

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Meta MAVEC

**RAZVOJ METODE ZA UGOTAVLJANJE
KRIŽANCEV MED VOLKOM IN PSOM V DINARSKI
POPULACIJI VOLKA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI

BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Meta MAVEC

**RAZVOJ METODE ZA UGOTAVLJANJE KRIŽANCEV MED
VOLKOM IN PSOM V DINARSKI POPULACIJI VOLKA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**OPTIMIZATION OF METHOD FOR DETECTING WOLF-DOG
HYBRIDS IN DINARIC POPULATION OF WOLF**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija programa druge stopnje Ekologija in biodiverziteta na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za ekologijo živali Oddelka za biologijo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 21. 2. 2014 odobrila temo magistrskega dela. Za mentorja je imenovala doc. dr. Tomaža Skrbinšek, za recenzenta prof. dr. Ivana Kosa.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter TRONTELJ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Tomaž SKRBINŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Ivan KOS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 15. 11. 2016

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

Meta Mavec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Du2
- DK UDK 591.158(043.2)=163.6
- KG križanje/volk/*Canis lupus*/pes/*Canis lupus familiaris*/genetika/mikrosateliti/Slovenija/Hrvaška
- AV MAVEC, Meta, diplomirana biologinja (UN)
- SA SKRBINŠEK, Tomaž (mentor)/KOS, Ivan (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij ekologije in biodiverzitete
- LI 2016
- IN RAZVOJ METODE ZA UGOTAVLJANJE KRIŽANCEV MED VOLKOM IN PSOM V DINARSKI POPULACIJI VOLKA
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2.stopnja)
- OP IX, 54 str., 15 pregl., 9 sl., 77 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Med volkom (*Canis lupus*) in psom (*Canis lupus familiaris*) občasno prihaja do križanja in tako do vključevanja pasjih genov v volčjo populacijo. V preteklosti so križanje poskušali potrditi na podlagi morfoloških znakov, vendar je to velikokrat, sploh v primeru povratnih križancev, nemogoče. Z nalogo smo želeli izbrati set 10-12 mikrosatelitskih markerjev, s pomočjo katerega bi lahko razlikovali križance od čistih volkov. Za izbiro najbolj primerne seta smo med seboj primerjali 35 različnih mikrosatelitskih markerjev. V vzorcu smo imeli 411 osebkov, od tega 358 volkov, ki so bili povzorčeni na območju Slovenije, Gorskega Kotarja, Like in Dalmacije, ter 53 psov. V vzorcu volkov smo prepoznali veliko križancev z območja Dalmacije, od koder je tudi največ škod po volku. V Liki je bilo le nekaj križancev, medtem ko jih v vzorcih iz Gorskega Kotarja nismo odkrili. V vzorcih, zbranih na območju Slovenije, smo potrdili enega oziroma tri križance, ki pa so vsi povratni križanci, zaradi česar sklepamo, da bi lahko šlo za migrante s Hrvaške. Za ločevanje med križanci in čistimi volkovi predlagamo set 14 markerjev, ki se je med analizo izkazal za najbolj učinkovitega, in priporočamo, da se analiza čez nekaj časa ponovi in tako preveri ali so izbrani mikrosatelitski markerji še vedno najprimernejši.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDC 591.158(043.2)=163.6
- CX hybridization/grey wolf/*Canis lupus*/dog/*Canis lupus familiaris*/genetics/microsatellites/Slovenia/Croatia
- AU MAVEC, Meta
- AA SKRBINŠEK, Tomaž (supervisor)/KOS, Ivan (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Ecology and Biodiversity
- PY 2016
- TI OPTIMIZATION OF METHOD FOR DETECTING WOLF-DOG HYBRIDS IN DINARIC POPULATION OF WOLF
- DT M. SC. THESIS (Master Study Programmes)
- NO IX, 54 p., 15 tab., 9 fig., 77 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Wolf (*Canis lupus*) and dog (*Canis lupus familiaris*) occasionally hybridize in nature which causes introgression of dog genes into wolf gene pool. In the past, researchers tried to detect hybrids on the basis of atypical or anomalous morphological characters, which often proved unsuccessful. Especially in case of wolf backcrosses who are often indistinguishable from pure wolves. Our goal was to develop a panel of 10–12 most efficient microsatellite markers from set of 35, to differentiate between hybrids and pure individuals. Our sample included 358 samples of wolves that were collected in Slovenia, Gorski Kotar, Lika and Dalmatia as well as 53 samples of dogs. Our results show quite a few hybrids from Dalmatia region, where most of the wolf damages are reported, and a few from Lika region. We didn't find any hybrids in Gorski Kotar. From samples collected in Slovenia we confirmed 1 to 3 hybrids, who were all wolf backcrosses and not first generation hybrids. Due to extensive sampling effort during the past years we suspect these hybrids could be immigrants from Croatia as no first generation hybrids were found yet. We suggest a panel of 14 microsatellite markers to be used for quick testing and advise that selection of molecular markers be revised over time. Allele frequency change over time, especially in small populations, which would affect the accuracy of the panel.

OKRAJŠAVE

W	volk
D	pes
WDH/F1	križanec prve generacije (rezultat parjenja med volkom in psom)
HC/F2	križanec druge generacije (rezultat parjenja dveh križancev prve generacije)
BW1	povratni križanec z volkom prve generacije (rezultat parjenja križanca prve generacije in volka)
BW2	povratni križanec z volkom druge generacije (rezultat parjenja povratnega križanca z volkom prve generacije in volka)
BD1	povratni križanec s psom prve generacije (rezultat parjenja križanca prve generacije in psa)
BD2	povratni križanec s psom druge generacije (rezultat parjenja povratnega križanca s psom prve generacije in psa)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (" <i>polymerase chain reaction</i> ")
DNK	deoksiribonukleinska kislina ("DNA")
mtDNK	mitohondrijska DNK

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
OKRAJŠAVE	V
KAZALO SLIK	IX
1 UVOD	1
1.1 SPLOŠNO O KRIŽANJU	1
1.2 KRIŽANJE MED VOLKOVI IN PSI	2
1.3 UPORABA GENETSKIH MARKERJEV	6
1.3.1 Mikrosateliti	8
1.4 NEINVAZIVNO VZORČENJE	9
1.5 UPRAVLJANJE S KRIŽANCI	10
1.6 CILJ NALOGE	10
1.7 HIPOTEZE	11
2 PREGLED OBJAV	12
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 VZORCI	16
3.2 DELO V LABORATORIJU	16
3.2.1 Ekstrakcija DNK	17
3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	17
3.3 IZBIRA MARKERJEV	18
3.4 ANALIZA PODATKOV	19
3.4.1 Uporaba programa Structure 2.3.4.	20
3.4.2 Admixture model	21
3.4.3 Prior population information – USEPOPINFO model.....	21
3.5 OBLIKOVANJE MULTIPLEKSA	21
4 REZULTATI.....	22
4.1 IZBIRA MIKROSATELITSKIH MARKERJEV	22
4.2 PRIMERJAVA SIMULIRANIH SETOV MIKROSATELITSKIH MARKERJEV	23
4.3 DETEKCIJA KRIŽANCEV S POMOČJO PROGRAMA STRUCTURE	27
4.4 PREDLAGANI MULTIPLEKS	39
5 RAZPRAVA.....	40

6	SKLEPI	47
7	POVZETEK	48
8	VIRI	49
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Točni volumen mešanic za PCR multipleks.....	18
Preglednica 2: Seznam uporabljenih lokusov glede na Fst vrednost (od večjih do manjših vrednosti) ter PI vrednost (od najmanjših do največjih vrednosti).....	22
Preglednica 3: Primerjava učinkovitosti 3 setov markerjev (12, 14, 16) proti setu z vsemi (35) markerji.	23
Preglednica 4: Izračuni povprečne Qi vrednosti in intervalov zaupanja za simulirane osebe pri vseh setih analiziranih markerjev.....	26
Preglednica 5: Primerjava vseh zaznanih križancev med vsemi seti.....	28
Preglednica 6: Population information model vrednosti za zaznane križance pri setu 35 markerjev.....	30
Preglednica 7: Population information model vrednosti za zaznane križance pri setu 16 markerjev.....	31
Preglednica 8.: Population information model vrednosti za zaznane križance pri setu 14 markerjev.....	33
Preglednica 9: Information model vrednosti za zaznane križance pri setu 12 markerjev. ...	34
Preglednica 10: Primerjava uspešnosti izbranih setov markerjev glede na celoten set.	35
Preglednica 11: Seznam vseh zaznanih križancev (s setom 35 markerjev) z njihovim izvorom in datumom pridobitve vzorca ter razredom križanja določenim s pomočjo prior population analize.....	36
Preglednica 12: Primerjava vrednosti obeh setov markerjev.	39
Preglednica 13: Predlagan multipleks glede na rezultate programa Multiplex Manger.....	39
Preglednica 14: Štirje psi, ki po q vrednostih izstopajo iz skupine.	41
Preglednica 15: Prikaz rezultatov in deleža križanja.....	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz križanja (povzeto po Allendorf in sod., 2001).....	2
Slika 2: Slikovni prikaz po združitvi vseh desetih ponovitev za posamezne sete s programom CLUMPAK.....	25
Slika 3: Pregled vseh križancev, ki so jih zaznali posamezni seti markerjev.....	27
Slika 4: PCoA za set 35 markerjev.....	37
Slika 5: PCoA analiza za 14 markerjev.....	37
Slika 6: Prikaz grupiranja volka in psa (brez križancev) za 35 markerjev s pomočjo PCoA analize.....	38
Slika 7: Prikaz grupiranja volka in psa (brez križancev) za 14 markerjev s pomočjo PCoA analize.....	38
Slika 8: Prikaz zaznanih križancev po letih vzorčenja.....	43
Slika 9: Prikaz vseh zaznanih križancev na območju Slovenije in Hrvaške.....	44

1 UVOD

1.1 SPLOŠNO O KRIŽANJU

Pri spolnem razmnoževanju pride do izmenjave genov med dvema osebkoma. Večinoma do parjenja prihaja le med pripadniki iste vrste, občasno pa se lahko zgodi, da pride do parjenja med osebkoma različnih bioloških vrst (ali populacij). Takemu parjenju pravimo križanje (hibridizacija), potomce pa imenujemo križanci (hibridi). Odvisno od skladnosti kromosomov, so ti osebki lahko plodni in se lahko razmnožujejo ali pa ne.

