanje DNA plena lahko vpliva na rezultate neinvazivne volčje genotipizacije, zato je priporočena izvedba pomnoževanja tako pri plenu kot plenilcu. Avtorja predlagata odvzem več vzorcev na škodni primer, da si zagotovimo zadostno količino plenilčeve DNA v vsaj nekaterih izmed njih. Predlagata tudi večje število ponovitev na lokus ter odvzem več vzorcev z ugrizne rane zaradi pogostega izpada alelov. Rezultati so potrdili možnost identifikacije plenilca z odvzemom sline z ugrizne rane in možnost pridobitve dovolj visoko kvalitetne jedrne DNA, na podlagi katere lahko ločimo med dvema sorodnima vrstama kot sta volk in pes.

Tematiko prepoznavanja plenilca z neinvazivnim vzorčenjem zajemata tudi raziskavi Clarkove in Vandenberg (2010) ter Glena in sodelavcev (2010). Prva obravnava tri ločene primere (napad na živino, hišnega ljubljenca in osebo), druga pa se ukvarja s primerom ubitega vrečarja.



## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 PRELIMINAREN POSKUS NA DOMAČEM PSU

Pred samim odvzemom vzorcev sline na škodnih primerih smo izvedli poskus na domačem psu. S tem smo hoteli ugotoviti najprimernejša mesta odvzema sline z vatirancem ter učinkovitost različnih tipov vatirancev in različnih medijev (destilirana voda ali 96 % etanol), v katere smo le-te namakali. Poskus smo izvedli pri mlajšem psu pasme labradorec in pri dveh starejših psih pasme nemški ovčar. Vatiranec je mogoče opisati kot palčko, običajno iz lesa ali plastike, na koncu katere je ovit majhen čep iz različnih materialov (bombaž, umetna svila, najlonska vlakna). V našem primeru smo uporabljali posebne, v desikantu (sušilu) nameščene vatirance.

Sprva smo s pomočjo zdravju neškodljivih barv (barvila za otroke) psu obarvali ustno votlino. Nekaj barve smo nanесли tudi na gumijasto igračo, ki jo je pes med igranjem držal v gobcu in je tako služila dodatnemu obarvanju. Nato smo z belo rjuho, zvito v valj, simulirali vrat drobnice in se z njo igrali s psom. Pri igri smo psa pripravili do tega, da je vanjo ugriznil. Iz dobljenega ugriza (Slika 3) smo glede na velikost madeža določili najprimernejše mesto jemanja vzorcev sline z ugriznih ran pri škodnih primerih.



**Slika 3:** Ugriz psa na rjuhi (ZG-zgornji del ugriza, SP-spodnji del ugriza, s puščicami označeni odtisi zob)

Drugi del poskusa smo nastavili tako, da smo ločeno uporabili štiri noge, kos hrbta, kos zadnjice in glavo kozlička (Slika 4). Z vsakim delom posebej smo se s psom igrali na isti način kot pred tem z rjuho. Ko je pes nekajkrat zagrizel, smo z vodoodpornim pisalom označili okolico mesta ugriza in dele kozlička do drugega dne postavili v suh prostor. Naslednji dan smo z vsakega mesta ugriza z vatiranci vzeli po dva vzorca, in sicer je eden bil namočen v 96 % etanol, drugi pa v destilirano vodo. To smo storili tako, da smo večkrat zapored močnejše drgnili po površini in tako pridobili maksimalno količino DNA. Dobljene vzorce smo shranili, kasneje pa izvedli ekstrakcijo in pomnoževanje DNA ter določili genotipe.



**Slika 4:** Deli kozlička

## 2.2 ZBIRANJE VZORCEV

Preden smo se odpravili na teren smo izdelali večje kartone z zaporednimi številkami ter manjše plastificirane, ki so služili zapisovanju datuma in številke trupla. S seboj smo vzeli še vatirance s sušilom (silikagel), rokavice različnih velikosti, plastične vrečke in stekleničke z alkoholom za vzorce tkiv. Najprej smo mesto napada dobro pregledali in fotografirali. Ob posamezno truplo smo postavili kartone s številkami in naredili slike z različnih kotov. Trupla smo nato pregledali in poiskali vbodne rane, katere smo

fotografirali skupaj s plastificiranimi kartončki s podatki. Sledilo je jemanje brisa ob vbodnih ranah (Slika 5) in z ostalih delov trupla (Slika 6). Z vsakega trupla smo običajno odvzeli po enega ali dva vzorca sline, v nekaj primerih tudi več. Vtirance smo po vnitvi s terena shranili v zamrzovalnik.



**Slika 5:** Jemanje vzorca volčje sline na terenu



**Slika 6:** Jemanje vzorca volčje sline z reber (v ozadju viden plastificiran karton)

## 2.3 LABORATORIJSKI PROTOKOL EKSTRAKCIJE IN POMNOŽEVANJA DNA IZ SLINE

Pri oblikovanju laboratorijskega protokola smo uporabljali opremo proizvajalca QIAGEN, pri čemer smo v postopek ekstrakcije vpeljali nekaj sprememb v lastni režiji ter nekaj po posvetu z dr. Fumagallijem. Za ekstrakcijo DNA iz sline smo uporabili komplet reagentov QIAamp<sup>R</sup> DNA Investigator Kit, saj je le ta primeren za vzorce z zelo majhnimi količinami DNA oziroma degradirano DNA. Maksimalni učinek doprinosa smo dosegli s kolono QIA SHREDDER in kemikalijo »carrier RNA«. Prva vsebuje biopolimerni sistem za preprosto in hitro homogenizacijo lizata, komponenta »carrier RNA« pa poveča vezavo DNA na membrano kolone QIAamp MinElute, zlasti v vzorcu z majhnim številom tarčnih molekul.

### 2.3.1 EKSTRAKCIJA (IZOLACIJA) DNA IZ SLINE

Pri ekstrakciji smo uporabljali komplet reagentov QIAamp<sup>R</sup> DNA Investigator Kit (Preglednica 1) z naslednjimi popravki v protokolu za izolacijo celotne DNA iz vatirancev:

#### **DAN 1**

- pripravimo 2 ml mikrocentrifugirko
- v 2 ml mikrocentrifugirke damo 400 µl ATL pufra
- bombažni del vatiranca s pomočjo skalpela in pincete odstranimo in ga prenesemo v 2 ml mikrocentrifugirko
- dodamo po 20 µl proteinaze K
- stresamo na namiznem mešalu (Vortex) vsaj 20 sekund
- mikrocentrifugirke damo v stresalni inkubator na 56°C in nastavimo stresanje na 900 obratov na minuto ter pustimo čez noč

#### **DAN 2**

- morebitne ostanke reakcije na stenah mikrocentrifugirke zgostimo s kratkim centrifugiranjem pri 5000 obratih na minuto
- ves lizat (450 µl) in vatiranec prenesemo na kolono QIA SHREDDER in centrifugiramo pri 12000 obratih na minuto 6 minut
- lizat odpipetiramo v nove 2 ml mikrocentrifugirke

- te vstavimo v stresalni inkubator na 70 °C in 900 obratov na minuto

**Preglednica 1:** Podatki o kompletu reagentov za ekstrakcijo DNA

<b>LASTNOSTI KOMPLETA REAGENTOV</b>	
<b>IME</b>	QIAamp <sup>R</sup> DNA Investigator Kit (50)
<b>PROIZVAJALEC</b>	QIAGEN
<b>KAT. ŠT.</b>	56504
<b>VSEBINA</b>	pufri (ATL, AL, AW1, AW2, ATE)
	proteinaza K
	carrier RNA

### 2.3.2 POMNOŽEVANJE DNA

Naša začetna naloga je bila priprava ugodne kombinacije mikrosatelitnih lokusov, kar se odraža kot jasno prepoznavanje alelov na posameznih lokusih ter čim manjše število hkratnih PCR (mešanica vode, *Taq* polimeraze, deoksinukleotidov, magnezijevih ionov, pufra, pospeševalcev pomnoževanja in izbranih začetnih oligonukleotidov s točno določenimi koncentracijami). Glede na optimalno temperaturo naleganja začetnih oligonukleotidov in dolžinski razpon lokusov smo začetne oligonukleotide razvrstili po skupinah in vsaki poiskali najprimernejšo temperaturo naleganja. Hkrati je bilo treba pri vsaki hkratni PCR poiskati ustrezno razmerje med premočnimi in prešibkimi pomnoževanji s spreminjanjem koncentracij začetnih oligonukleotidov (Preglednica 2) ter števila ciklov pri PCR. Izbrali smo mikrosatelitne lokuse, ki so omogočali razlikovanje med štirimi živalskimi vrstami (volk, pes, lisica, šakal).

Za pomnoževanje smo uporabljali komplet reagentov QIAGEN<sup>R</sup> Multiplex PCR Kit in inkubator Eppendorf MasterCycler EP Gradient. Vsak mikrosatelitni lokus smo pomnožili s parom specifičnih začetnih oligonukleotidov, od katerih je bil eden označen s fluorescentnim barvilom. Uporabili smo pet barvil (modro, zeleno, rdeče, rumeno in oranžno – dolžinski standard GS500-Liz), ki so bila znotraj posamezne hkratne PCR izbrana tako, da se fragmenti različnih lokusov in enakih dolžin ne pokrivajo. Mešanico za hkratno PCR smo pred uporabo premešali, jo razporedili na mikrotitersko ploščo v kateri smo izvedli PCR ter dodali naše vzorce.

Zaradi možnih pojavljanj napak človeškega izvora (zamenjava vzorcev, napake pri pipetiranju), smo uvedli sistem laboratorijskega dela, s katerim smo večino napak zaznali in popravili. Na začetku smo sestavili protokol, ki je imel razporejene vzorce kot na končni mikrotiterski plošči, na kateri smo izvajali pomnoževanje vzorcev (Slika 7). Na podlagi

protokola smo naše vzorce, ki smo jih predhodno alikvotirali v 0,2 ml epruvete, uredili v pravilnem vrstnem redu in jih tako primerjali z razporeditvijo v protokolu. Poleg tega so vsa pipetiranja potekala z osemkanalno pipeto, pri čemer je manjša možnost zamenjave vzorcev.

Goal: Tissue, optimization protocol Wolf Multi A												
MPA_volk_opti_A13_brez multic												
Plate 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CML	CML	AH.03MH	AH.03ME	AH.03ME	AH.03ME	0	0	0	0	0	0
B	55B	55B	AH.03MJ	AC.00XL	AC.00XL	AC.00XL	0	0	0	0	0	0
C	6A1	6A1	AH.03MM	AH.03MM	AH.03MC	AH.03MC	0	0	0	0	0	0
D	68F	68F	AH.03ML	AH.03ML	AH.03MB	AH.03MB	0	0	0	0	0	0
E	6A4	6A4	AH.03MP	AH.03MP	AH.03M7	AH.03M7	0	0	0	0	0	0
F	68E	68E	AH.03MT	AH.03MT	AH.03M6	AH.03M6	0	0	0	0	0	0
G	8XE	8XE	AH.03MK	AH.03MK	AH.03M5	AH.03M5	0	0	0	0	0	0
H	AU.0CBX	AU.0CBX	AH.03MF	AH.03MF	AH.03M3	AH.03M3	0	0	0	0	0	0

**Slika 7:** Primer protokola za pripravo PCR plošče (posamezno polje predstavlja jamico na mikrotiterski plošči)

**Preglednica 2:** Koncentracije začetnih oligonukleotidov v hkratni verižni reakciji s polimerazo

Začetni oligonukleotid (Multi A MM)	Koncentracija začetnega oligonukleotida ( $\mu\text{M}$ )
CPH2 F	0,18
CPH2 R	0,18
CPH6 F	0,15
CPH6 R	0,15
CPH8 F	0,25
CPH8 R	0,25
CPH9 F	0,18
CPH9 R	0,18
CPH12 F	0,2
CPH12 R	0,2
FH2004 F	0,25
FH2004 R	0,25
FH2088 F	0,32
FH2088 R	0,32
FH2096 F	0,08
FH2096 R	0,08
SRY F	0,1
SRY R	0,1

\* F (Forward) označuje začetne oligonukleotide, ki se vežejo na eno verigo matrične DNA in R (Reverse) začetne oligonukleotide, ki se vežejo na drugo verigo.

PCR smo izvajali s termociklerji Eppendorf MasterCycler EP Gradient po protokolu, ki je predstavljen v Preglednici 3.

**Preglednica 3:** Protokol PCR

Hkratna verižna reakcija s polimerazo A		
Začetna denaturacija:	95°C	15 min
Število ciklov:	30-45	
Denaturacija:	94°C	30 s
Vezava začetnih oligonukleotidov:	57-63°C	90 s
Elongacija:	72°C	60 s
Končna elongacija:	60°C	30 min

## 2.4 DOLOČANJE GENOTIPOV

Po končani PCR smo po 1 µl pomnožka vsakega vzorca prenesli v 9 µl mešanice formamida in GS500 Liz dolžinskega standarda, katero smo prej razdelili v jamice PCR plošče. Vse skupaj smo nato prenesli za 4 minute v inkubator, kjer je pri 95 °C potekla denaturacija. Iz inkubatorja smo ploščo takoj prenesli na led in počakali, da se je ohladila.

Dolžine alelov smo določali na 16 kapilarnem sekvenatorju ABI 3130xl Genetic Analyzer, v kapilarah katerega poteka elektroforeza. Ta omogoča ločevanje DNA fragmentov po dolžini. Pozitivno nabite DNA molekule se namreč gibljejo proti negativni elektrodi, pri čemer so daljši fragmenti počasnejši od krajših. Gibanje DNA otežuje polimer POP-7<sup>TM</sup>. Fluorescentna barvila, s katerimi so bili začetni oligonukleotidi označeni, ob presvetlitvi z laserjem oddajo specifično valovno dolžino, ki jo zazna senzor. Ta pošlje signal računalniku, da lahko interpretiramo podatke. Glavno vlogo pri ugotavljanju dolžine fragmentov ima dolžinski standard, ki vsebuje fragmente DNA znane dolžine.