Mnenja o pomenu in škodljivosti križanju so zelo različna (Ellington in Murray, 2015; Hindrikson in sod., 2012; Mallet, 2005; Vilà in Wayne, 1999), sploh med botaniki in zoologi. Prvi zagovarjajo križanje kot pomembno evlucijsko orodje, saj izmenjava genov med vrstami pogosto ustvari potomce, ki so bolj odporni kot katera od starševskih variacij ter povečuje genetsko pestrost v populaciji. Za razliko od botanikov pa je za večino zoologov medvrstno križanje negativen dogodek, saj lahko vodi v introgresijo oziroma vnos "tujih" genov v populacijo, v kolikor so križanci fertilni in se razmnožujejo.

Genski sklad posamezne populacije/vrste je rezultat naravne selekcije in adaptacije na okolje, v katerem populacija živi, zaradi česar lahko mešanje dveh genskih skladov povzroči, da imajo potomci manjše preživetje in/ali reprodukcijski uspeh oziroma manjši fitnes. Seveda pa lahko ustvari tudi potomce, ki so bolj uspešni od starševskih populacij in eno ali obe populaciji/vrsti izrinejo iz njenega okolja ter tako povzročijo njeno izumrtje.

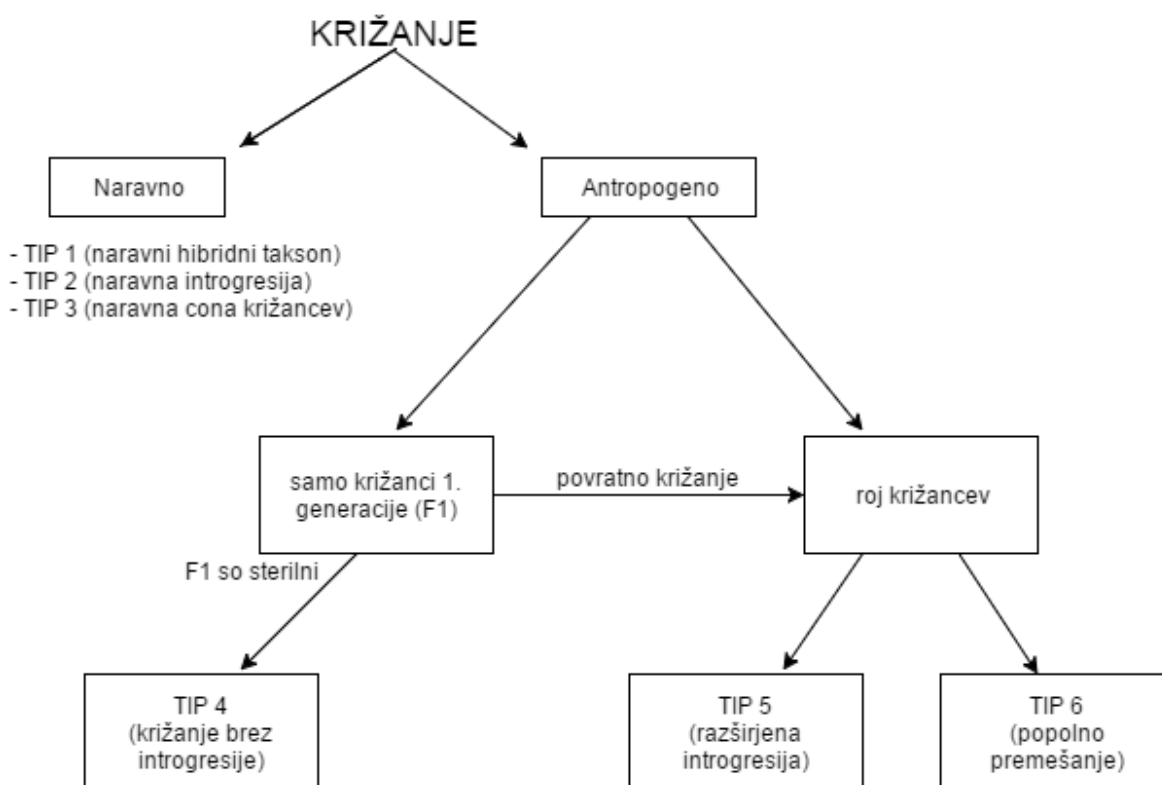
Križanje delimo na naravno in antropogeno. Naravno križanje igra pomembno vlogo v evoluciji vrst in je definirano kot sekundaren stik med dvema populacijama/vrstama, ki sta dalj časa imeli ločeni evlucijski poti (Genovart, 2009).

Antropogeno križanje je posledica človekovega "vmešavanja", pri katerem pride do križanja taksonov, ki so bili v preteklosti izolirani. Do stika lahko pride zaradi vnosa tujerodnih vrst ali posega v okolje, ki je odstranil geografsko oviro, ki je oba taksona ločevala.

Allendorf in sod. (2001) križanje razdelijo na 6 tipov. Tipi 1-3 predstavljajo naravno križanje, medtem ko so tipi 4-6 posledica antropogenega križanja (slika 1). V primerih, ko se križanci (hibridi) ne pariyo s starševsko vrsto (zaradi nezmožnosti vključitve v socialno strukturo ali zaradi sterilnosti), gre za križanje tipa 4 (križanje brez introgresije). V tem primeru se med obema vrstama vzpostavi cona križancev ("*hybrid zone*"), kjer se pojavljajo le križanci prve generacije.

Kadar prihaja do vključevanja hibridnih potomcev v eno ali drugo starševsko populacijo, govorimo o roju križancev ("*hybrid swarm*"). Tu imajo križanci večino genetskega

materiala od ene starševske populacije in so pogosto morfološko neločljivi od staršev. Posredovanje, ko je hibridni roj že oblikovan, je precej težje. V primerih, ko se je križanje pričelo šele nedavno oziroma je geografsko omejeno, tako da je starševska populacija še prisotna, govorimo o križanju tipa 5 (razširjena introgresija oziroma "*widespread introgression*"). Po nekaj generacijah bo večina osebkov hibridnega izvora in nastopi hibridizacija tipa 6 oziroma "popolno premešanje" ("*complete admixture*").



Slika 1: Shematski prikaz križanja (povzeto po Allendorf in sod., 2001)

1.2 KRIŽANJE MED VOLKOVI IN PSI

Volk (*Canis lupus*) je predstavnik družine Canidae in ga skupaj z njegovo podvrsto psom (*Canis lupus familiaris*) uvrščamo v rod psov (*Canis*). Pripadniki rodu psov so si genetsko zelo podobni, imajo enako število kromosomov ($n = 78$), zaradi česar imajo lahko, kadar pride do križanja, plodne potomce.

Pes je bil udomačen iz volka v poznem pleistocenu (Vilà in sod., 2009; Wayne in sod., 2006). Najdemo jih lahko na celotnem območju razširjenosti divjih kanidov, pogosto pa njihova številčnost večkrat presega številčnost njihovih divjih sorodnikov. V Evropi, Aziji in Severni Ameriki naj bi bilo okrog 115.000 do 139.000 volkov (Mech in Botani, 2003), medtem ko naj bi bilo po celem svetu 0,7-1 milijarda psov (Hughes in Macdonald, 2013 cit.

po Gompper, 2013), od katerih velik del predstavljajo prostoživeči psi¹. Po podatkih *World Society for Protection of Animals*, 2010 (Massei in sod., 2010, cit. po Gompper, 2013) naj bi bil njihov delež okrog 75%.

Po podatkih iz Italije naj bi tam na 100 km² našli 2-4 volkove ter kar 100-300 prostoživečih ("*free-ranging*") psov, od tega 24-82 "podivjanih/divjih" ("*feral*") psov (Ciucci in sod., 2001, cit. po Boitani, 2014, Genovesi in Dupré 2000, Boitani 1984).

Prva opažanja o nenavadnih volkovih prihajajo iz Italije, in sicer datirajo v leto 1975 (Boitani, 1986, 1982, cit. po Boitani, 2014). Ta so sprva temeljila na morfoloških opažanjih, z razvojem genetskih metod pa tudi na genetskih študijah.

Določevanje križancev s pomočjo morfoloških znakov je razmeroma nezanesljiva metoda, saj temelji na subjektivni interpretaciji posameznih znakov, ki niso vedno prisotni. Za sumljive osebkke oziroma križance so šteli vse živali z zakrnelimi prvimi prsti na zadnjih nogah ("*de claws*"), belimi nohti, atipičnimi barvnimi vzorci ter telesnimi proporci in zobnimi anomalijami. Zakrneli prvi prsti, oziroma sledniki (pogosto imenovani tudi »volčji kremplji«) so pogosti pri večjih pasmah psov, medtem ko jih biologi v Severni Ameriki in Evraziji pri volkovih niso opazili, prav tako pa ti niso bili opaženi v zbirki volčjih krzen v Španiji, Italiji in na Portugalskem (Ciucci in sod., 2003). Križanci so pogosto nenavadnih barvnih vzorcev, pogosto temnejši ali z neznačilnimi belimi lisami (Andersone in sod., 2002).