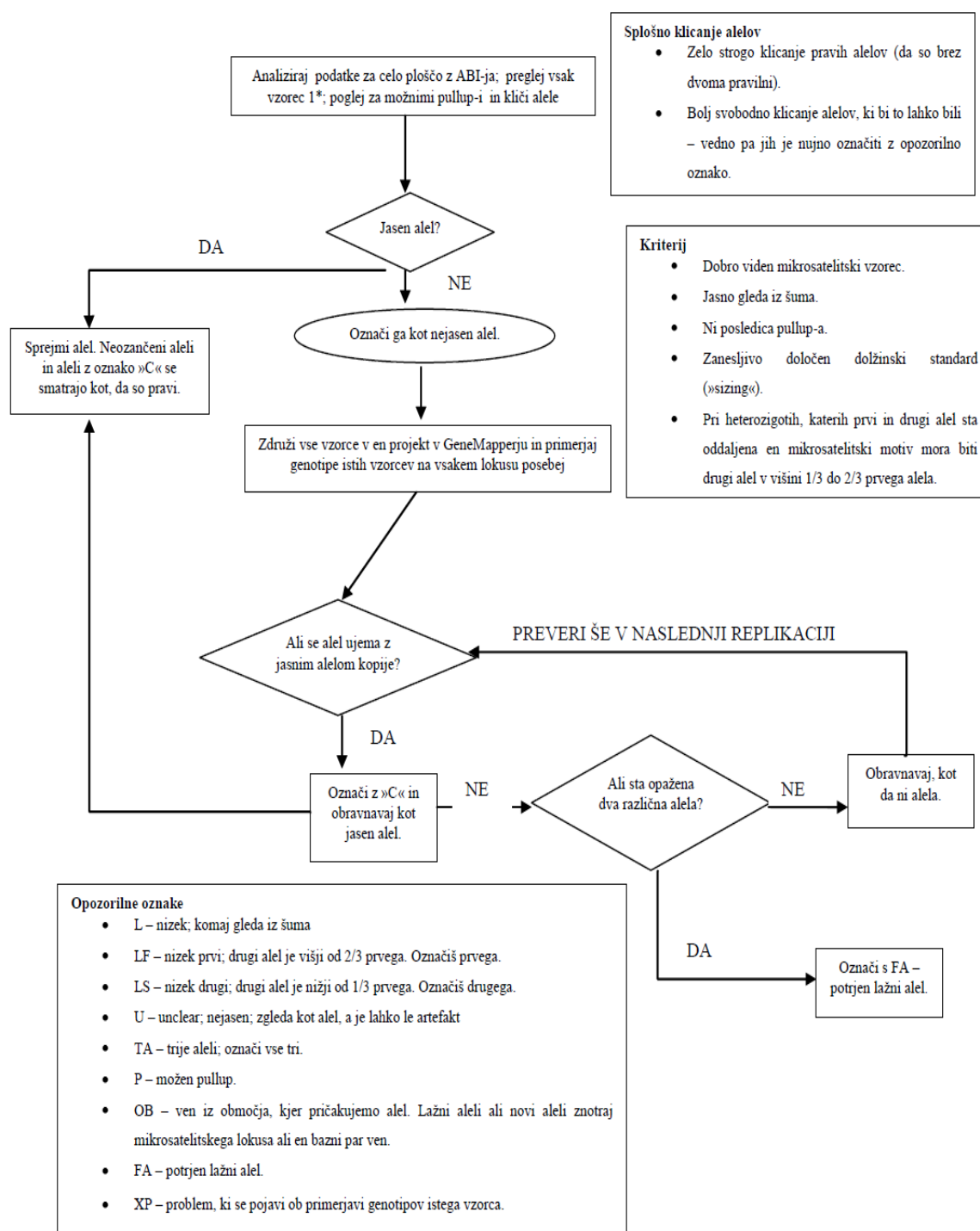
Za analizo elektroferogramov (izpisov iz sekvenatorja) smo uporabili programsko orodje GeneMapper, v katerem smo glede na obliko vrhov alele bodisi sprejeli (številčno označili) bodisi številkam dodali opozorilno oznako (TA - trije aleli, U - nejasen alel, P - premočno pomnožen alel, L - nizek alel, LF - nizek prvi alel, LS - nizek drugi alel, OB - alel zunaj območja). Sledil je vnos podatkov v bazo, ki jo je v Microsoft Accessu sestavil Tomaž Skrbinšek. S procesiranjem teh podatkov smo prišli do informacij o sami vrsti in zanesljivosti slednje, o povprečni uspešnosti pomnoževanja, indeksu kvalitete DNA,

število pomnožitev na lokus, številu uspešnih pomnožitev na lokus ter številu pomnoženih lokusov za vsak vzorec. V programu GeneMapper smo z različnimi vzorci plenskih živali (koza, ovca, srna) preverili tudi zanesljivost prisotnosti lokusa SRY, ki naj bi bil specifičen za zveri.

Za sprejemanje genotipov smo uporabili algoritem (Slika 8), ki so ga razvili Skrbinšek in sodelavci (2007). Podatke smo statistično obdelali z računalniškima programoma SPSS in R. V SPSS-u smo uporabili multivariatno koračno (step-wise) logistično regresijo, kjer program postopoma izključuje posamezne spremenljivke iz modela, da na podlagi določenega kriterija pride do najboljšega modela (izločitev za nazaj ali »backward elimination«) (Brezigar Masten in Masten, 2007).

Pridobivanje vzorcev vključenih v diplomsko delo je trajalo skoraj dve leti, in sicer v obdobju med marcem 2010 in novembrom 2011. Izvedba je potekala v sklopu projekta SloWolf, pri čemer je bilo vključeno večje število vzorčevalcev. Med njimi je bilo 15 cenilcev škod, zaposlenih na ZGS-ju, ter 3 osebe z Biotehniške fakultete; skupaj torej 18 ljudi. Vzorce smo jemali v različnih okoliščinah, katere predstavljajo spremenljive vremenske razmere in razlika v številu preteklih dni od nastanka škodnega primera do odvzema vzorca.

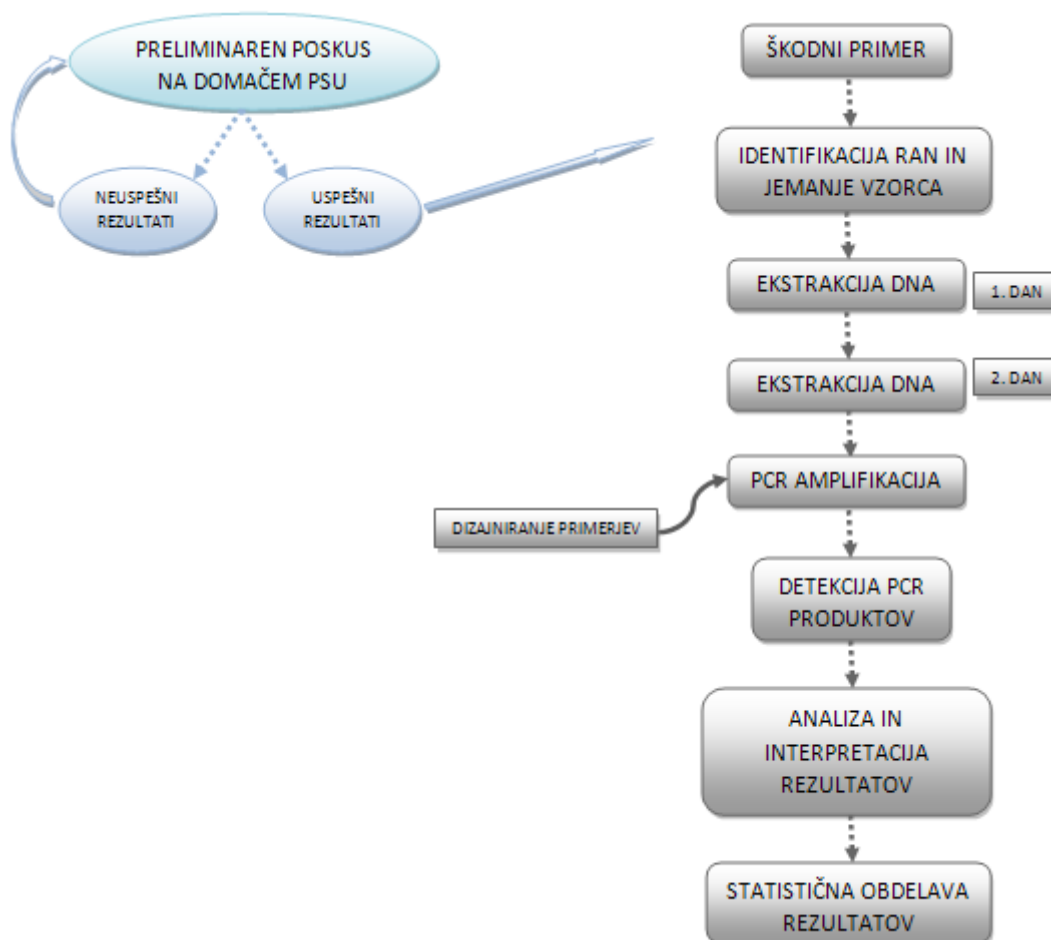




**Slika 8:** Algoritem za sprejemanje in označevanje alelov v izpisu sekvenatorja v programskem orodju GeneMapper (levo spodaj razlaga opozorilnih oznak) (Skrbinšek in sod., 2007)

### 3 REZULTATI

Potek terenskega in laboratorijskega dela je prikazan na sliki 9.



**Slika 9:** Shematski prikaz poteka terenskih in laboratorijskih metod, ki smo jih uporabili tekom diplomskega dela

Skupno je bilo zbranih 134 vzorcev DNA z različnih koncev Slovenije (Preglednica 4), od tega jih je 21 pripadalo naravnemu plenu (Priloga A). Na vbodnih ranah s predela vratu smo odvzeli 67 vzorcev, 40 pa z drugih delov trupla (rebra, stegenica, medenica ...). Prisotnost volčje DNA smo zaznali v 47, lisičje DNA v 17 in pasje DNA v 12 vzorcih. V odvzetih vzorcih smo potrdili DNA 17 osebkov ženskega in 39 moškega spola, medtem ko preostalim vzorcem ni bilo mogoče določiti spola.

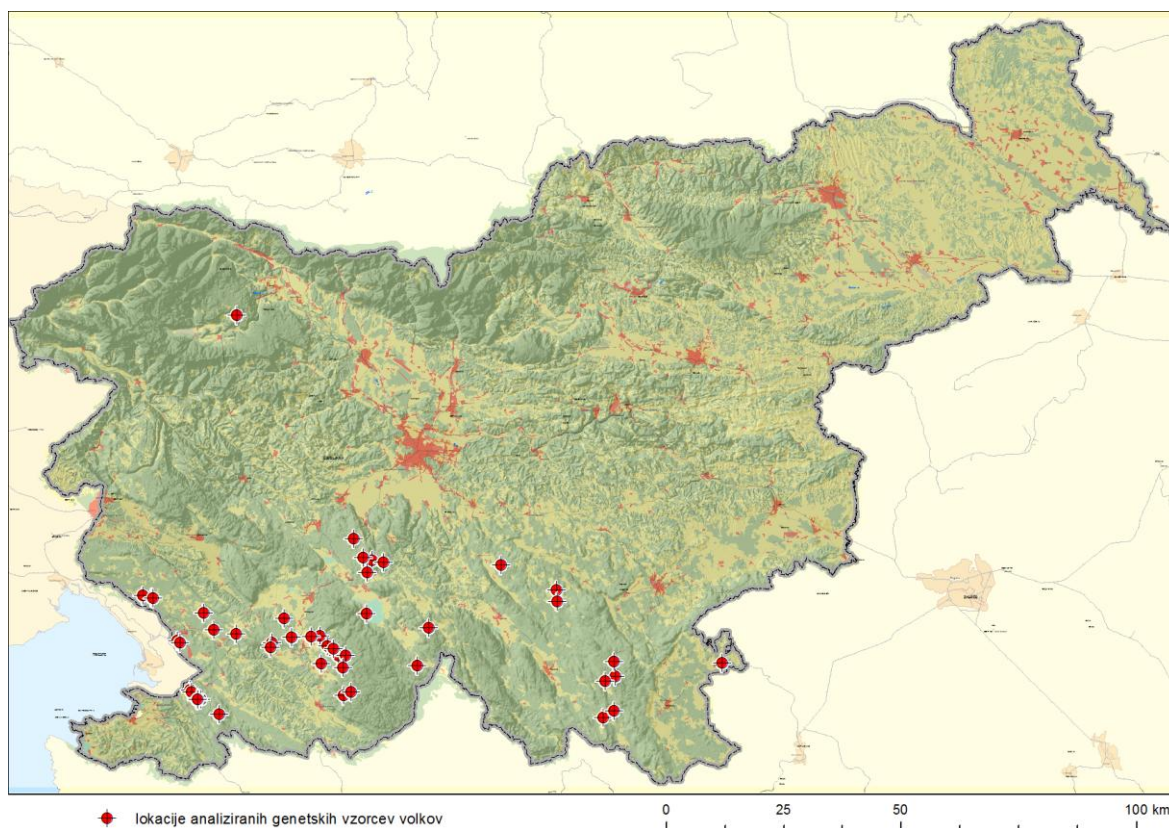
Slika 10 prikazuje območje zbiranja vzorcev DNA, slika 11 pa posamezne kraje vzorčenja.



Slika 10: Prikaz območja vzorčenja

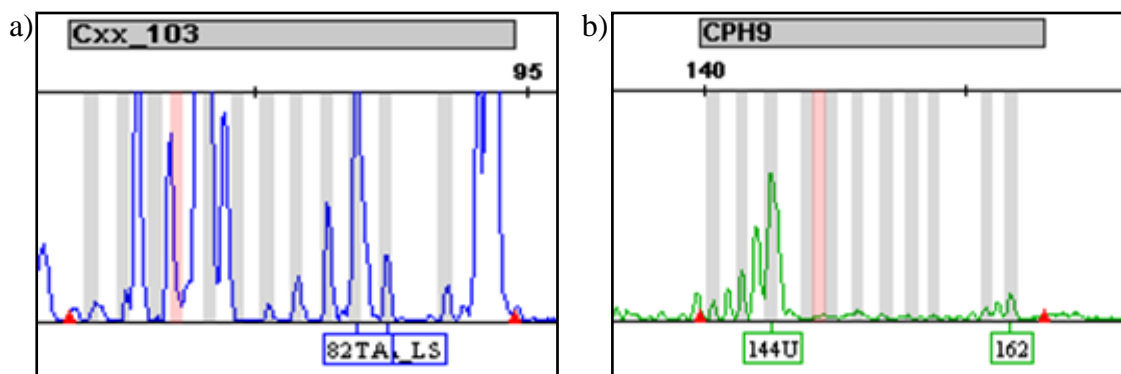
**Preglednica 4:** Zbrani vzorci po regijah (Obalno-kraška regija-OK, Notranjsko-kraška regija-NK, Jugovzhodna Slovenija-JV, Goriška-GŠ, Gorenjska-GJ, Osrednjeslovenska regija-OS)

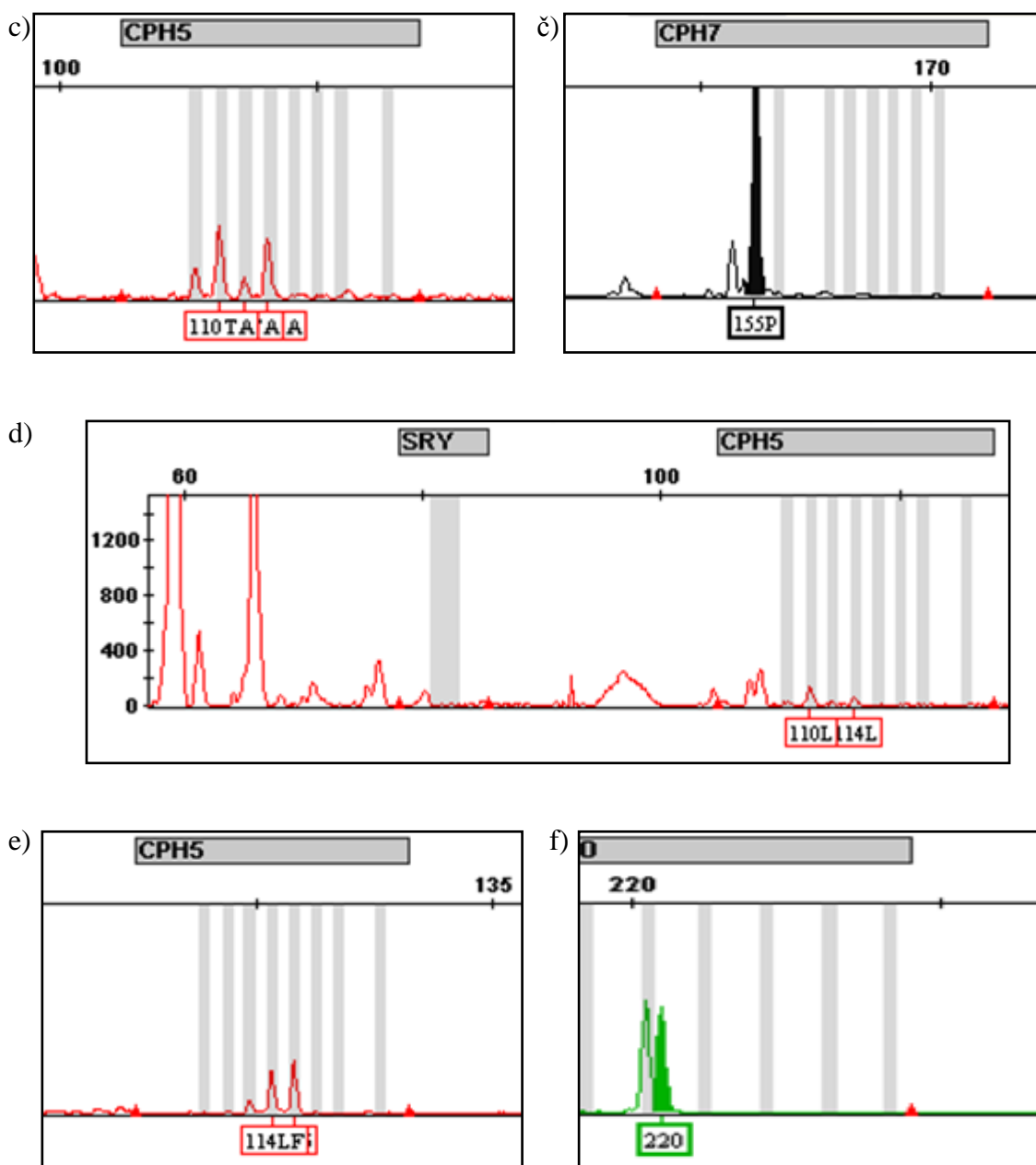
regija	OK	NK	JV	GŠ	GJ	OS	ni podatka
število vzorcev	59	35	13	5	2	2	18



**Slika 11:** Zemljevid s kraji vzorčenja

Na sliki 12 so primeri označevanja alelov z različnimi opozorilnimi oznakami (c) TA - trije aleli, b) U - nejasen alel, č) P - premočno pomnožen alel, d) L - nizek alel, e) LF - nizek prvi alel, a) LS - nizek drugi alel, f) OB - alel zunaj območja) v izpisih iz sekvenatorja v programskem orodju GeneMapper. Sivi stolpci predstavljajo pričakovana območja alelov, rdeči stolpci pa pričakovane mutirane alele v sekvenci.





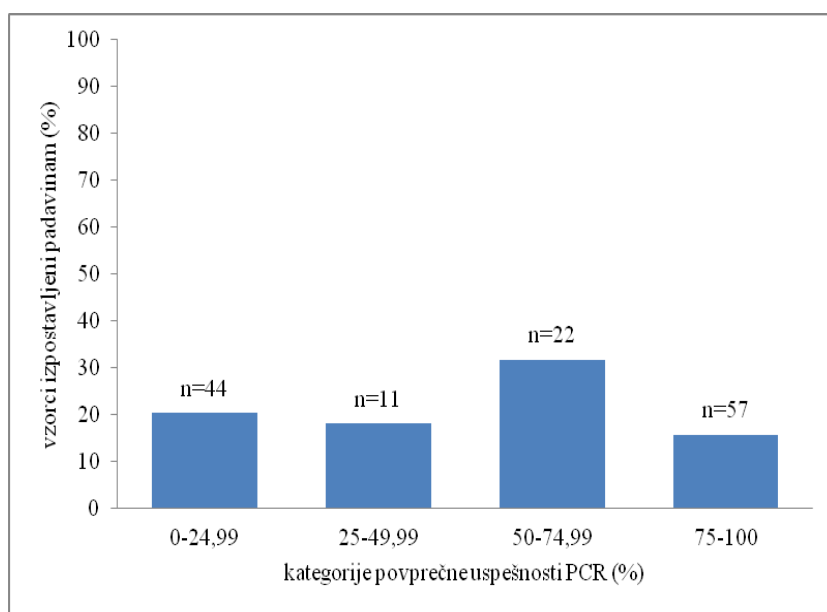
**Slika 12:** Primeri izpisov iz sekvenatorja (elektroferogramov) in označevanja alelov z različnimi opozorilnimi oznakami (c) TA - trije aleli, b) U - nejasen alel, č) P - premočno pomnožen alel, d) L - nizek alel, e) LF - nizek prvi alel, a) LS - nizek drugi alel, f) OB - alel zunaj območja)

### 3.1 VPLIV VREMENSKIH RAZMER

Vzorci smo razdelili v štiri skupine glede na uspešnost pomnoževanja (0–25 %, 25–50 %, 50–75 % in 75–100 %) ter znotraj vsake skupine pregledali število vzorcev, ki so bili pobrani v deževnem vremenu. Na sliki 13 so prikazani deleži slednjih. Med vzorci z visoko uspešnostjo pomnoževanja imamo najnižji delež vzorcev izpostavljenih padavinam (16 %).

V razred nižji kategoriji (50–75 %) je delež vzorcev pobranih v deževnem vremenu znašal največ (32 %), medtem ko je bil v zadnjih dveh kategorijah (25–50 % in 0–25 %) ta precej nižji (18 % in 20 %). Povprečna uspešnost pomnoževanja predstavlja delež pomnoževanj DNA, kjer smo zaznali PCR produkte.

Povezavo med vremenom in uspešnostjo pomnoževanja smo statistično testirali s testom hi-kvadrat (Preglednica 5 in 6).



Slika 13: Vpliv padavin na obstojnost DNA (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije)

Preglednica 5: Izmerjene in pričakovane (v oklepaju) vrednosti hi kvadrat testa za suho in vlažno vreme

	0-24,99	25-49,99	50-74,99	75-100	skupaj
suho	35 (35,13)	9 (8,78)	15 (17,57)	48 (45,51)	107
padavine	9 (8,87)	2 (2,22)	7 (4,43)	9 (11,49)	27
skupaj	44	11	22	57	134

Preglednica 6: Vrednost hi-kvadrat ( $\chi^2$ ), stopinj prostosti (SP), odstotka tveganja ( $\alpha$ ) in hi-kvadrat pri danem odstotku tveganja ter stopinjah prostosti ( $\chi^2_{0,95}(3)$ )

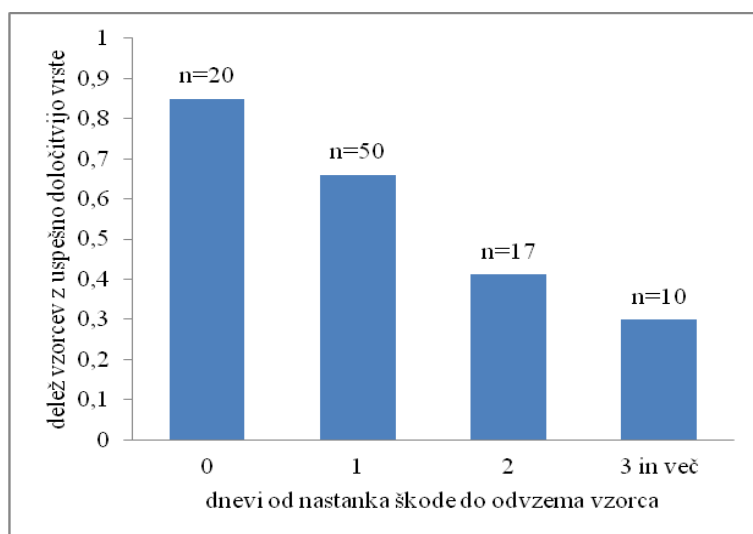
$\chi^2$	2,56
SP	3
$\alpha$	0,05
$\chi^2_{0,95}(3)$	7,815

Iz rezultatov ne moremo razbrati bistvenega vpliva padavin na obstojnost DNA in s tem na uspešnost pomnoževanja. Pričakovali bi, da bo le-ta nižja pri vzorcih, ki so bili pred odvzemom s trupla uplenjene živali izpostavljeni dežju. Ker smo uspeli pridobiti le 27 takih vzorcev, trenutno ni mogoče trditi, da padavine zmanjšajo uspešnost pomnoževanja.

S testom hi kvadrat smo potrdili ničelno hipotezo o neodvisnosti med spremenljivkama ( $\chi^2_{0,95}(3) > \chi^2$ ).

### 3.2 VPLIV ČASOVNE SPREMENLJIVKE

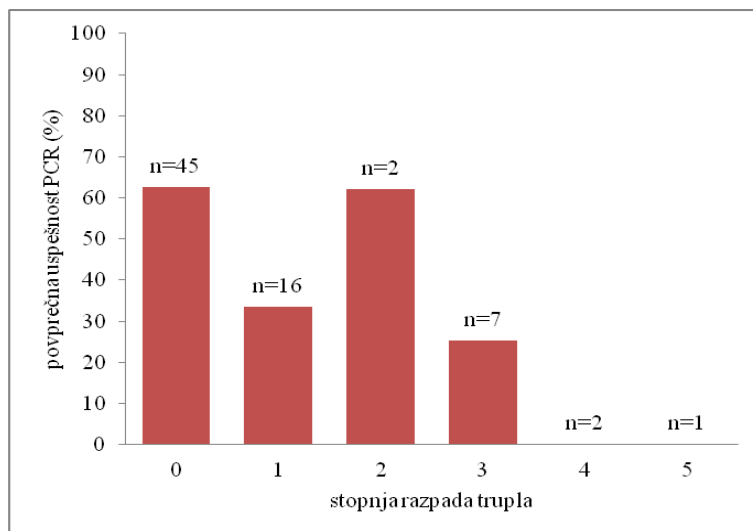
Na sliki 14 opazimo določen trend upadanja uspešnosti določitve povzročiteljev škod (volk, lisica in pes) s časom, ki preteče od napada do odvzema vzorca. Rezultati sledijo našim začetnim predpostavkam, ki se opirajo na dejstvo, da s časom kvaliteta DNA upada. Preverili smo ali se s starostjo trupla delež zaznanih lisic povečuje in ugotovili, da za naše vzorce domnevano ne velja. Razlog take domneve je poznavanje prehranjevalnih navad lisice. Zavrlo manjših razlik v številu vzorcev med kategorijami smo zadnje tri kategorije časa združili.



**Slika 14:** Delež vzorcev, za katere smo lahko določili kateri živalski vrsti pripada zaznana DNA, v odvisnosti od časa, ki je pretekel od nastanka škode do odvzema vzorca (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije)

Stopnjo razpada trupla vzorčevalec oceni na podlagi stanja razkrojenosti trupla živali ob prihodu na kraj škodnega primera (0-truplo v dobrem stanju, 6-povsem razgrajeno truplo). Upoštevajoč potrjeno domnevo o upadanju uspešnosti pomnoževanja s časom in dejstvo, da je stopnja razpada trupla vezana na čas, bi pričakovali nekoliko drugačen izid (Slika

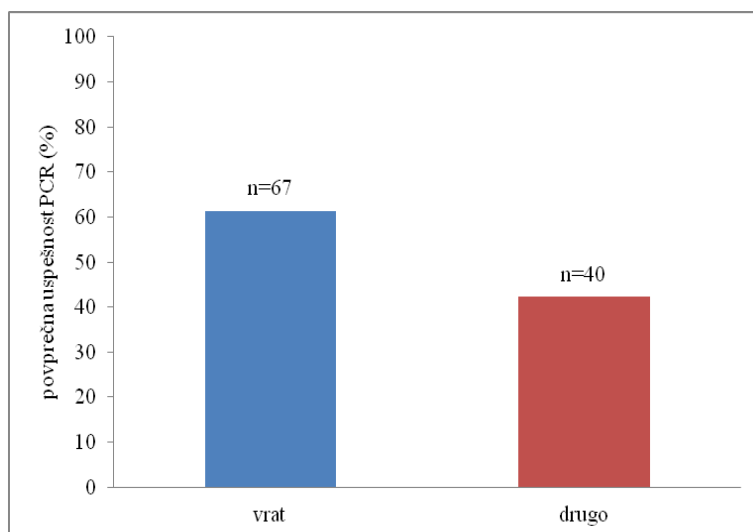
15). Kljub temu lahko zaključimo, da cenilci škodnih primerov dobro ocenjujejo razpadlost trupla.