Do danes o križancih med volkom in psom poročajo iz naslednjih držav: Rusija (Bibikov 1988; Ryabov 1985, cit. po Boitani, 2014), Norveška (Vilà in sod., 2003), Latvija (Hindrikson in sod., 2012; Verlag in sod., 2002), Estonija (Hindrikson in sod., 2012), Italija (Verardi in sod., 2006; Randi in Lucchini, 2002; Boitani, 1984), Španija (Blanco in sod., 1992), Portugalska (Godinho in sod., 2011), Bulgarija (Randi in sod., 2000), Iran (Asadi Aghbolaghi in sod., 2014) ter Severna Amerika (Muñoz-Fuentes in sod., 2010).

Križanje poteka v več stopnjah:

Ob parjenju psa in volka so potomci križanci prve generacije (F1 križanci oziroma WDH). Ti se lahko razmnožujejo med seboj in tako ustvarijo križance druge generacije (F2 križanci oziroma HC). Skupaj oblikujejo hibridne roje. Parjenje med križancem (F1) in volkom ustvari povratne križance z volkom prve generacije (BW1 - "*backcross to wolf*"), parjenje BW1 z volkom pa ustvari povratne križance z volkom druge generacije (BW2). Pri povratnem križanju pride do integracije pasjih genov v volčjo populacijo (Randi, 2011).

Vnos pasjih genov v volčjo populacijo je lahko problematičen zaradi razlik v vedenju in socialni strukturi med obema populacijama. Psi se namreč niso razvijali pod vplivom

¹ Z izrazom prostoživeči psi zavzemamo vse pse, ki niso pod nadzorom lastnika.

naravne selekcije, ampak je bil na njih vršen pritisk umetne selekcije za lastnosti, ki so bile zanimive ljudem.

Posledica domestifikacije je tudi večja krotkost oziroma izguba strahu pred človekom, sprememba barve dlake oziroma barvnih vzorcev, zmanjšanje velikosti zobovja ter morfološke spremembe lobanje, oblike ter velikosti ušes in repa, spremembe v estrusnem ciklu (ta postane bolj pogost in nesezonski), sprememba v razmerju nivoja adrenokortikotropnega hormona (ACTH), koncentraciji nekaterih nevrottransmitterjev, podaljša se juvenilno obnašanje in zmanjša velikost možganov (še posebno nekatere regije) (Wilkins in sod., 2014). Ista raziskava kaže na povezavo med celicami nevralnega grebena in lastnostmi, ki jih povezujemo z domestifikacijo. Te naj bi zaradi manjšega števila celic ali zmanjšane sposobnosti potovanja vplivale na razvoj tkiv, zaradi česar so nekatere morfološke značilnosti manj izražene kot pri divjih osebkih.

Sposobnost preživetja domestificiranih vrst v naravi je manjša, vendar poznamo precej primerov, ko so se udomačene živali po izpustitvi v okolje uspešno prilagodile in preživele (npr. mustangi v Severni Ameriki, dingi v Avstraliji).

Po drugi strani pa je genski sklad volkov rezultat tisočev do milijonov let selekcije in adaptacije na specifične okoljske pogoje in razmere. Dodajanje novih genov iz populacije, ki se je razvijala po popolnoma drugačni evolucijski trajektoriji, bi lahko zmanjšalo fitness potomcev. Tudi z močno selekcijo proti tem "tujim" genom se ti še vedno lahko vključijo v populacijo, sploh v manjših populacijah volkov, kjer je učinek selekcije pogosto manjši od učinka genetskega zdrsa ("*drifta*").

Druge negativne posledice so tudi izguba reprodukcijskega potenciala, zmanjšan fitness osebkov, ki sodelujejo pri križanju, vnos škodljivih "*maladaptive*" alelov v volčjo populacijo ter izguba genetske integritete (Caniglia in sod., 2014; Casas in sod., 2012; Randi, 2008; Schwartz in sod., 2004; Randi in Lucchini, 2002). Prav tako parjenje s psi povečuje tveganje za prenos bolezni, izgubo strahu pred človekom, mnogi strokovnjaki pa opozarjajo, da bi lahko križanje povzročilo spremembo varstvenega statusa volka in izgubo statusa zavarovane živali.

Največjo grožnjo križanje predstavlja za manjše populacije volkov oziroma za populacije, ki širijo svoje areale, saj na robnem območju zaradi manjšega števila osebkov težje pride do srečanja med dvema volkovoma nasprotnega spola kot do srečanja med volkom in psom. Takšna parjenja še dodatno zmanjšujejo število učinkovitih osebkov v populaciji. To vpliva na prirastek, kar lahko na dolgi rok ogrozi preživetje čiste populacije. Tudi če križanci ne preživijo do spolne zrelosti, ko bi se lahko razmnoževali tudi sami (kar bi vodilo v introgresijo), je ves trud, ki je bil vložen v njih s strani staršev, zamujena priložnost za parjenje s partnerjem iste vrste.

Prisotnost križancev na širitvenem valu je lahko problematična tudi zaradi pojava, ki mu pravimo "*gene surfing*". Tu lahko določeni geni/aleli, zaradi močno poudarjenega genskega drifta na širitveni fronti, na novem območju dosežejo veliko višje frekvence, kot bi jih drugače brez širitve. Na račun tega lahko postanejo introgresirani geni na novem območju zelo pogosti. Osebki na robu širjenja areala imajo dostop do nezasedenega teritorija, zato je večja verjetnost, da se bodo razmnoževali prav oni. Njihovi potomci pa ostanejo blizu širitvene linije, zaradi česar se genotip posameznikov vedno znova prenaša naprej in na koncu prevlada na širšem območju (Lehe in sod., 2012). Tako bi lahko v populaciji, ki se prostorsko širi, prisotnost le nekaj posameznih križancev na robnem območju povzročila hitro širjenje in vklop pasjih genov med širšo populacijo.

Poleg negativnih pa ima v nekaterih primerih križanje lahko tudi pozitivne učinke. Povečuje genetsko pestrost, vodi v speciacijo ter omogoča vključitev novih alelov, ki predstavljajo adaptacijo na spreminjajoče se okoljske razmere (Larsen in sod., 2010).

V populacijah po Evropi, kjer so bili križanci zaznani, je frekvenca križanja okrog 3-5% (Godinho in sod., 2011; Randi, 2011; Verardi in sod., 2006; Vilà in sod., 2003; Andersone in sod., 2002; Randi in Lucchini, 2002;).

Vse vidnejše raziskave (Godinho in sod., 2015, 2011; Iacolina in sod., 2010; Vilà in sod., 2003; Andersone in sod., 2002; Randi in Lucchini, 2002) kažejo, da je križanje med volkom in psom spolno asimetrično. V večini do sedaj preučevanih primerov je šlo za parjenje med samico volka in samcem psa (Godinho in sod., 2011; Iacolina in sod., 2010; Koblmüller in sod., 2009; Randi, 2008; Verardi in sod., 2006; Vilà in sod., 2003; Randi in sod., 2000; Andersone in sod., 2002; Vilà in Wayne, 1999; Boitani, 1982). Poznana je le ena izjema iz Evrope, ki kaže na križanje v obratni smeri (samec volka in samica psa), in sicer iz Latvije (Hindrikson in sod., 2012). Drug tak primer je iz Severne Amerike, kjer so v zgodovinskih vzorcih volčje populacije z otoka Vancouver v Kanadi odkrili pasjo mitohondrijsko DNA (Muñoz-Fuentes in sod., 2010).

Za opaženo spolno asimetrijo obstaja več razlag:

Samice volkov so manjše in manj agresivne od samcev, zaradi česar pogosteje pridejo v stik s psom. Samci pa so večji in bolj agresivni, zaradi česar pogosteje prihajajo v konflikt s psi (Hindrikson in sod., 2012; Andersone in sod., 2002) in se jim ti zato izogibajo.

Samice volkov so bolj aktivne pri iskanju partnerjev zunaj svoje populacije kot samci. Zapisi celo opisujejo, da naj bi nekatere samice celo večkrat opazili, ko so med obdobjem parjenja klicale samce psov v bližini vasi. Ena samica naj bi celo dve leti zapored pritegnila istega samca. Opaženo je bilo tudi, da so samice, ki se pariyo zunaj svoje vrste, včasih poškodovane ali stare, kar lahko vpliva na zmnožnost, da bodo našle partnerja iste vrste (Ryabov, 1978 cit. po Hindrikson in sod., 2012).

Razlike med vrstama se pojavljajo tudi v razmnoževanju, saj imajo samice volkov le eno gonitev (estrus) letno (od sredine januarja do sredine marca), zato so samci spolno aktivni le v tem obdobju. Medtem pa imajo samice psov letno dva nesinhronizirana estrusna cikla, tako da so samci psov spolno aktivni vse leto. Tako je večja verjetnost, da bo volčja samica v estrusu, ki išče svoje območje na robu razširjenosti volčje populacije, srečala za parjenje primerne psa kot pa volka. Hkrati pa ima samec volka na robnem območju v obdobju, ko je pripravljen na parjenje, manj možnosti, da bo naletel na samico psa, ki je prav takrat v estrusu (Vilà in Wayne, 1999).

Nekateri raziskovalci domnevajo, da imajo legla križancev z volčjo materjo večjo možnost za preživetje v naravi kot legla pasjih mater, saj so psi slabše prilagojeni na življenje v naravi. Domneva temelji na opazovanju visoke smrtnosti mladičev prostoživečih psov v Italiji (Boitani, 1992 cit. po Hindrikson in sod., 2012), po drugi strani pa bi bila lahko legla skotena pasjim materam spregledana, še zlasti v primeru, ko imajo psice lastnika, ki kot očeta okrivi "vaškega mešanca" in ne volka. Takih legel genetska vzorčenja, ki se izvajajo v naravi, ne zaznajo, res pa je tudi, da ta z vidika intogresije v volčjo populacijo verjetno niso problematična.