**Slika 15:** Uspešnost PCR v odvisnosti od stopnje razpada trupla (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije)

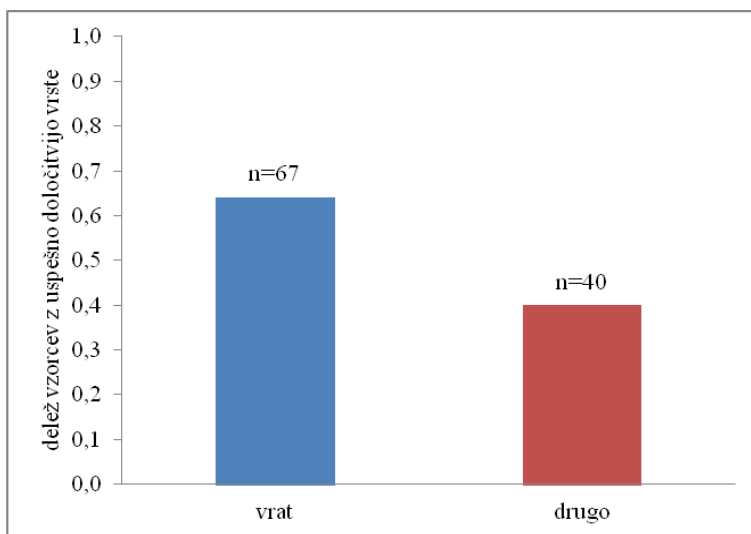
### 3.3 VPLIV ODVZEMNEGA MESTA

Vzorci, pobrani z vratu ubite živali, imajo za približno 19 odstotnih točk večjo povprečno uspešnost pomnoževanja od vzorcev, ki so bili izolirani z drugih delov trupla (Slika 16). Delež uspešno določenih vrst med obema kategorijama odvzemnih mest se razlikuje za 24 odstotnih točk (Slika 17). Vrat je bil izbran kot ena izmed kategorij na podlagi predhodnega znanja o tehniki volčjega plenjenja, ki temelji na usmrtni ugriz v vrat, ter velikega števila vzorcev s tega predela.



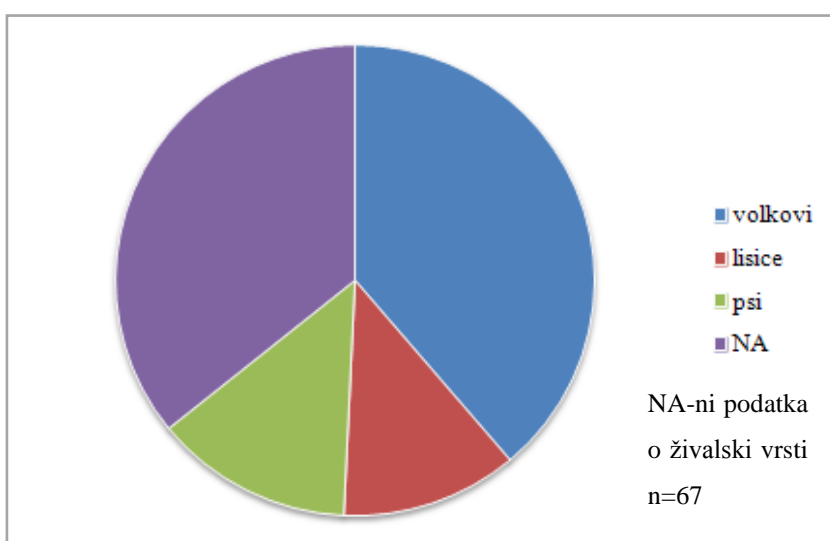
**Slika 16:** Uspešnost pomnoževanja DNA v odvisnosti od mesta odvzema vzorca (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije)



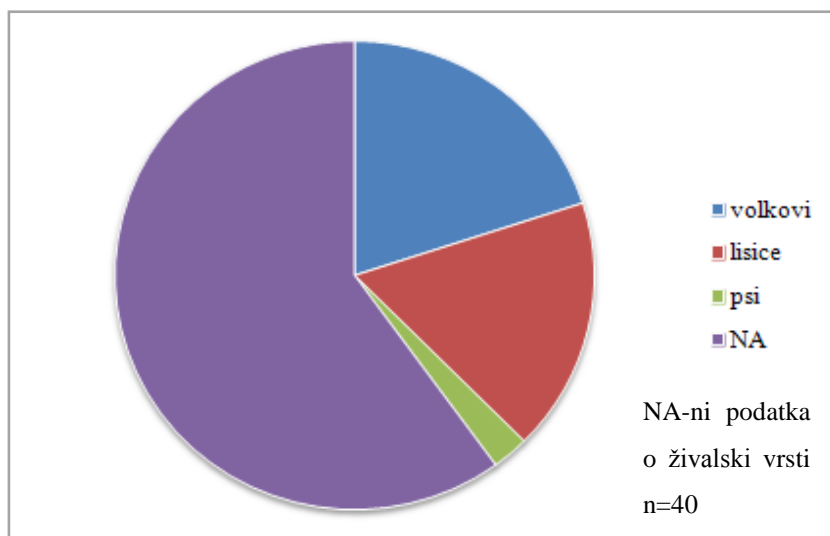


**Slika 17:** Delež vzorcev DNA, za katere smo lahko določili kateri živalski vrsti pripada, v odvisnosti od mesta odvzema vzorca (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije)

Izbira mesta odvzema vzorca (vrat, drugo) vidno vpliva na uspešnost analize. Razlog ujemanja grafov na slikah 16 in 17 je razumljiv, saj uspešno določena živalska vrsta hkrati zavisi tudi od uspešnosti PCR. Iz pridobljenih podatkov je razvidno, da ima večina vzorcev z določeno živalsko vrsto visok odstotek povprečne uspešnosti pomnoževanja (povprečno 79 %), vzorci brez podatkov o vrsti pa precej nizkega (skupaj z mešanimi vzorci povprečno 22 %). Več kot polovico slednjih nismo uspeli pomnožiti, za razliko od vzorcev z ugotovljivo vrsto, kjer popolnoma neuspešnih pomnoževanj nismo zaznali, pri 51-ih od 76-ih pa je bila slednja nad 75 %.



**Slika 18:** Delež živalskih vrst pri vzorcih z vratu trupla (n predstavlja število vzorcev)



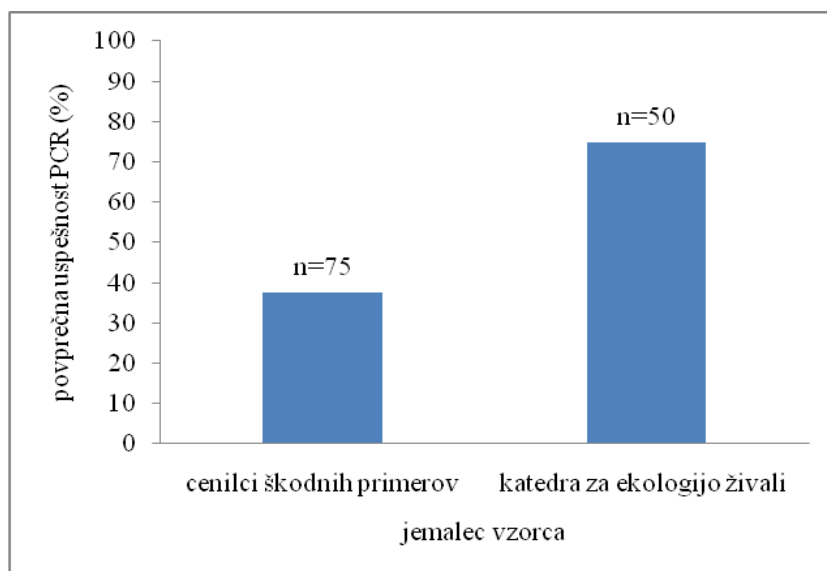
**Slika 19:** Delež živalskih vrst pri vzorcih z ostalih predelov trupla (n predstavlja število vzorcev)

Na slikah 18 in 19 je prikazana primerjava uspešnosti ugotavljanja vrste na podlagi vzorcev DNA v slini ugrizov na vratu in na ostalih delih plena. Delež ugrizov volka in psa je pri vzorcih z vratu občutno večji, medtem ko se delež ugrizov lisice med vzorci vratu in drugimi deli plena bistveno ne razlikuje. Kar zadeva vzorce brez podatka o živalski vrsti, je razlika v deležu ugrizov precejšnja, saj je opazen skoraj dvakrat večji delež pri vzorcih odvzetih drugod s trupla. Poudariti velja, da število vzorcev za posamezno odzemno mesto ni enako (67 vzorcev z vratu, 40 z drugih delov).

Mešani vzorci so tisti vzorci, pri katerih smo na posameznem lokusu zaznali več kot dva alela. Ti aleli pripadajo različnim živalskim vrstam ali različnim osebkom znotraj živalske vrste. Izmed celotnega nabora 134 vzorcev smo v našem primeru dobili 12 takih vzorcev, znotraj katerih vzorci z vratu zavzemajo enak delež kot vzorci z ostalih predelov živali, vzorcev z nedoločenim mestom odvzema pa ni bilo. Ker vključujejo mešani vzorci variabilnost prehranjevanja posameznih živalskih vrst oziroma posameznih osebkov iste vrste, smatramo rezultate za pričakovane.

### 3.4 USPEŠNOST RAZLIČNIH VZORČEVALCEV

Uspešnost pomnoževanja DNA iz vzorcev odvzetih s strani cenilcev škod ter vzorčevalcev s katedre za ekologijo živali je zavzemala vrednosti med 0 % in 100 %, v povprečju pa je le-ta znašala 38 % za cenilce škod in 75 % za ostale (Slika 20).



**Slika 20:** Primerjava uspešnosti PCR med vzorci odvzetimi s strani uslužbencev ZGS-ja in vzorčevalci s katedre za ekologijo živali (n predstavlja število vzorcev znotraj posamezne kategorije)

### 3.5 PRIKAZ VPLIVA SPREMENLJIVK Z MODELOM LOGISTIČNE REGRESIJE

Vpliv večjega števila spremenljivk na uspešnost pomnoževanja smo preverili z modelom multivariatne logistične regresije. Spremenljivko stopnja razpada smo izključili iz modela zaradi prevelikega števila manjkajočih podatkov (58 manjkajočih podatkov od 134 vzorcev), saj bi s tem izgubili tudi podatke ostalih spremenljivk. Tako smo v analizo vključili neodvisne spremenljivke: čas, padavine in mesto odvzema. Selekcija modelov po načinu »backward elimination« nam je za najbolj varčen model določila model s spremenljivko čas (Preglednica 7), učinka spremenljivk »mesto odvzema« in »padavine« pa z našimi podatki nismo mogli dokazati. Za vpliv časa na uspešnost pomnoževanja smo nato ločeno izvedli še model univariatne logistične regresije (Preglednica 8) in ugotovili močno statistično značilnost vpliva časa do odvzema vzorca na uspešnost pomnoževanja DNA ( $p=0,006$ ).

**Preglednica 7:** Model multivariatne logistične regresije po »backward stepwise« načinu za spremenljivke čas, padavine in mesto odvzema (računalniški izpis SPSS) (SN-standardna napaka, IZ-interval zaupanja)

	ocena parametra	SN	p-vrednost	razmerje obetov	95% IZ za razmerje obetov		
					sp. meja	zg. meja	
Korak1:	čas	-0,795	0,289	0,006	0,451	0,256	0,796
	padavine2	0,892	0,643	0,165	2,440	0,692	8,601
	mesto_odvzema2	-0,615	0,483	0,203	0,541	0,210	1,393
Korak2:	čas	-0,825	0,290	0,004	0,438	0,248	0,773
	padavine2	0,887	0,640	0,165	2,429	0,693	8,509
Korak3:	čas	-0,710	0,273	0,009	0,492	0,288	0,840

Prvi korak modela vključuje vpliv vseh treh spremenljivk, pri drugem koraku je izločen vpliv mesta odvzema, pri tretjem pa vpliv padavin. Izmed 134 vzorcev jih je bilo v analizo vključenih 93, 41 je bilo takih s pomanjkljivimi podatki.

**Preglednica 8:** Model univariatne logistične regresije za spremenljivko čas (računalniški izpis SPSS) (SN-standardna napaka, IZ-interval zaupanja)

	ocena parametra	SN	p-vrednost	razmerje obetov	95% IZ za razmerje obetov	
					sp. meja	zg. meja
Korak 1: čas	-0,595	0,215	0,006	0,552	0,362	0,840

Pri analizi se je upoštevalo 107 vzorcev, ostalih 27 ni izpolnjevalo zahtev.

### 3.6 OCENA NAJMANJŠE KOLIČINE VZORCEV

Opirajoč se na podatke pridobljene iz vzorcev pobranih na terenu smo z upoštevanjem binomske porazdelitve poskušali napovedati najmanjše potrebno število vzorcev. Najprej nas je zanimalo koliko vzorcev bi bilo treba odvzeti s posamezne ugrizne rane oziroma s posameznega plena, da bi dobili dovolj veliko verjetnost zaznave živalske vrste (95 %) v vsaj enem od pobranih vzorcev (Preglednica 9). Pri tem imata pomembno vlogo finančni ter časovni dejavnik, torej je bila naša naloga najti najmanjše število vzorcev za

izpolnjevanje pogojev. V drugem primeru smo želeli izvedeti, kako se z različno starostjo trupla (od nič do dva dneva) spreminja število odvzetih vzorcev, da zadosti 95 % verjetnosti zaznave genotipa v najmanj enem vzorcu (Preglednica 10).

**Preglednica 9:** Verjetnost, da v najmanj enem vzorcu zaznamo živalsko vrsto v odvisnosti od števila odvzetih vzorcev

št. poskusov odvzema vzorca	verjetnost, da v najmanj enem vzorcu dobimo genotip
1	0,6567
2	0,8822
3	0,9595
4	0,9861
5	0,9952
6	0,9984
7	0,9994
8	0,9998

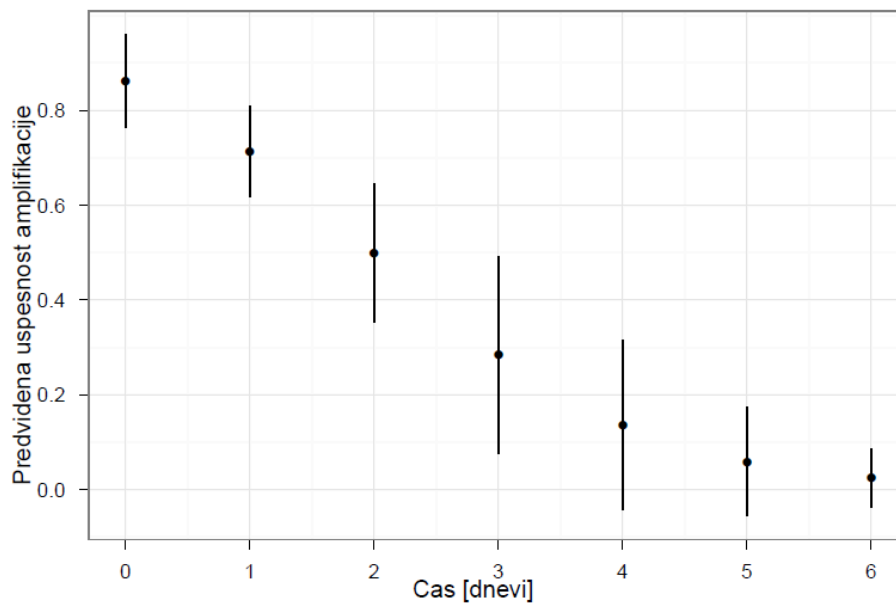
Pri prehodu iz enega na dva odvzeta vzorca se verjetnost znatno poveča. Razlika je kar velika tudi med dvema in tremi odvzetimi vzorci, z vsakim nadaljnjim korakom pa je čedalje manjša in pri osmih vzorcih je uspešen dokaz živalske vrste v vsaj enem vzorcu skoraj zagotovljen.

**Preglednica 10:** Prikaz potrebnega števila vzorcev za najmanj 95% verjetnost zaznave vsaj enega genotipa

dnevi od nastanka škode do odvzema vzorca	delež zaznanih živalskih vrst	št. odvzetih vzorcev in pripadajoča verjetnost zaznave živalske vrste v najmanj enem vzorcu
0	0,85	2 (0,9775)
1	0,66	3 (0,9607)
2	0,41	6 (0,9586)

Za izpolnjevanje kriterija bi morali na dan škodnega primera odvzeti dva, pri en dan starem truplu tri in pri truplu, na katerem je nastala škoda pred dvema dnevoma, šest vzorcev (trikrat več kot pri svežem truplu).

Na podlagi izida multivariatne logistične regresije (Preglednica 7) smo v statističnem programu R izvedli napoved uspešnosti pomnoževanja v odvisnosti od starosti trupla živali (Slika 21).



**Slika 21:** Napoved uspešnosti pomnoževanja DNA (skupaj s standardnimi napakami) glede na čas, ki preteče od nastanka škodnega primera do odvzema vzorca

## 4 RAZPRAVA

Cilji raziskave za diplomsko delo so bili sledeči:

- razviti protokol za odvzem slin z živali, ki naj bi jo ubili volkovi;
- vpeljati laboratorijski protokol za ekstrakcijo in pomnoževanje DNA iz vzorcev slin;
- optimizirati nabor mikrosatelitskih lokusov za individualno prepoznavanje osebkov;
- oceniti uspešnost pomnoževanja DNA pridobljene iz ugriznih ran;
- oceniti uporabnost protokolov s pomočjo vzorcev s terena in jih po potrebi prilagoditi.

### 4.1 GENOTIPSKE NAPAKE:

Pri genotipskih napakah gre za neskladje med genotipom eksperimentalnega vzorca in znanim genotipom (Taberlet in sod., 1999). Zanje je značilen raznolik, zapleten in včasih nejasen izvor, zato je težko najti jasen vzrok napakam in s tem zmanjšati njihovo razmerje. Pompanon in sodelavci (2005) so genotipske napake razvrstili v štiri skupine: **napake povezane s sekvenco DNA, napake zaradi nizke kvalitete ali kvantitete DNA, biokemični artefakti in človeški faktorji** (klicanje alelov, pomešanje vzorcev, napake pri pipetiranju, kontaminacija).

Pri študijah mikrosatelitov je najpogostejša napaka na sekvenci nastanek ničelnih alelov (Paetkau in Strobeck, 1995). Gre za neuspešno pomnoževanje alela zaradi mutacije na mestu vezave začetnega oligonukleotida. Običajno so vzroki zamenjave v bližini 3' konca oligonukleotidnega začetnika, insercije ali delecije (Pompanon in sod., 2005).

Majhno število tarčnih molekul DNA v ekstraktu povzroči bodisi pretirano razredčitev ali degradacijo DNA, oboje pa vodi v izpad in pojavljanje lažnih alelov. Izredno se poveča tudi nevarnost kontaminacije (Taberlet in sod., 1996), saj imajo pri majhnem številu molekul okužene večjo verjetnost širjenja (Pompanon in sod., 2005).

Ob koncu elongacijskega koraka pri PCR *Taq* polimeraza navadno doda nukleotid (običajno adenin) na 3' konec novo nastale verige (Brownstein in sod., 1996). Ta »+A artefakt« ni nič nenavadnega, ustvari pa razcepljen vrh in lahko tako povzroča težave pri klicanju alelov (Pompanon in sod., 2005).

Genotipskim napakam se lahko izognemo z ekstrakcijo večje količine nukleinskih kislin z vzorca, s čimer pridobimo več potencialno tarčne DNA. Pri tem tvegamo, da material ne

izhaja samo iz ene živali ali da dobimo večjo količino snovi, ki zavirajo ali motijo PCR (Taberlet in sod., 1999). Druga možnost je odvzem čim bolj svežega vzorca. DNA lahko namreč s časom razpade, s čimer se zmanjša število potencialno uporabnih tarčnih mest, če je material dlje časa izpostavljen vplivom okolja (Frantzen in sod., 1998). Možno je hkratio pomnoževanje večjega števila lokusov med PCR, vendar je sam postopek tehnično zahteven ali celo neizvedljiv. Bolj konzervativen pristop k omenjenemu problemu je neodvisno in večkratno pomnoževanje lokusov, ki pa je časovno potratno in dražje od ostalih, zato je manj zaželeno. Genotipske napake je mogoče omejiti tudi s previdnejšo izbiro DNA markerjev. Pri tem gre bodisi za izbiro tri- ali tetranukleotidnih mikrosatelitskih zaporedij namesto dinukleotidnih (manjša nevarnost lažnih alelov), bodisi za uporabo markerjev z višjo heterozigotnostjo (manjša nevarnost izpada alelov) (Taberlet in sod., 1999).

Zmanjšanje kontaminacije zahteva določene varnostne ukrepe pri zbiranju vzorcev na terenu ter v laboratoriju (Piggott, 2004). Mednje sodi prepoved dotikanja vzorcev z golimi rokami (izjema v primeru rabe markerjev, kjer se ne pomnožuje človeške DNA), menjava ali pranje in sterilizacija predmeta za jemanje vzorca ter izogibanje mešanim vzorcem (Wilson in sod., 2003). V laboratoriju morata biti delovna prostora, kjer se izvajajo analize pred in po pomnoževanju prostorsko ločena (ločeni sobi, raje ločeni nadstropji ali poslopji), dotok opreme in ljudi naj bi vedno potekal v smeri iz prostora za analize po pomnoževanju v prostor za analize pred pomnoževanjem. Pri kontaminaciji ima pomembno vlogo tudi čistoča laboratorija, pravilna laboratorijska tehnika (dnevno čiščenje delovnih površin in laboratorijske opreme, natančno pipetiranje, uporaba elektronskih pipet in nastavkov za pipete s filtri, izvajanje vseh laboratorijskih postopkov z vpeljanimi protokoli, beleženje laboratorijskega dela, elektronsko shranjevanje podatkov) (Waits in Paetkau, 2005) ter prisotnost vsaj ene negativne kontrole pri vsaki ekstrakciji in PCR (Piggott in sod., 2004).

Kot pri vsakem analitskem postopku morajo biti na DNA bazirane metode potrjene preden se jih uveljavi ter stalno kontrolirane zaradi natančnosti (Taberlet in sod., 1996).



## 4.2 RAZVOJ PROTOKOLA ZA ODVZEM SLINE:

Po učinkovitosti ni izstopal noben izmed preizkušenih vatirancev (bombažen vatiranec, vatiranec iz umetne svile, vatiranec prevlečen z najlonskimi vlakni). Po pregledu drugih tipov vatirancev smo se odločili za uporabo praktičnega ter cenovno ugodnega vatiranca iz bombaža, shranjenega v desikantu (sušilu). Ta veže nase vlago in omogoča varno shranjevanje vzorca sline, vzorčevalcu pa prihrani čas na terenu, ki bi ga porabil za sušenje vatiranca na zraku. Kot medij smo izbrali 96 % etanol, s katerim za razliko od destilirane vode poberemo celice ustne sluznice, ki se prilepijo na maščobo v okolici ugrizne rane.



**Slika 22:** Primer etiketiranja vrečk in vatirancev

Sundqvist in sodelavci (2008) so priporočali jemanje sline ob robovih ugriznih ran in izogibanje krvi plena. Naš poskus je potrdil, da se največja količina sline nabere ravno na robu ugriza ter v predelu zgornjega in spodnjega neba, kjer pa ni primerna za odvzem zaradi prisotnosti krvi ubite živali. Sledljivost podatkov s terena je bila dosežena z etiketami na vrečkah in vatirancih s splošnimi informacijami o škodnem primeru (številka škodnega primera, čas nastanka, datum odvzema, kraj nastanka, GIS koordinate, najditelj, številka vatiranca) oziroma trplju (prisotnost padavin, vrsta in spol ubite živali, mesto odvzema, stopnja razpada, številka vatiranca) (Slika 22).

Vpliv različnih načinov hranjenja vzorcev na kvaliteto DNA so preučevali številni raziskovalci (Frantzen in sod., 1998), vendar se noben ni izkazal za očitno boljšega. Sklep različnih študij je za optimalno tehniko hrambe določil sušenje s silikagelom (Wasser in sod., 1998) ter namakanje v etanolu (Frantz in sod., 2003) ali pufriu DETs (DMSO, EDTA, Tris in sol) (Frantz in sod., 1998). Benecke (2005) zagovarja hranjenje v standardiziranih papirnatih vrečkah (kuverte, rjave papirnatate vrečke) v suhih in hladnih prostorih, kar ohranja DNA stabilno mesece in leta. Priporoča zamrzovanje vzorcev pod  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , če je le-te potrebno skladiščiti več kot dve leti, in v zamrzovalniku kuverte postaviti v plastične vrečke ter s tem preprečiti, da bi se papirnatate plasti zlepile. Po mnenju Waitsa in Paetkaua (2005) bi utegnila kombinacija hrambe v silikagelu in zamrzovanje dati optimalne rezultate. V okviru diplomskega dela smo se odločili za zamrzovanje vzorcev shranjenih v plastični vrečki in silikagelu.

Priporočila predhodnih raziskav s področja forenzike plenjenja (Williams in sod., 2003; Blejwas in sod., 2006; Sundqvist in sod., 2008) so nam bila v pomoč pri oblikovanju protokola terenskega in laboratorijskega dela ter obdelavi podatkov. Mednje sodijo večje število pomnoževanj za potrditev genotipov, odvzem vzorcev z različnih vbodnih ran na posameznem truplu, izvajanje pomnoževanja pri plenu in plenilcu, odvzem več vzorcev na škodni primer za zagotovitev zadostne količine DNA plenilca in odvzem več vzorcev z ugrizne rane zaradi pogostega izpada alelov. Najdemo tudi nekaj ugotovitev primerljivih z ugotovitvami diplomskega dela. Enako kot raziskovalcem pred nami (Williams in sod., 2003; Blejwas in sod., 2006; Sundqvist in sod., 2008) so se nam uspešno pomnožili vzorci, pobrani v različnih okoljskih razmerah (suho/vlažno vreme, visoke/nizke temperature), med plenilci drobnice so prevladovali samci in ravno tako smo dokazali, da imajo vremenske razmere manjši vpliv na uspešnost analize DNA od ostalih dejavnikov (odvzem vzorca, število plenilcev, uspešna določitev ...).

#### 4.3 NABOR MIKROSATELITNIH LOKUSOV:

Iz izbranih mikrosatelitov smo sestavili hkratni PCR A in B, kjer smo pri enem pomnoževanju imeli od 8 do 13 lokusov (CPH2, CPH4, CPH5, CPH6, CPH7, CPH8, CPH9, CPH12, CPH22, C09.250, C20.253, Cxx20, FH2004, FH2010, FH2079, FH2088, FH2096, FH2132, FH2137, SRY, VWF). Lokus SRY je vezan na Y spolni kromosom in

smo ga tako uporabili za določanje spola volkov. Specifičen je za zveri, kar nam zagotavlja, da ne dobivamo napačno določenega spola plenilca kljub prisotnosti DNA uplenjene živali.

Na podlagi rezultatov preliminarnih preizkusov je bila sestavljena hkratna PCR D, ki vsebuje že uporabljene lokuse (CPH5, CPH7, CPH9, CPH8, CPH12, C09.250, C20.253, FH2010, SRY) in nekaj novih (Cxx.103, Cxx.121, FH2145). Razen lokusov FH2010 in FH2145 so vsi zgoraj naštetih lokusi dinukleotidni. V sklopu projekta LIFE+ SloWolf se bo referenčne vzorce pomnožilo še na dodatnih 12 mikrosatelitnih markerjih (CPH2, CPH4, CPH6, CPH22, FH2004, FH2088, FH2096, FH2137, VWF, Cxx\_123) kot hkratni PCR E in F. Na ta način bo možen dodaten vpogled v biologijo volka. Referenčni vzorec je tisti, ki izmed neinvazivnih vzorcev (tkivo, urin, iztrebek in slina) iste živali najbolje deluje ter se je v primeru slina predhodno izkazal za dobrega (v do osmih ponovitvah analize s hkratno PCR D se mora pomnožiti od 8 do 9 lokusov).

#### 4.4 USPEŠNOST POMNOŽEVANJA DNA, UPORABNOST PROTOKOLOV IN PRIPOROČILA:

Slina kot vir DNA vsebuje tako kot ostali neinvazivni vzorci (dlaka, iztrebki, urin) številne pomembne informacije, iz katerih se da ob zadostni količini podatkov ter s pravilnim pristopom in interpretacijo potegniti pomembne zaključke. Namen diplomske naloge je bil, skupaj z ostalimi raziskovalnimi aktivnostmi v sklopu projekta »Varstvo in spremljanje varstvenega statusa populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji«, prispevek k upravljanju populacije in k varstveni genetiki volkov.

S sodobnimi genetskimi metodami je z izbiro prave kombinacije mikrosatelitnih lokusov in s pravilnim postopanjem pri analizi podatkov mogoče določiti vrsto, spol in identiteto posameznega osebka v vzorcu ali trop, kateremu vzorec pripada. Na ta način je možen pregled aktivnosti posameznih tropov oziroma osebkov (pogostost povzročitve škodnih primerov, kraj nastanka škode).

V humani forenziki je analiza DNA z uporabo tehnik, ki temeljijo na PCR, nepogrešljiva že skoraj 30 let. Iz bioloških materialov, najdenih na mestu zločina, pridobivajo mikrosatelitne profile in jih primerjajo s profili osumljencev (Ayres, 2000). Mikrosatelitne profile se uporablja pri prepoznavanju krivcev, žrtev nesreč in družinskih članov. Zadnja leta je opaziti pomemben napredek v razvoju forenzičnih profilov. To se odraža kot raba

novih genetskih označevalcev SNP-jev («single nucleotide polymorphisms»), napredek v prepoznavanju elementov moške DNA v mešanih vzorcih in raba Y-kromosomskih mikrosatelitov (Y-STR) (Kayser in de Knijff, 2011).