Kljub očitnim dejavnikom, ki favorizirajo spolno asimetrijo, pa se včasih zgodi parjenje tudi v drugi smeri. Parjenja med samcem volka in samico psa so verjetno izjemno redka in se verjetno zgodijo le v primerih, ko je število prostoživečih psov veliko, samic volka pa zelo malo (Hindrikson in sod., 2012; Muñoz-Fuentes in sod., 2010).

1.3 UPORABA GENETSKIH MARKERJEV

Prepoznavanje križancev je večinoma eden prvih ciljev pri oblikovanju ohranitvenih in upravljalnih načrtov, vendar pa je to pri vrstah, ki so si med seboj genetsko zelo podobne, lahko precej težavno (Vilà in sod., 2003).

V preteklosti (do sredine 60. let) so križance prepoznavali s primerjavo morfoloških značilnosti sumljivih osebkov in domnevne starševske vrste. Zanašali so se na to, da bo potomec fenotipsko "v sredini" med obema starševskima osebkoma. Vendar pa to ne drži vedno, saj so križanci pogosto mešanica starševskih fenotipov. V primeru povratnih križancev z volkovi so ti pogosto morfološko enaki volkovom. Ravno tako s pomočjo morfoloških značilnosti ne moremo ločevati med križanci prve generacije (F1) ter povratnim križancem. Dejstvo, da je fenotipska pestrost znotraj psov velika, še dodatno otežuje ločevanje (Cadiou in sod., 2009). Z razvojem molekularnih markerjev je postalo prepoznavanje križancev lažje, z napredkom metod, še posebej razvojem PCR, pa se je povečalo število markerjev, ki jih lahko uporabimo za detekcijo križanja. Hkrati pa nam ista metoda omogoča pridobivanje informacij, ne da bi za to morali osebkove ujeti. Za analizo namreč (vsaj teoretično) zadostuje že vzorec z eno samo celico (Allendorf in sod.,

2001). Tako lahko informacije pridobivamo tudi iz iztrebkov, pobranega urina, dlake ali slin. Tem vzorcem zaradi načina nabire, ki ne zahteva neposrednega stika z osebkom, pravimo neinvazivni vzorci.

Raziskovalci pri ugotavljanju križanja izbirajo genetske markerje, ki so prisotni pri obeh vrstah, vendar z različnimi frekvencami.

Raziskovanje križanja med sorodnimi taksoni je zaradi genetske podobnosti zelo oteženo, zato se večinoma vrši s pomočjo razlik v alelnih frekvencah in manj s pomočjo privatnih alelov (sploh v primerih, ko je teh zelo malo). Najprimernejši so markerji, pri katerih se frekvence alelov pri psih in volkovih močno razlikujejo.

Privatni aleli so aleli, ki se pojavljajo le pri posamezni vrsti in so zelo uporabni za različne populacijsko-genetske študije. Njihova prisotnost tudi močno olajša raziskave o križanju. Žal je teh vrstno specifičnih alelov pri psu in volku izredno malo oziroma jih praktično ni. Večinoma se določeni aleli pri eni vrsti pojavljajo pogosteje in redkeje pri drugi. Tako alele, ki so prisotni z visoko frekvenco pri psih, pri volku pa so redki, lahko obravnavamo kot "pasje alele" in obratno.

Ugotavljanje introgresije je težje, saj pričakujemo, da bo pri povratnih križancih le polovica genetskih markerjev pokazala mešane alele. Ta delež se bo v naslednjih generacijah križanja z volkovi še naprej zmanjševal. Zaradi tega je prepoznavna povratnih križancev poznejših generacij težavnejša in zahteva večje število genetskih markerjev.

Za ugotavljanje hibridizacije uporabljamo metode, ki se uporabljajo tudi za iskanje genetske strukture populacij. Med najbolj uporabljane metode spada metoda Bayesovega grupiranja ("*Bayesian clustering*"), ki jo uporablja tudi program "Structure" (Pritchard in sod., 2000).

Večina raziskav temelji na mitohondrijski DNK in autosomalnih mikrosatelitskih markerjih (Godinho in sod., 2011; Randi, 2008; Verardi in sod., 2006; Vila in sod., 2003; Andersone in sod., 2002; Randi in sod., 2002;), le nekaj pa jih je bilo izvedenih z Y kromosomskimi markerji (Godinho in sod., 2011; Vila in sod., 2003) za ugotavljanje vlog obeh spolov pri procesu hibridizacije.

Z rutinsko uporabo multilokusnih genetskih in genomskih markerjev odkrivamo čedalje več primerov križanja.

1.3.1 Mikrosateliti

Mikrosateliti so sekvence kratkih ponavljajočih se motivov DNK, npr. CACACACA dolgih od 1 do 5 baz (mono-, di-, tri-, tetra-, pentanukleotidi), ki jih najdemo v genomih večine taksonov. Najpogosteje uporabljeni so di-, tri- in tetranukleotidi, najmanj pa mononukleotidi zaradi problemov s pomnoževanjem v PCR. Število ponovitev motiva se razlikuje (polimorfizem) zaradi zdrsov polimeraze med replikacijo DNK, ponavadi pa gre za 5 do 50 ponovitev (Turnpenny in Ellard, 2005). Na vsaki strani mikrosatelitskega fragmenta so spremljevalne ("*flanking*") regije, ki so večinoma ohranjene oziroma identične med posamezniki iste oziroma sorodnih vrst ter zato pomembne za izdelavo lokusno specifičnih primerjev, s pomočjo katerih lahko mikrosatelite pomnožimo s PCR. Večinoma se mikrosateliti pojavljajo v nekodirajočih delih genoma, ki jim pravimo tudi introni.

Pri diploidnih organizmih ima vsak osebek dve kopiji mikrosatelitnega segmenta, eno kopijo od vsakega starša. Občasno pa se lahko zgodi, da med prepisovanjem lokusa, polimeraza "zdrsne" ter doda ali odvzame dodatno kopijo motiva (v našem primeru CA). Takemu dogodku pravimo mutacija. Literatura navaja, da je stopnja mutacij za posamezen mikrosatelit na generacijo med 10^{-2} in 10^{-6} , v povprečju 5×10^{-4} (Schlötterer 2000, cit. po Selkoe in Toonen, 2006), medtem ko je povprečna mutacijska stopnja za genomsko DNK sesalcev $2,2 \times 10^{-9}$ (Kumar in Subramanian, 2002). Tako za en mikrosatelitski lokus obstaja »dolžinski polimorfizem«, tj. več različic z različnim številom ponovitev (alelov).

V primerjavi z nekaterimi ostalimi markerji so mikrosateliti bolj primerni zaradi lažje priprave vzorcev, saj je zaradi amplifikacije s PCR omogočena uporaba manjših vzorcev tkiva, možna je genotipizacija vzorcev z nizko kvaliteto DNK (npr. neinvazivnih vzorcev), zaradi stabilnosti DNK pa lahko uporabimo preprostejše načine shranjevanja (npr. 96 % etanol). Krajša dolžina segmentov (100-300 bp) omogoča dobro amplifikacijo kljub delni degradaciji DNK (pomembno pri neinvazivnih vzorcih), ker pa so mikrosateliti razmeroma izrazito vrstnospecifični, je tudi kontaminacija z drugimi netarčnimi organizmi manj problematična (Selkoe in Toonen, 2006). Zaradi visoke mutacijske stopnje in njihove velike alelne pestrosti so mikrosatelitski markerji zelo uporabni v forenzični, varstveni in populacijski genetiki za individualno prpoznavo osebkov, ugotavljanje nedavne demografske zgodovine (Pearse in Crandall, 2004), izračun koeficienta sokrvja ("*inbreeding*"), strukture populacij in subpopulacij, efektivne velikosti populacije ter različne filogenetske študije.

Uporabo mikrosatelitskih markerjev zaznamuje tudi nekaj slabosti. Posamezni mikrosatelitski primerji redko delujejo za širše taksonomske skupine, zato njihova uporaba pogosto zahteva razvoj novih primerjev za vsako vrsto posebej (Glenn in Schable 2005, cit. po Selkoe in Toonen, 2006).

1.4 NEINVAZIVNO VZORČENJE

Z razvojem PCR metode za namnoževanje specifičnih DNK sekvenc se je razvilo tudi več različnih metod vzorčenja (Taberlet in sod., 1999):

- destruktivno vzorčenje, pri katerem za pridobitev vzorca osebek žrtvujemo;
- nedestruktivno vzorčenje, pri katerem ujetemu osebkcu odvzamemo vzorec tkiva ali krvi;
- neinvazivno vzorčenje, pri katerem za pridobitev DNK ne potrebujemo ujeti živali.

Vir DNK so lahko slina, iztrebki, urin ter izpadla dlaka ali perje. Neinvazivno vzorčenje tako omogoča tudi spremljanje redkejših populacij oziroma vrst, ki bi jih drugače težje ujeli, ocenjevanje velikosti populacij s pomočjo metode ponovnega ulova ("capture-recapture method"), spremljanje dinamike ogroženih populacij ter oceno disperzije in parjenja v sorodstvu (Caniglia in sod., 2014).

Neinvazivne vzorce živali pustijo za seboj, medtem ko se gibljejo skozi okolje. Kot vzorce uporabljamo večinoma iztrebke ali urin (sploh pozimi, ko ga lahko odvzamemo skupaj s snegom), perje ali dlako ter slino. Ker so ponavadi vzorci pred najdbo kar nekaj časa izpostavljeni vremenskim pogojem (sonce, dež), je lahko DNK delno degradirana oziroma poškodovana. Količina iskanih celic v teh vzorcih je majhna, zaradi česar se pogosto zgodi, da nam iz nekaterih vzorcev ne uspe dobiti uporabnih rezultatov.

Zaradi pričakovane majhne koncentracije iskane DNK v teh vzorcih, ki je pogosto tudi slabše ohranjena, lahko pride do nekaterih problemov. Najpogostejše so napake v genotipizaciji, med njimi izpadanje alelov ("*allelic dropout*"), lažni aleli ("*false allele*"), dominanca kratkih alelov ("*short allele dominance*") (Pompanon in sod., 2005).