Gledano v celoti so rezultati potrdili večino zastavljenih hipotez, le pri vplivu vremenskih razmer na uspešnost analize se je izkazalo, da so se naša pričakovanja razlikovala od zabeleženega stanja (Slika 12). Neodvisnost med spremenljivkama (vreme in uspešnost pomnoževanja) smo dokazali s testom hi-kvadrat (Preglednica 5 in 6). Vpliv mesta odvzema vzorca smo prikazali na več načinov. Preverili smo razlike v uspešnosti pomnoževanja med vzorci pobranimi na vratu in ostalih delih trupla (Slika 15), razlike med vratom in ostalimi deli trupla v deležu vzorcev z določeno živalsko vrsto (Slika 16) in primerjali razmerje med zaznanimi živalskimi vrstami pri vzorcih slin z vratu ter ostalih delov plena (Slika 17 in 18). V vseh primerih je predel vratu primernejše odzemno mesto od drugih delov telesa, kar podpira našo predpostavko. Rezultate vpliva časa, ki preteče od nastanka škode do odvzema vzorca, na kvaliteto DNA, smo prikazali z deležem vzorcev, katerim smo določili živalsko vrsto (Slika 13). Poleg tega smo podatke o času in pomnoževanju uporabili za napoved uspešnosti pomnoževanja v odvisnosti od starosti ubite živali (Slika 21). Dobljena krivulja je lep prikaz kako pomnoževanje s časom upada in je primerljiva s potekom grafa na sliki 13. S tem je potrjena začetna hipoteza ter z njo povezana nujnost čim hitrejše prijave škode.

Iz napovedi se je za najprimernejšo izbiro izkazal odzem treh vzorcev z verjetnostjo nekaj čez 95 % (Preglednica 7). Ob predpostavki, da finančno nismo omejeni in bi si radi zagotovili večjo verjetnost določitve živalske vrste, pa je odzem več kot treh vzorcev seveda zaželen. Število dni, ki preteče do odvzema vzorca, ima kot je opaziti iz preglednice 8, bistven vpliv na verjetnost zaznave vrste, kar se sklada z eno izmed hipotez. Rezultati vodijo do zaključka, da živalsko vrsto bolj verjetno zaznamo ob upoštevanju obeh dejavnikov: števila odvzetih vzorcev in starosti trupla.

Vpogled v analizo in primerjavo različnih tipov neinvazivnih vzorcev najdemo v neobjavljenem članku Skrbinška in sodelavcev (2007). Glede na rezultate predstavlja iz slin izolirana DNA najzanesljivejšo izbiro. Za najmanj primerne veljajo iztrebki (več kot

polovica vzorcev neuporabnih ali slabe kvalitete), rezultati urinskih vzorcev so nekoliko boljši (približno polovica vzorcev neuporabnih ali slabe kvalitete). Podatki o številu mešanih vzorcev so pričakovani, saj je verjetnost detekcije DNA več živalskih vrst iz sline v okolici vbodnih ran na truplu (poleg plenilčeve tudi DNA mrhovinarjev) večja, kot iz vzorcev iztrebka oziroma urina.

Navkljub relativno velikemu številu analiziranih vzorcev sline (46) je število alfa volkov nižje kot bi pričakovali (tako med samci kot med samicami predstavljajo le približno 10 % vzorcev). Domnevno bi v skupini volkov, ki pleni drobnico, moralo biti prisotnih več alfa živali. Te naj bi vodile plenjenje in imele nalogo učenja plenjenja mladičev (neobjavljeni podatki).

Opirajoč se na to, kar smo v diplomskem delu uspeli doseči, je dokazovanje plenilcev drobnice iz sline uspešnejše pri upoštevanju mesta odvzema vzorca in hitrosti ukrepanja ob nastalem škodnem primeru, zanemarljivo ni niti število odvzetih vzorcev. Postopek olajšuje preprosta metodologija vzorčenja, ki ne zahteva predhodnih izkušenj. Ta informacija velja za zelo pomembno pri nadaljnjem jemanju in proučevanju neinvazivnih vzorcev sline volka – v nasprotnem primeru bi bilo treba cenilce škodnih primerov dodatno izobraževati, kar bi zahtevalo več časa in finančnih sredstev.

Upoštevač rezultate zbranih vzorcev, se pes pojavlja kot krivec napadov v nekaj manj kot 10 % primerov (v 10 od 107 vzorcev). Tako sliko dobimo, če prištevamo mednje tudi vseh 48 vzorcev brez podatka o vrsti. V primeru, da bi prej navedene vzorce izpustili, bi se odstotek pasjih vzorcev opazno zvišal iz 10 % na 17 %. Opaziti je, da se izmed 10 vzorcev psov le en pojavlja na ostalih delih trupla, vsi ostali pa na vratu. Iz omenjenega bi bilo mogoče govoriti o psu kot ubijalcu živine, s trupli katerih se večinoma ne prehranjuje. Drugačno stanje imamo pri volku in lisici. Vzorca volkov so nekoliko bolj razporejeni na obe odvzemni mesti (26 vzorcev z vratu in 8 vzorcev z ostalih predelov), razporeditev vzorcev lisic pa je skoraj enakomerna (8 vzorcev z vratu in 7 vzorcev z ostalih predelov). Za volka tako lahko sumimo, da ne pleni živali zgolj zaradi ubijalskega nagona, temveč je cilj plenjenja zagotovitev hrane. Bolj ali manj enakovredno razporejeni vzorci lisice pa kažejo na prehranjevanje z mrhovino. Ta dognanja prinašajo pomembne informacije v zvezi z rešitvijo konflikta med lastniki domačih živali in volkom, vendar bi za trdnejši

dokaz potrebovali večji nabor vzorcev. Boljše razumevanje stanja v naravi in posledično pravi pristop k reševanju problematike škode na drobnici bi bil mogoč z izvajanjem še drugih pristopov, kot so uporaba učinkovitejšega sistema električnega ograjevanja in/ali psa čuvaja ter izobraževanje kmetov o preprečevanju škod. Zgoraj navedeno se spremlja v ostalih raziskavah znotraj projekta LIFE+ SloWolf, torej je več informacij pričakovati ob zaključku le-tega leta 2013. Pomisleke sproži zanimiv primer, kjer je pastirski pes identificiran kot krivec napada na drobnico (vzorec AH.03KF). V kolikor bi se v nadaljevanju vzorčenja pokazalo, da ne gre za edini primer, bi to smiselnost varovanja drobnice s psom čuvajem morda postavilo pod vprašaj. Taka situacija bi zahtevala dodatne raziskave na psih čuvajih.

Na podlagi predvidevanja, da se plenjene živali med sabo razlikujejo po velikosti in starosti, bi bilo v nadaljnje vzorčenje smotno vključiti pregledovanje omenjenih kategorij. V ta namen bi bilo potrebno izpopolniti etikete na vatirancih in vrečkah za sprotno beleženje na kraju škodnega primera. Z zbranimi podatki o velikosti in starosti ubitih živali bi se dalo prikazati dodatno selektivnost plenjenja med živalskimi vrstami in znotraj njih.

## 5 POVZETEK

Plenjenje domačih živali velja za problematiko vse odkar je človek začel rediti drobnico za lastne potrebe oziroma prodajo. V Sloveniji se v zadnjih dveh desetletjih vzreja vedno več drobnice na območju volka, kar povečuje verjetnost plenjenja domačih živali. Ob tem se zaradi prepovedi usmrtitev večja tudi število psov, iz česar se sklepa, da so za škodo kdaj krivi tudi ti. Običajno je pri škodnem primeru težko določiti ali je šlo za napad volka ali psa, tipično pa je krivda pripisana volku. Preprosto prepoznavanje povzročitelja (volk, pes, križanci) bi bilo omogočeno z uporabo forenzične genetike, a so izkušnje iz tega področja še precej v povojih.

V diplomskem delu smo skušali razviti protokol za odvzem slin s trupla živali ter laboratorijski protokol za ekstrakcijo in pomnoževanje DNA iz vzorcev slin, izbrati pravo kombinacijo mikrosatelitnih lokusov za prepoznavanje živalskih vrst in preveriti uspešnost pomnoževanja DNA z ugriznih ran ter uporabnost protokolov.

Raziskavo smo začeli s preliminarnim poskusom na domačem psu, katerega bistvo je bilo ugotoviti najprimernejša mesta odvzema slin z ugriznih ran. Pri tem smo preverjali tudi učinkovitost različnih vrst vatirancev in različnih medijev. Sledilo je pobiranje vzorcev na škodnih primerih po celotni Sloveniji. Terensko delo je trajalo skoraj dve leti, sodelovalo je 18 različnih vzorčevalcev. Na pridobljenih 134 vzorcih se je izvedlo izolacijo in pomnoževanje DNA, elektroforezo na sekvenatorju ter določevanje genotipov s programskim orodjem GeneMapper.

Za jemanje vzorcev na škodnih primerih smo izbrali bombažni vatiranec, shranjen v desikantu, ki ga pred uporabo namočimo v 96 % etanol. Kot odzemno mesto je bila določena okolica ugrizne rane, izmed preizkušenih mikrosatelitov pa je bilo izbranih 12 lokusov, združenih v hkratno PCR D. Vzorce smo do izvedbe analize hranili v plastičnih vrečkah v zamrzovalniku. Obdelava zbranih podatkov je vodila do ugotovitev, ki so tako potrdile kot ovrgle začetna predvidevanja. Vpliv vremenskih razmer na uspešnost PCR se je izkazal za zanemarljivega, kar smo dokazali s testom hi-kvadrat. Nasprotno imata dejavnika starosti trupla in mesta odvzema vzorca očitno vpliv na uspešnost pomnoževanja

oziroma določitve povzročiteljev škod. Pri prvem opazimo upad uspešnosti s časom, pri drugem predstavlja vrat primernejše odvzemno mesto od ostalih delov trupla. Domnevno pes žival le ubije, volk se s truplom tudi hrani, lisica pa je mrhovinar. Selekcija modelov z multivariatno logistično regresijo je potrdila statistično značilnost časovne spremenljivke. Med pomembnejši spoznanji sodita dokaz nezahtevnosti vzorčenja in rezultati izračuna napovedi. Ti prikazujejo pomen, ki ga imata število odvzetih vzorcev ter čas do odvzema vzorca na verjetnost zaznave živalske vrste.



## 6 SKLEPI

- Na podlagi preliminarnega poskusa je bil za odvzem vzorca slina s trupla ubite živali določen poseben bombažni vatiranec, shranjen v desikantu. Tega se je pred vzorčenjem namočilo v 96 % etanol, vzorce se je po priporočilih jemalo z obrobnege dela ugrizne rane.
- Pomnoževanje DNA je potekalo na izbranih 12 mikrosatelitnih lokusih (CPH5, CPH7, CPH9, CPH8, CPH12, C09.250, C20.253, FH2010, SRY, Cxx.103, Cxx.121, FH2145).
- Vzorci, odvzeti pri spremenljivih razmerah v okolju (suho/vlažno vreme, visoke/nizke temperature), so se uspešno pomnožili.
- Upoštevanje mesta odvzema vzorca in hitrosti ukrepanja ob nastalem škodnem primeru pripomore k učinkovitejšemu dokazovanju plenilcev drobnice, vpliv ima tudi število odvzetih vzorcev.
- Metoda vzorčenja je preprosta in ne zahteva predhodnih izkušenj.
- Domnevamo, da gre pri psu samo za ubijanje drobnice, pri volku za plenjenje z namenom prehranjevanja in za prehranjevanje z mrhovino pri lisici.
- Odstotek pasjih vzorcev ni zanemarljiv.

## 7 LITERATURA

Adamič M., Koren I. 1998. Možnosti povratka velikih zveri v Alpe. Zbornik referatov: XIX. gozdarski študijski dnevi – Gorski gozd, Logarska dolina. Str. 53-64.

Ayres K.L. 2000. Relatedness testing in subdivided populations. *Forensic Sci Int* 114: 107–115

Ballard W.B., Ayres L.A., Krausman P.R., Reed D.J., Fancy S.G. 1997. Ecology of wolves in relation to a migratory caribou herd in northwest Alaska. *Wildlife Monographs*, no. 135. The Wildlife Soc., Bethesda, MD. 47 pp.

Benecke M. 2005. Forensic DNA samples – Collection and handling. *International Forensic Research and Consulting* 1: 500-504

Biknevicius A.R., Van Valkenburgh B. 1996. Design for killing: Craniodental adaptations of predators. Pp. 393-428. V: *Carnivore behavior, ecology and evolution*, vol.2. Gittleman J.L. (eds.). Cornell University Press, Ithaca, NY.

Bjarvall A., Nilsson E. 1976. Surplus-killing of reindeer by wolves. *J Mammal* 57: 585

Blejwas K., Williams C.L., Shin G.T., McCullough D.R., Jaeger M.M. 2006. Salivary DNA evidence convicts breeding male coyotes of killing sheep. *J Wildlife Manage* 70: 1087–1093

Boitani L. 1982. Wolf management in intensively used areas of Italy. Pp. 158-72. V: *Wolves of the world: Perspectives of behavior, ecology, and conservation*. Harrington F.H., Paquet P.C. (eds.). Noyes Publications, Park Ridge, NJ.

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*. Council of Europe, Strasbourg. 81 pp.

Breitenmoser U. 1998. Large predators in the Alps: the fall and rise of man's competitors. *Biol Conserv* 83: 279–289

Brezigar M.A., Masten I. 2007. Comparison of Parametric, Semi-parametric and Non-parametric Methods in Bankruptcy Prediction. 24 str.

Brownstein M.J., Carpten J.D., Smith J.R. 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 20: 1004-1010

Carbyn L.N., Oosenbrug S.M., Anions D.W. 1993. Wolves, bison and the dynamics related to the Peace Athabaska Delta in Canada's Wood Buffalo National Park. Circumpolar Research Series, no. 4. Canadian Circumpolar Institute, University of Alberta, Edmonton.

Clarke M., Vandenberg N. 2010. Dog attack: the application of canine DNA profiling in forensic casework. *Forensic Sci Med Pathol* 6: 151–157

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).

DeYoung R.W., Honeycutt R.L. 2005. The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *J Wildlife Manage* 69: 1362–1384

Eisen J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. Pp. 34-48. V: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Goldstein D.B., Schlötterer C. (eds.). Oxford University Press, Oxford, UK.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5: 435-445

Epperson B.K. 2005. Mutation at high rates reduces spatial structure within populations. *Mol Ecol* 14: 703–710

Ericsson G., Heberlein T. A. 2003. Attitudes of hunters, locals, and the general public in Sweden now that the wolves are back. *Biol Conserv* 111: 149-159

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, New York, 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. *Mol Ecol* 12: 1649–1661

Frantzen M.A.J., Silk J.B., Ferguson J.W., Wayne R.K., Kohn M.H. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for fecal DNA. *Mol Ecol* 7: 1423–1428

Fritts S.H., Paul W.J., Mech L.D., Scott D.P. 1992. Trends and management of wolf-livestock conflicts in Minnesota. *Resource Publ.* 181. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, D.C. 27 pp.

Ginsberg J.R., Macdonald D.W. 1990. *Foxes, wolves, jackals, and dogs: An action plan for the conservation of canids*. IUCN World Conservation Union, Gland, Switzerland. 117 pp.

Glenn T.C., Schable N.A. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. V: *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B*. Zimmer E.A., Roalson E. (eds.). Academic Press, San Diego, USA, pp. 202–222.

Glen A.S., Berry O., Sutherland D.R., Garretson S., Robinson T.J., de Tores P.J. 2010. Forensic DNA confirms intraguild killing of a chuditch (*Dasyurus geoffroii*) by a feral cat (*Felis catus*). *Conserv Genet* 11 (in press).

Hampton B. 1997. *The great American wolf*. Henry Holt, New York.

Hayes R.D., Harestad A.S. 2000. Demography of a recovering wolf population in the Yukon. *Can J Zool* 78: 36-48

Huber Đ., Adamič M. 2000. Large carnivore corridors between Croatia and Slovenia. Report for EURONATUR (unpubl.), Zagreb, Ljubljana, 11 str.

Jonozovič M. 2003. Strokovno izhodišče za vzpostavljanje omrežja NATURA 2000: VOLK (*Canis lupus* L.). Ljubljana 2003.

Kayser M, de Knijff P. 2011. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 12: 179-192

Lewis M.A., Murray J.D. 1993. Modelling territoriality and wolf-deer interactions. *Nature* 366: 738-740

Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11: 2453-2465

Lorenz K.Z. 1954. *Man meets dog*. London: Methuen.

Macdonald D.W. 1983. The ecology of carnivore social behaviour. *Nature* 301: 379-384

Mech L.D. 1987. Age, season, distance, direction and social aspects of wolf dispersal from a Minnesota pack. Pp. 55-74. V: *Mammalian dispersal patterns*. Chepko-Sade B.D., Tang Halpin Z. (eds.). University of Chicago Press, Chicago.

Mech L.D. 1994. Buffer zones of territories of gray wolves as regions of intraspecific strife. *J Mammal* 75: 199-202

Mech L.D. 1995. What do we know about wolves and what more do we need to learn? Pp. 537-545. V: Ecology and conservation of wolves in changing world. Carbyn L.N., Fritts S.H., Seip D.R. (eds.). Canadian Circumpolar Institute, Edmonton, Alberta.

Mech L.D., Hertel H.H. 1983. An eight year demography of a Minnesota wolf pack. *Acta Zool Fenn* 174: 249-250

Mech L.D., Adams L.G., Meier T.J., Burch J.W., Dale B.W. 1998. The wolves of Denali. University of Minnesota Press, Minneapolis.

Mech L.D., Boitani L. 2003. Wolves: Behavior, Ecology, and Conservation. Chicago University Press.

Meier T.J., Burch J.W., Mech L.D., Adams L.D. 1995. Pack structure and genetic relatedness among wolf packs in a naturally regulated population. V: Ecology and conservation of wolves in a changing world. Carbyn L.N., Fritts S.H., Seip D.R. (eds.). Canadian Circumpolar Institute, University of Alberta, Edmonton, Canada, pp. 293-302.

Murie A. 1944. The wolves of Mount McKinley. U.S. National Park Service Fauna Series, no. 5. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 238 pp.

Nowak R.M. 2003. Wolf Evolution and Taxonomy. V: Wolves: Behavior, Ecology, and Conservation. Mech L.D., Boitani L. (eds.). Chicago University Press.

Okarma H. 1995. The trophic ecology of wolves and their predatory role in ungulate communities of forest ecosystems in Europe. *Acta Theriol* 40: 335-386

Packard J.M., Mech L.D. 1980. Population regulation in wolves. Pp. 135-50. V: Biosocial mechanisms of population regulation. Cohen M.N., Malpass R.S., Klein H.G. (eds.). Yale University Press, New Haven, CT.

Paetkau D., Strobeck C. 1995. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Mol Ecol* 4: 519-520

Peters R.P., Mech L.D. 1975. Scent-marking in wolves: A field study. *Am Sci* 63: 628-637

Piggott M.P. 2004. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildlife Res* 31: 485-493

Piggott M.P., Bellemain E., Taberlet P., Taylor A.C. 2004. A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. *Conserv Genet* 5: 417-420

Pilgrim K.L., Boyd D.K., Forbes S.H. 1998. Testing for wolf-coyote hybridization in the Rocky Mountains using mitochondrial DNA. *J Wildlife Manage* 62: 683-689

Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Reviews* 6: 1-14

Randi E., Lucchini V., Christensen M.F., Mucci N., Funk S.M., Dolf G., Loeschcke V. 2000. Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: Detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conserv Biol* 14: 464-73

Rothman R., Mech L.D. 1979. Scent-marking in lone wolves and newly formed pairs, *Anim Behav* 27: 750-760

Savolainen P., Zhang Y., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* 298: 1610-1613

Schenkel R. 1947. Ausdrucks-studien an wolfen [Expression studies of wolves]. *Behaviour* 1: 81-129 [Translation from German by F. Harrington]

Schlötterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371

Schwartz M. 1997. A history of dogs in the early Americas. Yale University Press, New Haven, CT.

Selkoe K.A., Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9: 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.

Smith D., Meier T., Geffen E., Mech L.D., Burch J.W., Adams L.G., Wayne R.K. 1997. Is incest common in grey wolf packs? *Behav Ecol* 8: 384–391

Sundqvist A.-K., Ellegren H., Vilà C. 2008. Wolf or dog? Genetic identification of predators from saliva collected around bite wounds on prey. *Conserv Genet* 9: 1275-1279

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 Res* 24: 3189–3194

Taberlet P., Waits L.P., Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: Look before you leap. *Trends Ecol Evol* 14: 323–327

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: 1687-1689

Von Schantz T. 1984. Spacing strategies, kin selection, and population regulation in altricial vertebrates. *Oikos* 42: 48-58



Wabakken P., Sand H., Liberg O., Bjarvall A. 2001. The recovery, distribution, and population dynamics of wolves on the Scandinavian peninsula, 1978–1998, *Can J Zool* 79: 710–725

Waits L.P., Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologist: A review of applications and recommendations for accurate data collection. *J Wildlife Manage* 69(4): 1419-1433

Wasser S.K., Houston C.S., Koehler G.M., Cadd G.G., Fain S.R. 1998. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Mol Ecol* 6: 1091–1097

Williams C.L., Blejwas K., Johnston J.J., Jaeger M.M. 2003. A coyote in sheep's clothing: predator identification from saliva. *Wildl Soc Bull* 31(4): 926–932

Wilson P.J., Shaw C.N., White B.N. 2003. A reliable method of gender determination for mammals. *J Mammal* 84: 128–128

Woollard T., Harris S. 1990. A behavioural comparison of dispersing and non-dispersing foxes (*Vulpes vulpes*) and an evaluation of some dispersal hypotheses. *J Anim Ecol* 59: 709-722

Zakon o spremembah in dopolnitvah Zakona o zaščiti živali - ZZZiv-B. Ur.l. RS št. 43-2354/07

## ZAHVALA

Diplomska naloga sodi v sklop projekta »Varstvo in spremljanje varstvenega statusa populacije volka (*Canis lupus*) v Sloveniji (2010-2013)« – LIFE+ SloWolf. Vodja projekta je Skupina za ekologijo živali na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, izvajajo pa ga Univerza v Ljubljani, Zavod za gozdove Slovenije (ZGS) in Društvo za ohranjanje, raziskovanje in trajnostni razvoj Dinaridov – Dinaricum.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Trontlju za usmerjanje in pomoč pri pisanju diplomske naloge ter za čas, ki si ga je bil pripravljen vzeti kljub drugim obveznostim. Nadalje se zahvaljujem delovnim mentorjema dr. vet. med. Tomažu Skrbinšku in Maji Jelenčič, tako za posredovane izkušnje pri terenskem in laboratorijskem delu kot za potrpežljivost in podporo.

Hvala tudi izr. prof. dr. Roku Kostanjšku za recenzijo diplomske naloge, predsedniku komisije izr. prof. dr. Ivanu Kosu ter zaposlenim pri Skupini za ekologijo živali in pooblaščenim cenilcem škod z ZGS-ja za sodelovanje pri zbiranju vzorcev.

Vsekakor ne smem izpustiti svojih prijateljev, ki so mi stali ob strani v dobrih in slabih trenutkih, s katerimi sem tekom študija doživel veliko nepozabnih dogodivščin in kateri so pripomogli k mojemu osebnostnemu razvoju.

Posebna zahvala gre družini, brez katere ne bi bil to, kar sem. Hvala vam za vse vzpodbudne besede in za vso ljubezen, ki sem jo deležen. Rad bi se zahvalil tudi pokojnim nonotu Joškotu in noni Zdravki ter noni Ivanki – večno boste ostali v mojem srcu.

## PRILOGE

### Priloga A: Podatki o posameznih vzorcih DNA

vzorec	datum nastanka škode	datum odvzema	študija	živalska vrsta	povp. uspešnost pomnoževanja	najditelj	padavine	vrsta ubite živali	mesto odvzema	spol plenilca	spol ubite živali	stopnja razpada	trop	regija
AH.00ME	/	/	škoda	/	87,50%	/	ne	/	/	/	/	/	/	/
AH.0382	11-nov-11	12-nov-11	škoda	pes	27,27%	Branko Bobek	ne	ovca	vrat	/	ž	0	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.0383	09-nov-11	10-nov-11	škoda	pes	95,45%	Branko Bobek	ne	ovca	vrat	/	ž	0	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.0384	09-nov-11	10-nov-11	škoda	pes	65,91%	Branko Bobek	ne	ovca	vrat	/	ž	0	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.0385	09-nov-11	10-nov-11	škoda	pes	100,00%	Branko Bobek	ne	ovca	vrat	/	ž	0	/	/
AH.0387	/	10-jul-11	naravni plen	mešan vzorec	81,82%	Miha Krofel	ne	srnjak	ugrizna rana na vratu	/	m	2	rog	JV SLOVENIJA
AH.038H	13-mar-11	14-mar-11	škoda	lisica	18,18%	Vladimir Dekleva	da	govedo	rebra	/	m	0	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.038J	13-mar-11	14-mar-11	škoda	lisica	9,09%	Vladimir Dekleva	da	govedo	vrat	m	m	0	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.038M	18-maj-11	19-maj-11	škoda	volk	90,91%	Vladimir Dekleva	ne	ovca	vrat	ž	ž	3	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03A0	29-maj-11	29-maj-11	škoda	volk	86,36%	Vladimir Dekleva	ne	ovca	vrat	m	ž	3	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03A4	12-maj-11	13-maj-11	škoda	volk	86,21%	Vladimir Dekleva	ne	ovca	vrat	m	m	1	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03A5	07-maj-11	08-maj-11	škoda	volk	90,91%	Vladimir Dekleva	ne	ovca	rebra, glava	/	/	0	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA

(se nadaljuje)

AH.03A6	07-maj-11	08-maj-11	škoda	volk	100,00%	Vladimir Dekleva	ne	ovca	rebra, glava	/	/	0	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03A8	12-maj-11	13-maj-11	škoda	volk	100,00%	Vladimir Dekleva	ne	ovca	vrat	/	/	0	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03AE	/	09-jun-11	škoda	lisica	72,73%	Iztok Mlekuž	da	ovca	vrat	m	ž	0	/	GORIŠKA
AH.03AF	/	09-jun-11	škoda	/	15,91%	Iztok Mlekuž	da	ovca	kolk-stegno	/	ž	0	/	GORIŠKA
AH.03AL	13-jun-11	14-jun-11	škoda	lisica	54,55%	Vladimir Dekleva	da	koza	vrat	/	ž	2	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03C0	04-jun-11	05-jun-11	škoda	/	0,00%	Vladimir Dekleva	ne	ovca	vrat	/	ž	3	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03C1	04-jun-11	05-jun-11	škoda	/	0,00%	Vladimir Dekleva	ne	ovca	vrat	/	ž	3	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03C4	23-maj-11	24-maj-11	škoda	/	0,00%	Vladimir Dekleva	ne	koza	vrat	/	ž	3	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03C5	23-maj-11	24-maj-11	škoda	/	0,00%	Vladimir Dekleva	ne	koza	rebra	/	ž	3	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03CA	04-jun-11	07-jun-11	škoda	/	0,00%	Vladimir Dekleva	da	koza	vrat, rebra	/	ž	4	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03CC	04-jun-11	07-jun-11	škoda	/	0,00%	Vladimir Dekleva	da	koza	vrat	/	ž	4	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03CK	21-jun-11	22-jun-11	naravni plen	/	25,00%	Andrej Logar	ne	srnjak	vrat	/	m	1	/	/
AH.03CL	21-jun-11	22-jun-11	naravni plen	/	0,00%	Andrej Logar	ne	srnjak	vrat	/	m	1	/	/
AH.03CM	/	22-jun-11	naravni plen	/	0,00%	Miha Krofel	ne	/	/	/	/	/	rog	JV SLOVENIJA
AH.03EX	13-apr-11	13-apr-11	škoda	volk	90,91%	Darjo Pipan	ne	ovca	vrat	/	/	0	vremščica	OBALNO-KRAŠKA

(se nadaljuje)

AH.03EY	13-apr-11	13-apr-11	škoda	volk	72,73%	Darjo Pipan	ne	ovca	vrat	/	/	0	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03F5	02-apr-11	06-apr-11	škoda	/	0,00%	Darjo Pipan	da	ovca	vrat	/	m	3	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03F7	08-apr-11	08-apr-11	škoda	/	32,95%	Darjo Pipan	ne	ovca	vrat	m	ž	0	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03F8	08-apr-11	08-apr-11	škoda	volk	100,00%	Darjo Pipan	ne	ovca	vrat	ž	ž	0	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03FT	22-maj-11	23-maj-11	škoda	/	25,00%	Marjan Kumelj	ne	ovca	vrat	ž	ž	0	suha krajina	JV SLOVENIJA
AH.03FU	22-maj-11	23-maj-11	škoda	/	0,00%	Marjan Kumelj	ne	ovca	rebra	/	m	0	suha krajina	JV SLOVENIJA
AH.03FX	20-maj-11	21-maj-11	škoda	volk	98,44%	Marjan Kumelj	ne	ovca	vrat	ž	ž	0	suha krajina	JV SLOVENIJA
AH.03H2	/	14-maj-11	škoda	/	0,00%	Dragan Markovič ZGS	ne	ovca	stegno	/	ž	0	/	GORIŠKA
AH.03H3	/	14-maj-11	škoda	lisica	50,00%	Dragan Markovič ZGS	ne	ovca	vrat	ž	ž	0	/	GORIŠKA
AH.03H4	/	23-nov-10	škoda	volk	100,00%	Miha Krofel in Rok Černe	ne	ovca	/	m	ž	/	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03H5	12-nov-10	18-nov-10	naravni plen	/	0,00%	Peter Benedik	ne	košuta	/	/	ž	/	/	/
AH.03H6	/	19-nov-10	škoda	/	0,00%	/	ne	koza	/	/	/	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03H7	/	19-nov-10	škoda	lisica	18,18%	/	ne	koza	/	/	/	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03HC	06-apr-11	06-apr-11	škoda	pes	80,00%	Marjan Kumelj	ne	ovca	vrat	m	ž	0	/	JV SLOVENIJA
AH.03HE	06-apr-11	06-apr-11	škoda	pes	90,91%	Marjan Kumelj	ne	ovca	vrat	/	/	0	/	JV SLOVENIJA