V primeru, da se amplificira le eden od obeh alelov na istem lokusu, je osebek navidezen homozigot za ta lokus. Temu pravimo izpad alela in je pri vzorcih s slabo kvaliteto DNK najpogostejša napaka. Lažni aleli nastanejo na koncu elongacije pri PCR, ko Taq polimeraza na novo sintetizirano verigo doda nukleotide (večinoma je to adenin). Ta A+ artefakt se na rezultatih opazi kot dodaten vrh, ki ga lahko zamenjamo z pravim alelom. Dominanca kratkih alelov je posledica majhne koncentracije DNK, zaradi česar se pri heterozihotnih osebkih bolje amplificira krajši alel. "*Shadow effect*" lahko nastane, ko nismo izbrali dovolj lokusov oziroma imajo ti majhno heterozigotnost. Tako lahko podcenimo raznolikost v populaciji oziroma ne prepoznamo vseh osebkov, saj ima več različnih osebkov na teh lokusih enake alele.

Del genotipizacijskih napak je posledica človeške napake ("*human error*") in vključuje klicanje alelov, zamešanje vzorcev, napake pri pipetiranju ter kontaminacijo. Večini teh napak se lahko izognemo s pravilno izbiro markerjev in uporabo optimiziranih

laboratorijskih protokolov ter kontrolami. Posebno pozornost je potrebno nameniti tudi kontaminaciji, saj ta zaradi majhne koncentracije in kvalitete DNK lahko ustvari lažne nove osebkke.

1.5 UPRAVLJANJE S KRIŽANCI

Volkovi so zelo mobilni in imajo velike teritorije. Doraščajoči morajo pogosto dispergirati preko večih teritorijev preden najdejo prosto območje, ki ga lahko zasedejo. Ozemlja tropov segajo daleč prek mej zavarovanih območij in parkov. Trenutni varstveni programi, ki jih izvajajo države v Evropi, temelijo na odstranjevanju križancev (Estonija: Lohmus, 2001; Italija: Genovesi, 2002; Finska: Ministry for Agriculture and Forestry, 2005; Portugalska: Godinho in sod., 2011; Vilà in sod., 2003). Enaki ukrepi so bili predlagani v akcijskem načrtu za varovanje volka v Evropi (Boitani, 2000).

Glavna skrb pri križanju med psom in volkom je izguba specifičnih prilagoditev, kar bi lahko vodilo v izumrtje manjše in fragmentirane volčje populacije, če je križanje preveč pogosto. Zato je monitoring genetske pestrosti, določitev stopnje križanja, vloge samcev in samic obeh populacij v procesu križanja ter vpliv križanja na starševsko populacijo ključnega pomena za varovanje volka (Hindrikson in sod., 2012).

Zaradi velike mobilnosti volkov in izogibanja človeku, je večina raziskav temeljila na telemetričnem spremljanju, zimskemu sledenju in občasnih opazovanjih. Vse te metode so zamudne in drage. Razvoj populacijske genetike, genomike in neinvazivnega genetskega vzorčenja omogoča nove in cenejše možnosti za študij dinamike populacij volkov ter izvajanje dolgotrajnih programov spremljanja.

1.6 CILJ NALOGE

Cilj naloge je bil izdelati in optimizirati protokol, s pomočjo katerega bi z uporabo neinvazivnih genetskih metod prepoznali oziroma ločevali med križanci in volkovi. Izbira palete 10-12 mikrosatelitskih markerjev in optimizacija protokola, s pomočjo katerega bi jih lahko pomnožili v enem ali dveh multipleksih PCR. To bo omogočilo hitrejše (ter predvsem cenejše) testiranje, ki bo porabilo manj materiala, kot bi ga sicer, če bi morali testirati široko paleto markerjev, ki se v te namene uporablja danes.

1.7 HIPOTEZE

Volka, psa ter F1 in F2 križance med tema dvema vrstama lahko dobro razločujemo s pomočjo razmeroma majhne, dobro izbrane palete mikrosatelitskih lokusov.

Križance lahko z majhno paleto populacijsko-specifično izbranih lokusov zanesljivo zaznavamo tudi iz neinvazivnih genetskih vzorcev, kjer je zaradi pogostih napak v določenih genotipih uporaba večjega števila lokusov problematična.

2 PREGLED OBJAV

Križanje med divjimi in domačimi živalmi postaja čedalje bolj raziskovana tema. Z razvojem novih statističnih metod je postalo mogoče tudi iskanje križancev pri vrstah, ki so si genetsko zelo podobne oziroma zanje nimamo vrstno specifičnih mikrosatelitskih markerjev. Med najbolj uporabljanimi so metode, ki temeljijo na Bayesovskem pristopu k statistiki. To uporablja tudi program Structure (Pritchard in sod., 2000). Populacije (K) imajo značilne alelne frekvence na vsakem lokusu, osebk pa so dodeljeni v posamezno populacijo glede na verjetnost pripadnosti. V primeru križancev se predpostavi, da ima osebek nezanemarljivo verjetnost, da pripada najmanj dvema populacijama. Vsakemu osebk se dodeli tudi q vrednost za pripadnost posamezni populaciji, s skupnim seštevkom 1. Tako je pričakovana q vrednost križanca prve generacije 0,5 za obe populaciji (v primeru, da je $K = 2$). Prednost uporabe Bayesove metode je, da ne potrebujemo alelnih frekvenc referenčnih vzorcev (Vähä in Primmer, 2006).

Križance in čiste osebk določujemo s pomočjo q vrednosti. Tu gre za kompromis med učinkovitostjo (delež osebkov, ki smo jih pravilno določili) in natančnostjo (delež določenih osebkov v skupini, ki res spadajo v to skupino). Natančnost določevanja se poveča z višanjem mejne q vrednosti, hkrati pa se znižuje učinkovitost. Optimalna mejna vrednost je tako odvisna od okoliščin. V primeru, da želimo doseči večjo učinkovitost, uporabimo nekoliko nižjo vrednost, kot v primeru, ko želimo doseči večjo natančnost (Vähä in Primmer, 2006).

Boitani (1984) omeni možnost križanja med italijanskimi volkovi in psi kot razlog za hiter porast števila volkov med leti 1973 in 1983 (s 100 na 220 osebkov); opiše tudi sedem morfološko nenavadnih osebkov, ulovljenih med leti 1982-1983. Kasneje Randi in sod. (1993) v raziskavi na 30 volkovih, ulovljenih med leti 1986-1991, uporabijo mitohondijsko DNA in ne odkrijejo nobene introgresije, vendar pa omenijo možnost spolne asimetrije. V kasnejši raziskavi (Randi in sod., 2000) analizirajo 101 vzorcev italijanskih volkov in 29 vzorcev bolgarskih volkov za primerjavo. Analiza mtDNK je med vsemi povzorčenimi italijanskimi volkovi zaznala le en haplotip, ki pa ni bil značilen za pse, medtem ko je med bolgarskimi vzorci zaznala kar šest različnih haplotipov značilnih samo za volkove. Leta 2002 sta Randi in Lucchini (2002) prvič dokazala prisotnost križancev v italijanski populaciji volkov z 18 mikrosatelitskimi markerji. V raziskavo je bilo vključeno 107 volkov, 95 psov in devet križancev in volkov neznanega izvora v ujetništvu. Eden od dveh črnih italijanskih volkov se izkaže za križanca prve generacije, medtem ko je program Structure drugega črnega volka in volka s petim prstom dodelil med volkove. Avtorja sta tako sklepala, da je introgresija psov med italijanske volkove redka (Randi in Lucchini, 2002). Istega leta je objavljena še raziskava iz Latvije, kjer ravno tako potrdijo prisotnost križancev (Andersone in sod., 2002). V študijo je bilo vključenih 31 tkivnih vzorcev volkov (1997-1998), od tega sedem krvnih vzorcev mladičev z istega legla iz leta 1999, ki

so jih po morfoloških znakih uvrstili med križance. Vzorci so bili odvzeti tudi materi in domnevemu očetu, ki je bil po nenavadnem barvnem vzorcu uvrščen med križance. Analiza je bila opravljena s 16-imi mikrosatelitskimi markerji in mtDNK. Nekateri od markerjev so bili razmeroma pogosti pri psih, pri volkovih pa se niso pojavljali (alela 97 in 107 na lokusu CPH2, 173 na lokusu CPH7, 152 na CPH9, 129 in 149 na C09.250 ter 158 na vWF.X), medtem ko so bili drugi pogosti pri volkovih in odsotni pri psih (203 na lokusu CPH12 ter 134 na VWF). Mladiči iz legla križancev so po analizi s programom Structure imeli q_w med 0,18 in 0,56, starša pa 0,93 (oče) in 0,63 (mati). Od štirih preostalih hibridov je bil eden z močno pripadnostjo pasji populaciji ($q = 0,86$), tako da bi lahko šlo za povratnega križanca s psom ali pa le psa, ostali trije pa so bili uvrščeni med volkove. Z analizo sorodnosti so kasneje ugotovili, da domnevni oče z leglom zelo verjetno ni bil povezan. Avtorji zaključijo, da je križanje verjetno posledica motene socialne strukture volkov.

Kmalu za tem Vila in sod. (2003) potrdijo prisotnost križancev tudi na Norveškem. Analizirali so dva vzorca iz leta 1999, vzorec krvi povoženega juvenilnega osebka (oktober 1999) in vzorec urina samice v estrusu (marec 1999), ki je bila hkrati tudi edina samica na območju, ter 25 vzorcev skandinavskih volkov (vzorčenih po 1980), 23 finskih volkov, 24 vzorcev s severozahodne Rusije, osem vzorcev iz Latvije in 23 vzorcev iz Estonije ter 44 vzorcev psov. Za analizo so uporabili 18 avtosomalnih mikrosatelitskih markerjev, mtDNK in Y kromosomske markerje. mtDNK ni razkrila nobenih haplotipov, ki bi bili značilni za pse, medtem ko se Y kromosomski marker, ki so ga uspešno amplificirali pri juvenilnem osebku z Norveške, pojavlja tako pri psih kot pri populacijah volka v severni Evropi. Tudi pri avtosomalnih lokusih so pri juvenilnem osebku na dveh lokusih našli dva alela, ki se pri skandinavskih volkovih ne pojavljata, jih pa najdemo pri psih in volkovih iz drugih populacij. Frekvenca alelov za ostale lokuse je bila prav tako redka pri skandinavskih volkovih. S Structure analizo so samico uvrstili med skandinavske volkove ($q = 0,998$), medtem ko je bil mladič označen kot križanec ($q = 0,264$). Avtorji zaključijo, da so ostali skandinavski volkovi ($n = 25$) dobro ločeni od volkov in ne kažejo nobenih znakov nedavnega križanja s psom, po čemer sklepajo, da je le-to redko.

Vähä in Primmer (2006) sta primerjala uporabo dveh programov (Structure in NewHybrids) za določevanje križancev. Zaključita, da je za učinkovito ločevanje ($\geq 95\%$) med križanci prve generacije in starševsko populacijo potrebno 12 markerjev z $F_{st} = 0,21$ oziroma 24 markerjev z $F_{st} = 0,12$, za natančno ločevanje ($\geq 95\%$) pa je potrebno uporabiti dvakrat večje število markerjev. Omenita, da bi bilo možno zmanjšati število potrebnih markerjev z uporabo vezanih markerjev, kot dodatno strategijo za izboljšanje natančnosti pa omenita določitev strožjih intervalov q -vrednosti, ki bi ločevali križance od volkov, osebki s q vrednostjo med posameznimi intervali pa se ne klasificirajo v nobeno skupino.

Verardi in sod. (2006) v raziskavo vključijo 220 vzorcev volkov, zbranih v letih 1987-2002 iz cele Italije, 85 vzorcev psov ter sedem vzorcev križancev, ki so služili kot kontrola. Uporabijo 20 mikrosatelitskih markerjev, od tega 16 vezanih ("*linked*") in štiri nevezane ("*unlinked*"). Po Structure analizi ($K = 2$) je bilo 11 volkov delno uvrščenih v obe skupini s $q_i < 0,8$, enako tudi vseh sedem znanih križancev. Avtorji zaključijo, da je introgresija veliko večja (5 %), kot je bilo pred tem ugotovljeno z uporabo le nevezanih markerjev (Randi in Lucchini, 2002), in sicer en križanec v vzorcu 107 volkov (0,9 %). S pomočjo Structure analize ocenijo, da je do introgresije prišlo v zadnjih 70 (± 20) generacijah, torej v približno zadnjih 140-210 letih, vendar izpostavijo, da program predvidi le eno križanje med starševskima populacijama, medtem ko je realno do križanja verjetno prišlo večkrat oziroma se le-to ponavlja. Zaradi tega je zanesljivost ocene neznana. Zaključijo, da so volkovi in psi kljub občasni hibridizaciji še vedno genetsko dobro ločeni skupini.

Hindrikson in sod. (2012) prvič potrdijo prisotnost križancev v Estoniji. Analizirali so 74 volkov iz Estonije ($n = 37$) in Latvije ($n = 37$), 21 psov ter osem domnevnih križancev iz Estonije ($n = 6$) in Latvije ($n = 2$) s pomočjo 11 avtosomalnih mikrosatelitskih lokusov. Nekateri aleli, opaženi pri križancih, so bili pogosti pri volkovih, pri psih pa jih niso opazili (133 na lokusu FH2001 in 222 na lokusu FH2010). Enako so bili nekateri aleli opaženi le pri psih in križancih, pri volkovih pa se niso pojavljali (167 na lokusu FH2054 in 105 na lokusu M-CPH2). S programom Structure so izvedli dve analizi, prvo (set A) z *usepopinfo* = 0 in drugo (set B) z *usepopinfo* = 1. Rezultati so bili za križance iz Latvije v obeh primerih isti in so jih uvrščali med križance prve generacije, medtem ko je Structure v setu A križance iz Estonije uvrstil bližje volkovom (F2), v setu B pa med križance prve generacije. Zaključili so, da bi bilo za natančnejše določevanje potrebno uporabiti večje število markerjev. S pomočjo mtDNK prvi potrdijo izjemo pri dosedajšnjem asimetričnem križanju pri dveh hibridih iz Latvije, saj je bil pri njih odkrit haplotip, ki se drugače pojavlja pri psih in kaže na križanje samice psa s samcem volka.

V študiji na Iberskem polotoku (Godinho in sod., 2011) so uporabili 42 mikrosatelitskih markerjev, šest mikrosatelitov vezanih na Y kromosom ter mtDNK haplotipe, s ciljem ugotoviti, ali tudi tu prihaja do križanja ter za kako daleč nazaj lahko z naborom izbranih markerjev prepoznajo križanje. V študijo so vključili 408 vzorcev (zbranih med leti 1996 in 2009): 208 volkov, 196 psov (152 čistokrvnih psov in 54 divjih, ki so bili vzorčeni prek celega območja volkov) in štiri potencialne križance (določeni glede na morfološki izgled in obnašanje). Po Structure analizi brez priorjev in $K = 2$ so bili vsi psi jasno dodeljeni v svojo skupino (povprečen $Q_i = 0,995$), medtem ko je med volkovi ($Q_i = 0,990$) izstopalo osem osebkov (vključno s štirimi prej omenjenimi križanci), ki so bili delno razporejeni v obe skupini ($q_i < 0,85$). S pomočjo simuliranih razredov so preverili uspešnost seta markerjev, in sicer 100 % za F1 in F2 ter 84 % za povratne križance prve generacije (za mejno vrednost $q = 0,85$).

Nadaljnja analiza je pokazala, da so trije od označenih križancev zelo verjetno križanci prve generacije (F1), trije povratni križanci z volkom, zadnja dva pa sta bila po verjetnosti razporejena v dva razreda (prvi z večjo verjetnostko za povratnega križanca s psom (BD) $q = 0,721$, ter drugi med $q_{F1} = 0,460$ in $q_{BD} = 0,443$). Pri križancih so z uporabo Y kromosomskih markerjev in mtDNK halplotipov preverili smer križanja ("*direction of hybridization*") in ugotovili, da je pri vseh prisotna volčja mtDNK. Avtorji zaključijo, da sta kljub zaznanemu križanju obe skupini (volkovi in psi) še vedno dobro ločeni in da kljub dolgemu sobivanju hibridizacija ni imela velikega vpliva na volčjo populacijo. Predhodna študija (Ramírez in sod., 2006; cit. po Godinho in sod., 2011) s 13 nevezanimi mikrosateliti na 74 vzorcih ni zaznala nobenega križanca, medtem ko so Godinho in sod. (2011) potrdili osem križancev (4 %), kar je zelo podobno vrednosti, ki jo podajo tudi študije narejene v Italiji, in sicer 5 % (Verardi in sod., 2006; Randi in Lucchini, 2002).

Raziskava z območja Kavkaza (Kopaliani in sod., 2014) je postavila vprašanje, ali je križanje bolj pogosto na območju, kjer je še vedno pogosta uporaba pastirskih psov, ki varujejo drobnico na pašnikih in niso pod kontrolo človeka, psi pa so po velikosti bolj podobni volkovom. V raziskavo so vključili osem mikrosatelitskih lokusov. Ugotovili so, da je 13 % volkov imelo nedavne pasje prednike ter več kot 10 % psov nedavne volčje prednike, 2-3 % vzorčenih volkov in psov pa je bilo F1 križancev. Delež križancev je bil veliko večji, kot se je pred tem opazalo v Evropi.

Zaradi lažje dostopnosti neinvazivnih vzorcev kot tkivnih vzorcev so Godinho in sod. (2015) primerjali dva seta markerjev, in sicer 52 in 13. Nabor 13 markerjev je bil načrtno izbran glede na Fst ($n = 11$) in PI ($n = 2$) vrednosti posameznih markerjev. V študijo je bilo vključenih 38 vzorcev iztrebkov (vzorčenje je potekalo 2011) in štirje tkivni vzorci odstreljenih križancev. S pomočjo simuliranih osebkov so preverili učinkovitost in natančnost obeh setov markerjev, ter določili mejne q vrednosti. Pri primerjavi obeh setov markerjev so opazili, da je set 52 markerjev kazal večjo genetsko pestrost vzorcev, drugače pa so bile ostale vrednosti precej primerljive. Test učinkovitosti seta 13 markerjev na 1000 simuliranih osebkih je pokazal, da je bilo pravilno določenih 100 % F1 osebkov, 96,3 % BW1 in 66,4 % BD1 ter 68,2 % BW2 in 22,8 % BD2, vendar pa po učinkovitosti ni presegel seta 52 markerjev. Avtorji zaključijo, da je zbran set 13 markerjev zelo učinkovit in omogoča hitrejše testiranje, ni pa primeren za nekatere analize populacijske genetike, saj so ocene genetske pestrosti nižje, kot so sicer z večjim setom markerjev. Zaradi možnih sprememb alelnih frekvenc avtorji priporočajo ponovno testiranje učinkovitosti seta čez nekaj časa.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

V nalogi smo uporabili 411 vzorcev, od tega je bilo 358 vzorcev volkov ter 53 vzorcev psov. Med volkovi je bilo 99 vzorcev iz Dalmacije, 62 z območja Gorskega Kotarja, 44 iz Like, devet iz ostalih delov Hrvaške ter 144 z območja Slovenije.