(se nadaljuje)

AH.03HF	05-mar-11	07-mar-11	škoda	volk	83,64%	David Grlj	ne	oslica	medenica	m	ž	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03HH	28-mar-11	29-mar-11	škoda	volk	97,73%	David Grlj	ne	ovca	vrat	ž	ž	0	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03HJ	25-mar-11	27-mar-11	škoda	/	12,50%	Andrej Sila	da	ovca	medenica-kost	m	ž	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03HK	25-mar-11	27-mar-11	škoda	mešan vzorec	62,73%	Andrej Sila	da	ovca	vrat	m	ž	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03HM	28-mar-11	29-mar-11	škoda	volk	98,59%	David Grlj	ne	ovca	vrat	ž	ž	0	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03HT	08-mar-11	11-mar-11	škoda	volk	94,87%	David Grlj	ne	ovca	vrat	ž	ž	0	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03HU	08-mar-11	11-mar-11	škoda	volk	90,91%	David Grlj	ne	koza	vrat	ž	ž	0	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03HX	/	29-mar-11	naravni plen	volk	98,59%	Miha Krofel	ne	jelenjad	vrat	/	ž	0	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03HY	/	17-mar-11	naravni plen	/	9,09%	Miha Krofel	ne	/	odtrgana koža	/	/	/	menišija	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03J0	/	12-mar-11	naravni plen	lisica	51,52%	Nina Ražen	ne	jelenjad	stegno	/	/	/	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03J1	24-feb-11	24-feb-11	škoda	volk	20,45%	Aleđ Kresevič	ne	koza	stegno	m	ž	0	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03J2	/	/	škoda	/	0,00%	Aleš Kresevič	ne	ovca	vrat	/	ž	5	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03J3	08-mar-11	09-mar-11	škoda	/	4,55%	Vladimir Janežič	ne	koza	vrat	/	ž	0	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03J4	07-mar-11	09-mar-11	škoda	/	0,00%	Vladimir Janežič	ne	osel	vrat	m	m	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03J5	08-mar-11	09-mar-11	škoda	/	4,55%	Vladimir Janežič	ne	ovca	vrat	/	ž	0	slavnik	OBALNO-KRAŠKA

(se nadaljuje)

AH.03J6	08-mar-11	09-mar-11	škoda	/	11,36%	Vladimir Janežič	ne	ovca	vrat	/	ž	0	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03J7	24-feb-11	24-feb-11	škoda	volk	100,00%	Aleš Kresevič	ne	ovca	vrat	m	ž	0	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03J8	05-mar-11	07-mar-11	škoda	pes	69,70%	Aleš Kresevič	ne	ovca	vrat	m	ž	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03JA	05-mar-11	07-mar-11	škoda	/	0,00%	Aleš Kresevič	ne	ovca	rebra	/	ž	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03JC	10-jan-11	11-jan-11	škoda	/	0,00%	Urbiha Jože	da	ovca	vrat	/	ž	0	snježnik	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03JE	10-jan-11	11-jan-11	škoda	/	0,00%	Urbiha Jože	da	ovca	zadnji del	/	ž	0	snježnik	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03JH	/	04-mar-11	naravni plen	volk	89,39%	Nina Ražen	ne	srna	vrat	/	m	0	rog	JV SLOVENIJA
AH.03JJ	04-mar-11	04-mar-11	naravni plen	volk	97,73%	Miha Krofel	ne	srnjak	vrat	/	m	0	menišija	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03JK	/	05-mar-11	naravni plen	mešan vzorec	72,73%	Miha Krofel	ne	srnjad	odtrgan kos kože	/	/	/	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03JL	/	06-jan-11	škoda	pes	90,91%	Hubert Potočnik	ne	ovca	/	m	ž	0	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03JM	/	06-jan-11	škoda	pes	100,00%	Hubert Potočnik	ne	ovca	/	m	ž	0	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03JP	21-dec-10	23-dec-10	naravni plen	/	62,63%	Miha Krofel	ne	srna	koža	/	/	/	menišija	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03JT	/	20-dec-10	naravni plen	volk	100,00%	Miha Krofel	ne	jelenjad -tele	/	/	/	/	menišija	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03JU	25-dec-10	28-dec-10	naravni plen	mešan vzorec	95,45%	Miha Krofel	ne	jelenjad	vrat	/	ž	/	gotenica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03JX	04-nov-10	04-nov-10	naravni plen	lisica	61,82%	Miha Krofel	ne	srna	gobec	/	ž	0	/	GORENJSKA

(se nadaljuje)

AH.03JY	/	21-okt-10	škoda	volk	90,91%	/	ne	koza	/	m	ž	/	/	/
AH.03K0	04-nov-10	04-nov-10	naravni plen	lisica	42,42%	Miha Krofel	ne	srna	vrat	/	ž	0	/	GORENJSKA
AH.03K1	16-okt-10	22-okt-10	škoda	volk	40,91%	/	ne	ovca	/	ž	ž	/	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03K2	/	21-okt-10	škoda	volk	100,00%	/	ne	koza	/	m	ž	0	/	/
AH.03K3	/	21-okt-10	škoda	volk	100,00%	/	ne	koza	/	m	ž	/	/	/
AH.03K4	16-okt-10	22-okt-10	škoda	/	0,00%	/	ne	ovca	/	/	ž	/	/	/
AH.03K5	25-jan-11	25-jan-11	naravni plen	volk	89,39%	Nina Ražen	ne	srna	noga	/	/	0	suha krajina	OSREDNJE-SLOVENSKA
AH.03K6	25-jan-11	25-jan-11	naravni plen	mešan vzorec	33,64%	Nina Ražen	ne	srna	rebra	/	/	0	suha krajina	OSREDNJE-SLOVENSKA
AH.03K7	24-jan-11	24-jan-11	škoda	volk	97,18%	Tomažič Marjan	ne	ovca	vrat	m	ž	0	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03K8	/	27-nov-10	škoda	lisica	46,97%	Andrej Sila	ne	koza	/	ž	ž	/	/	/
AH.03KA	/	14-feb-11	škoda	/	0,00%	Aleš Kreševič	ne	tele	rebra	/	m	/	/	/
AH.03KC	12-feb-11	12-feb-11	škoda	/	0,00%	Andrej Sila	ne	koza	rebra	/	ž	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03KE	/	03-dec-10	škoda	volk	87,27%	E. Grželj	ne	govedo	rebra	ž	m	/	/	/
AH.03KF	10-jan-11	11-jan-11	škoda	pes	63,64%	David Grlj	da	koza	vrat	ž	ž	1	/	GORIŠKA
AH.03KH	01-feb-11	02-feb-11	škoda	lisica	50,00%	Aleš kreševič	ne	koza	rebra in medenica	m	ž	2	slavnik	OBALNO-KRAŠKA

(se nadaljuje)



AH.03KJ	/	03-dec-10	škoda	/	0,00%	E. Grželj	ne	ovca	vrat	/	ž	/	/	/
AH.03KK	07-feb-11	07-feb-11	škoda	lisica	66,67%	Andrej Sila	ne	ovca	vrat	ž	ž	0	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03KL	07-feb-11	10-feb-11	škoda	/	0,00%	Aleš Kreševič	ne	koza	rebra	/	ž	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03KM	07-feb-11	07-feb-11	škoda	lisica	54,55%	Andrej Sila	ne	ovca	rebra	m	ž	0	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03KP	15-feb-11	15-feb-11	naravni plen	mešan vzorec	65,15%	Andrej Sila	ne	Srna	vrat	/	ž	1	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03KT	12-feb-11	12-feb-11	škoda	pes	77,27%	Andrej Sila	ne	koza	vrat	m	ž	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03KU	07-feb-11	10-feb-11	škoda	/	0,00%	Aleš Kreševič	ne	ovca	rebra	/	ž	1	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03KX	07-feb-11	09-feb-11	škoda	/	18,18%	Miran Bartol	ne	ovca	rebra	/	/	1	/	/
AH.03KY	15-feb-11	15-feb-11	naravni plen	/	4,55%	Andrej Sila	ne	Srna	stegno	/	ž	1	vremščica	OBALNO-KRAŠKA
AH.03L0	04-avg-10	06-avg-10	škoda	lisica	74,24%	Maja Jelenčič	da	ovca	vrat	ž	ž	/	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03L1	04-avg-10	06-avg-10	škoda	pes	100,00%	Maja Jelenčič	da	ovca	rebra	m	ž	/	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03L2	04-avg-10	06-avg-10	škoda	lisica	75,76%	Maja Jelenčič	da	ovca	stegno	m	ž	/	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03L3	04-avg-10	06-avg-10	škoda	volk	97,73%	Maja Jelenčič	da	ovca	vrat	m	ž	/	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03L4	04-avg-10	06-avg-10	škoda	lisica	54,55%	Maja Jelenčič	da	ovca	rebra	m	ž	/	vremščica	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03L5	19-jul-10	20-jul-10	škoda	/	0,00%	Rok Černe	ne	ovca	/	/	/	/	poljanska	JV SLOVENIJA

(se nadaljuje)

AH.03L6	19-jul-10	20-jul-10	škoda	/	0,00%	Rok Černe	ne	ovca	/	/	ž	/	poljanska	JV SLOVENIJA
AH.03LC	06-sep-10	06-sep-10	škoda	lisica	25,00%	Tomi Leon	da	ovca	vrat	m	ž	/	poljanska	JV SLOVENIJA
AH.03LE	04-sep-10	06-sep-10	škoda	/	0,00%	Tomi Leon	ne	ovca	rebra	/	ž	/	poljanska	JV SLOVENIJA
AH.03LF	04-sep-10	06-sep-10	škoda	mešan vzorec	56,36%	Tomi Leon	ne	ovca	rebra	m	ž	/	poljanska	JV SLOVENIJA
AH.03LH	04-sep-10	06-sep-10	škoda	/	4,55%	Tomi Leon	ne	ovca	noga	/	ž	/	poljanska	JV SLOVENIJA
AH.03LK	24-jun-10	26-jun-10	škoda	/	0,00%	Rok Černe	ne	ovca	vrat	/	ž	/	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03LL	24-jun-10	26-jun-10	škoda	/	0,00%	Rok Černe	ne	ovca	/	/	ž	/	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03LM	24-jun-10	26-jun-10	škoda	/	0,00%	Rok Černe	ne	ovca	/	/	ž	/	javorniki	NOTRANJSKO-KRAŠKA
AH.03LP	21-jun-10	22-jun-10	škoda	volk	96,67%	Tomi Leon	da	ovca	/	m	ž	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03LT	21-jun-10	22-jun-10	škoda	volk	56,52%	Tomi Leon	da	ovca	/	ž	ž	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03LU	21-jun-10	22-jun-10	škoda	volk	100,00%	Tomi Leon	da	ovca	/	m	ž	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03LX	21-jun-10	22-jun-10	škoda	volk	44,44%	Tomi Leon	da	ovca	/	ž	ž	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03LY	21-jun-10	22-jun-10	škoda	volk	90,00%	Tomi Leon	da	ovca	/	m	ž	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03M0	21-jun-10	22-jun-10	škoda	volk	88,33%	Tomi Leon	da	ovca	rebra	m	ž	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03M1	21-jun-10	22-jun-10	škoda	volk	93,10%	Tomi Leon	da	ovca	vrat	m	ž	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA

(se nadaljuje)

AH.03M2	21-jun-10	22-jun-10	škoda	volk	96,67%	Tom Leon	da	ovca	vrat	m	ž	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03M4	22-apr-10	23-apr-10	škoda	/	24,39%	Maja Jelenčič	ne	ovca	rebra	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03M5	22-apr-10	23-apr-10	škoda	volk	88,16%	Maja Jelenčič	ne	/	vrat	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03M6	22-apr-10	23-apr-10	škoda	mešan vzorec	100,00%	Maja Jelenčič	ne	ovca	vrat	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03M7	22-apr-10	23-apr-10	škoda	volk	98,68%	Maja Jelenčič	ne	ovca	vrat	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03M8	22-apr-10	23-apr-10	škoda	mešan vzorec	89,47%	Maja Jelenčič	ne	ovca	vime	m	ž	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03MC	22-apr-10	23-apr-10	škoda	/	33,10%	Maja Jelenčič	ne	/	vrat	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03ME	22-apr-10	23-apr-10	škoda	volk	94,16%	Maja Jelenčič	ne	/	vrat	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03MF	22-apr-10	23-apr-10	škoda	volk	100,00%	Maja Jelenčič	ne	/	vrat	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03MH	22-apr-10	23-apr-10	škoda	mešan vzorec	69,39%	Maja Jelenčič	ne	koza	vrat	m	ž	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03MJ	22-apr-10	23-apr-10	škoda	mešan vzorec	91,95%	Maja Jelenčič	ne	/	dimlje	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03MK	22-apr-10	23-apr-10	škoda	volk	98,68%	Maja Jelenčič	ne	/	lopatica	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03ML	22-apr-10	23-apr-10	škoda	volk	98,68%	Maja Jelenčič	ne	/	/	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03MM	22-apr-10	23-apr-10	škoda	volk	76,32%	Maja Jelenčič	ne	ovca	vrat	m	ž	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA
AH.03MP	22-apr-10	23-apr-10	škoda	mešan vzorec	68,97%	Maja Jelenčič	ne	ovca	rebra	/	/	/	slavnik	OBALNO- KRAŠKA

(se nadaljuje)

AH.03MT	22-apr-10	23-apr-10	škoda	volk	100,00%	Maja Jelenčič	ne	ovca	vrat	m	ž	/	slavnik	OBALNO-KRAŠKA
AH.03MU	/	07-mar-10	naravni plen	volk	96,55%	Miha Krofel	ne	košuta	/	/	ž	/	menišija	NOTRANJSKO-KRAŠKA