Vzorci volkov so bili večinoma invazivni, zbrani med leti 1998-2013. Večinoma je šlo za redne odstrele, žrtve prometnih nesreč in najdene poginule živali. Vzorce tkiva (~4cm³ mišice ali kože) smo po odvzetju shranili v 50 mL posodici, napolnjeni s 30 mL 96 % etanola pri -20°C. Ekstrakcijo DNK iz vzorcev smo opravili v laboratoriju za invazivne vzorce.

Vzorce psov smo zbrali ob veterinarskih pregledih psov. Za vsak vzorec smo psu izpulili nekaj dlak, s čimer smo hoteli zagotoviti, da bo v vzorcu čim več dlačnih mešičkov, ki so potrebni za pridobitev kvalitetne DNK. Te smo nato shranili v kuverto, ki je bila vložena v "ziplock" plastično vrečko skupaj z desikantom (silika gelom). Kuverto smo hranili na sobni temperaturi v temnem prostoru do ekstrakcije DNK. Ker smo pričakovali majhno količino DNK, smo vzorce dlake obdelali v laboratoriju za neinvazivne vzorce.

3.2 DELO V LABORATORIJU

Invazivne in neinvazivne vzorce smo shranili in procesirali v dveh ločenih laboratorijih, s čimer smo preprečili morebitno kontaminacijo neinvazivnih vzorcev in vzorcev dlake, za katere smo domnevali, da imajo manj DNK. Potek dela v obeh laboratorijih ob obdelavi vzorcev je bil bolj ali manj enak.

Ob prihodu v laboratorij smo vzorce najprej vnesli v bazo (prepis podatkov z etikete: kdaj in kje je bil vzorec pridobljen, starost živali, v kolikor jo je bilo mogoče določiti, ime najditelja, starost osebka, telesna masa in spol). Hkrati smo vsakemu vzorcu dodelili individualno nalepko s svojo barkodo in individualno številčno kodo, s pomočjo katere se zmanjša možnost zamenjave vzorcev v nadaljnjih postopkih ter prepreči morebitne napake v prepisovanju kode. Med procesom ekstrakcije smo individualno kodo zaradi lažjega dela zamenjali z začasno delovno kodo (številke od 1 do 23), obe kodi (delovno in individualno) pa smo zapisali v delovnem protokolu. Ob koncu ekstrakcije smo na vsako mikrocentrifugirko z vzorcem nalepili po dve barkodi (za primer, da ena odpade) ter individualno kodo, in sicer eno na pokrovček ter ostali dve na strani.

3.2.1 Ekstrakcija DNK

Pri delu z invazivnimi in neinvazivnimi vzorci smo veliko truda namenili preprečevanju kontaminacije. Neinvazivni vzorci imajo ponavadi majhno količino DNK, ki je lahko slabše kvalitete kot DNK v tkivnih vzorcih, zato smo oba tipa vzorcev ločili že ob prihodu v laboratorij. Izločitev DNK in priprava verižne reakcije polimeraze (PCR) je tako potekala v dveh različnih laboratorijih. Za laboratorij z neinvazivnimi vzorci smo uvedli posebej stroga pravila, ki preprečujejo vnos "tuje" DNK oziroma kontaminacijo. Gibanje med obema laboratorijema je omejeno, vzpostavljen je enosmeren pretok materiala (material, ki neinvazivni laboratorij zapusti, ne more več nazaj), med aktivnim delom se vse delovne površine in instrumente redno dekontaminira z 10 % natrijevim hipokloritom. Pri pipetiranju smo uporabljali pipetirne nastavke z aerosolnimi filtri.

Za izolacijo DNK iz vzorcev dlak smo uporabili Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma), po navodilih proizvajalca. Vzorce s pufrom Lysis T in proteinazo K smo inkubirali čez noč na 56 °C.

DNK iz tkivnih vzorcev smo izolirali z GeneElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma) po navodilih proizvajalca.

V vsako ekstrakcijo smo vključili tudi negativne kontrole (23 vzorcev + kontrola), celoten proces pa smo dokumentirali tudi s fotografijami, tako da bi se lahko kasneje v primeru nejasnosti (npr. suma zamenjave vzorcev) pregledalo fotografije in izsledilo napako.

3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za amplifikacijo vzorcev smo uporabili QIAGEN Multiplex PCR Kit oziroma Finnzyme Canine Panel Multiplex, po navodilih proizvajalca, z nekaterimi prilagoditvami. Primerji so bili predpripravljeni v mastermix mešanici za lažje pipetiranje. Med pripravljanjem mešanice za PCR smo upoštevali do 10 % dodatnega volumna zaradi izgub pri pipetiranju.

Volumen uporabljene DNK se je razlikoval med invazivnimi in neinvazivnimi vzorci (Preglednica 1). Pri invazivnih vzorcih smo uporabili 1 uL DNK, pri neinvazivnih vzorcih pa med 2-4 uL DNK, odvisno od tega, kako dobra je bila amplifikacija.

Preglednica 1: Točni volumen mešanic za PCR multipleks. Za vse, razen za KIT 3 (Finnzyme Canine Kit) smo uporabili QIAGEN mastermix, za KIT 3 pa Fusion mastermix.

	1x		1x
MM (QIAGEN)	5 uL	MM (Fusion)	5 uL
MP	1 uL	MP	3 uL
UHQ-H ₂ O	3 uL	UHQ-H ₂ O	2 uL
Celotni volumen	9 uL*	Celotni volumen	10 uL

*Ker smo pri neinvazivni vzorcih uporabili 2-4 uL DNK, smo to upoštevali pri celotnem volumnu. Kar je bilo več volumna DNK, smo odšteli pri volumnu H₂O (pri 2 uL DNK smo uporabili 2 uL H₂O na vzorec, za 4 uL DNK pa nismo dodali nič H₂O).

MP – mix primerjev.

MM – master mix.

UHQ-H₂O – Ultra čista voda.

Po zaključenem PCR smo vzorce pripravili za sekvenator. Uporabili smo 10 uL formamid + LIZ mešanice, ki smo ji nato dodali še 1 uL PCR produkta (pri nekaterih neinvazivnih vzorcih smo uporabili 2 uL). PCR produkte smo nato genotipizirali na avtomatskem sekvenatorju ABI 3130xl DNA Analyser (Applied Biosystems). Da bi preprečili napake, smo vsak vzorec amplificirali in genotipizirali dvakrat do štirikrat. Vzorce, pri katerih je bila amplifikacija pri prvih dveh ponovitvah slaba, smo izločili iz nadaljnje analize. Aleli so bili določeni s pomočjo programa GeneMapper 4.1. Ponovno smo analizirali 10 % naključno izbranih vzorcev in preverili pogostost napak.

3.3 IZBIRA MARKERJEV

Za izbiro najboljših markerjev smo uporabili set 35 markerjev, ki se jih uporablja v raziskavah kanidov na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti, Univerza v Ljubljani.

Uporabili smo naslednje markerje: CPH9, CPH12, C20_253, C09_250, FH2010, CPH5, CPH7, Cxx_121, FH2137, CPH22, VWF, Cxx_123, CPH2, FH2004, FH2088, FH2096, CPH6, CPH4, REN169O18, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTk253, FH2848, REN162C04, REN247M23, INU055, AHTh260, INU030, AHTk211, CPH8, CXX279, FH2145, FH2054.

Za izbiro najbolj ustreznega markerja smo v programu GenAlEx izračunali verjetnost identitete (P_{ID}) (Waits in sod., 2001) in fiksacijski indeks (F_{st}) (Wright, 1949) za vsak lokus. F_{st} je vrednost, ki nam pove, kakšno je povprečno zmanjšanje heterozigotov v posamezni populaciji, ki je posledica genetskega drifta med subpopulacijami, medtem ko P_{ID} vrednost označuje verjetnost, da bosta imela dva naključno izbrana osebka enaka alela na istem lokusu.

To nam je omogočilo primerjavo vseh markerjev in izbiro najbolj informativnih. Izbrali smo markerje z visoko F_{st} vrednostjo in nizko P_{ID} vrednostjo. Najbolj ugodno bi bilo, če bi lahko iste markerje uporabili za razlikovanje med volkovi in križanci ter za razlikovanje med posameznimi osebki. Žal pa so bili markerji, ki so bili zelo ugodni za ločevanje med volkovi in križanci, manj ugodni za individualno prepoznavo osebkov (Preglednica 2). Tako smo morali izbrati kompromis med obema vrednostima. Ker je bil naš cilj oblikovanje seta markerjev za prepoznavo križancev, smo izbrali več markerjev z visoko F_{st} vrednostjo in le nekaj z nizko P_{ID} vrednostjo, kar nam bo kasneje še vedno omogočalo zanesljivo ločevanje med posameznimi osebki.

Pri izbiri markerjev smo morali upoštevati tudi dolžino amplificiranih fragmentov, saj je DNK v neinvazivnih vzorcih pogosto slabše ohranjena oziroma degradirana, zaradi česar je verjetnost, da so ohranjeni daljši fragmenti, manjša. Pri krajših fragmentih je tudi boljša amplifikacija. Iz tega razloga smo izbirali markerje do dolžine največ 250 baznih parov.

Izbrali smo 10-14 markerjev, ki so bili med bolj informativnimi na F_{st} lestvici in znotraj velikostnega limita, s katerimi bi ločevali med križanci in volkovi, ter tri markerje, ki so imeli najmanjše P_{ID} vrednosti, s katerimi bi izboljšali ločevanje posameznih osebkov.

Za primerjavo učinkovitosti smo oblikovali tri sete: set 12, 14 in 16 markerjev, ki smo jih analizirali enako kot set 35 markerjev.

3.4 ANALIZA PODATKOV

Ob zaključeni analizi s programom GeneMapper smo vse rezultate izvozili v skupno datoteko in jo s pomočjo programa Create (Coombs in sod., 2008) pretvorili v obliko, skladno s programom Structure.

S pomočjo tega programa smo izvedli analizo, v katero smo vključili vseh 35 markerjev in vse osebke, uporabili pa smo naslednje parametre: 100.000 začetnih korakov ("*burn-in*"), 1.000.000 MCMC korakov ("*MCMC reps*"), admixture model, korelirane frekvence alelov ("*correlated allele frequencies*"), $popflag = 0$, 10 ponovitev ("*iterations*").

S pomočjo te analize smo pridobili osebke z Q vrednostjo $>0,990$, ki smo jih nato uporabili kot osnovo za generiranje 100 simuliranih volkov in psov. Te smo ustvarili s simulacijo parjenja s pomočjo programa HybridLab. Pri volkovih smo želeli ohraniti populacijsko strukturo, zato smo simulirane osebke iz Dalmacije in Like generirali posebej, osebke z Gorskega Kotarja in Slovenije pa skupaj, pri čemer smo pazili, da so ostali v enakem razmerju kot v našem vzorcu. Z ločenim simuliranjem posameznih populacij volkov smo želeli ustvariti podobne možnosti za simulirano parjenje med posameznimi osebki, kot bi jih pričakovali dejansko v naravi. Za izdelavo 100 simuliranih volkov smo uporabili 262

volkov, ki so imeli $q > 0,990$ (od tega 39 volkov iz Dalmacije, 31 iz Like, 53 z Gorskega Kotarja, dve iz drugih delov Hrvaške ter 137 volkov iz Slovenije). Upoštevali smo tudi delež osebkov iz posameznega območja. Za izdelavo 100 simuliranih pssov smo uporabili 42 osebkov, ki so imeli $q > 0,990$.

S simuliranimi volkovi in psi smo nato s programom HybridLab generirali še križance, in sicer križance prve (WDH) in druge (HC) generacije, povratne križance z volkom prve (BW1) in druge (BW2) generacije ter povratne križance s psom prve (BD1) in druge (BD2) generacije. Simulirane osebkove smo nato analizirali s pomočjo programa Structure (100.000 začetnih korakov, 1.000.000 MCMC korakov, admixture model, korelirane frekvence alelov, popflag = 0, 10 ponovitev) in q vrednosti posameznikov z znano (simulirano) stopnjo križanja uporabili kot pomoč pri določanju mejnih vrednosti za posamezne skupine.

Vsi seti markerjev so bili analizirani z istimi programi in po enakih parametrih. Dodatni seti so bili ustvarjeni z namenom, da bi sestavili najbolj ugoden set markerjev, ki je še vedno dovolj majhen, da lahko analizo izvedemo v enem ali dveh multipleksiranih PCR. Hkrati smo lahko tudi primerjali, kako dodajanje in odvzemanje markerjev vpliva na zmožnost prepoznavanja križancev. Vsaka posamezna analiza v programu Structure je vsebovala 10 ponovitev. Za združenje in grupiranje dobljenih podatkov smo uporabili program CLUMPAK (Kopelman in sod., 2015).

Križance, volkove in pse smo tudi slikovno prikazali s pomočjo analize PCoA (*Principle Coordinate Analysis*) oziroma metode glavnih koordinat, ki je bila izvedena s pomočjo programa GenAlEx (Peakall in Smouse, 2006, 2012). Gre za eno od multivariantnih analiz, s pomočjo katere lahko prikažemo razlike med podatki. Deluje tako, da vsakemu podatku dodeli točko na koordinatni osi glede na to, koliko se razlikuje od ostalih vzorcev.

3.4.1 Uporaba programa Structure 2.3.4.

Za analizo rezultatov sem uporabila program STRUCTURE (Pritchard in sod., 2000) za populacijsko analizo. Program uporablja Bayesovsko gručenje in Monte Carlo Markovske verige (MCMC), kjer vsak posamezni osebek dodeli najbolj verjetni populaciji. Analiza se prične z "burn-in" periodo oziroma periodo začetnih korakov, ki jo določimo pred pričetkom analize in se ponavlja giblje med 10.000 in 100.000. Ta določa, koliko časa program teče, preden prične z analizo. V tem času program dobljenih vrednosti ne shranjuje in uporablja, na ta način se minimalizira učinek začetne nastavitve parametrov. Čas po burn-in periodi, ko program teče in shranjuje rezultate, se imenuje MCMC. Da je bila Markovska veriga dovolj dolga, lahko vidimo, ko nam vse ponovitve dajo podoben rezultat (verige konvergirajo). Program omogoča uporabo več modelov z različnimi predpostavkami.

3.4.2 Admixture model

Model je priporočen s strani ustvarjalcev programa Structure za vse začetne analize, saj je zaradi fleksibilnosti zmožen upoštevati dogajanje v realnih populacijah. Uporablja se v primerih, ko sumimo, da imajo osebkni mešano poreklo, zato je še posebno uporaben pri ugotavljanju hibridnih con. Domneva, da je vsak osebek i del genotipa podedoval od prednikov iz populacije k , rezultat pa odraža delež pripadnosti posamezni populaciji.

3.4.3 Prior population information – USEPOPINFO model

Program poleg genetskih informacij uporablja tudi druge podane informacije (lokacijo ali predhodno določeno pripadnost posamezni populaciji), hkrati pa analizira, ali ima kateri od osebkov prednika v kateri od drugih populacij za izbrano število generacij nazaj (v našem primeru smo izbrali 2). Za vse osebkne smo podali izhodiščno populacijo (pes ali volk), za Popflag uporabili vrednost 1 (v prejšnjem modelu smo namesto te uporabili 0) ter izbrali opcijo POPINFO. Ostale nastavitve so bile enake kot v zgornjem modelu, le da smo namesto admixture modela izbrali *prior population information model*, ter izbrali možnost, da program analizira verjetnosti za do dve generacije nazaj (GENSBACK = 2).

3.5 OBLIKOVANJE MULTIPLEKSA

Cilj naloge je bil oblikovati set markerjev v 2-3 multipleksih, s pomočjo katerega bi lahko hitreje in ceneje testirali neinvazivne vzorce, saj je neinvazivne vzorce pogosto potrebno večkrat analizirati, da bi dobili zanesljiv genotip. Pri oblikovanju multipleks PCR in analizi na kapilarnem sekvenatorju smo uporabili petbarvno kemijo, FAM (modra), VIC (zelena), NED (rumena), PET (rdeča) ter LIZ (oranžna). Prve štiri smo uporabili za označevanje markerjev, oranžna pa je bila uporabljena za dolžinski standard (Gene Scan 500-Liz, Applied Biosystems). Pri oblikovanju je bilo potrebno paziti, da se dolžine alelov posameznih markerjev v isti barvi ne prekrivajo. Zaradi uporabe za neinvazivne vzorce smo v posamezni multipleks vključili samo do devet markerjev. Ravno tako smo med razvrščanjem markerjev upoštevali, da so v posameznem multipleksu tako dolgi kot kratki markerji ter ne samo kratki ali samo dolgi, med njimi pa je bilo vedno še nekaj razlike, kar bi v primeru novih alelov preprečilo prekrivanje. Ravno tako smo pazili, da so imeli vsi markerji na posameznem multipleksu podobno temperaturo za vezavo oligonukleotidov (*annealing temperature*).

4 REZULTATI

4.1 IZBIRA MIKROSATELITSKIH MARKERJEV

Preglednica 2: Seznam uporabljenih lokusov glede na Fst vrednost (od večjih do manjših vrednosti) ter PI vrednost (od najmanjših do največjih vrednosti). Pri izboru markerjev smo upoštevali dolžino mikrosatelitov (ni prikazana na preglednici) ter mesto na preglednici (idealni so bili markerji, ki se na obeh preglednicah nahajajo v zgornjem delu).

Lokus	Fst	Lokus	PI-volk
CPH6	0,217	FH2137	2,6E-02
AHTk253	0,196	AHTh260	3,8E-02
CPH9	0,191	REN247M23	4,9E-02
CPH22	0,174	AHT137	5,5E-02
CPH4	0,163	Cxx_123	5,8E-02
C20_253	0,159	CPH2	6,0E-02
REN54P11	0,149	C20_253	7,0E-02
REN169D01	0,147	C09_250	7,9E-02
AHTk211	0,146	FH2004	8,6E-02
CPH5	0,143	FH2848	1,0E-01
VWF	0,143	CXX279	1,1E-01
REN162C04	0,135	CPH5	1,1E-01
FH2096	0,128	AHTk253	1,2E-01
FH2054	0,118	REN169D01	1,2E-01
REN169O18	0,113	INU030	1,3E-01
Cxx_121	0,107	FH2088	1,3E-01
REN247M23	0,095	Cxx_121	1,3E-01
FH2010	0,082	VWF	1,3E-01
FH2088	0,078	INU055	1,4E-01
FH2848	0,074	CPH4	1,5E-01
INU030	0,073	FH2010	1,6E-01
FH2145	0,070	CPH12	1,6E-01
CPH2	0,069	CPH8	1,7E-01
CXX279	0,067	INRA21	1,8E-01
CPH7	0,062	FH2054	1,9E-01
FH2004	0,061	REN54P11	1,9E-01
CPH8	0,059	REN169O18	1,9E-01
INU055	0,058	CPH22	2,0E-01
CPH12	0,057	CPH9	2,2E-01
AHT137	0,056	CPH7	2,4E-01
FH2137	0,045	FH2145	2,4E-01
AHTh260	0,043	AHTk211	2,6E-01
Cxx_123	0,032	CPH6	2,9E-01
C09_250	0,028	REN162C04	3,0E-01
INRA21	0,019	FH2096	4,5E-01

4.2 PRIMERJAVA SIMULIRANIH SETOV MIKROSATELITSKIH MARKERJEV

S pomočjo programa Structure smo analizirali vse sete. S pomočjo simuliranih setov smo lahko izračunali, kako uspešen je posamezen set pri prepoznavi križancev ter volkov. Za vsak simuliran razred (volk, pes, križanec 1. in 2. generacije, povratni križanec z volkom 1. in 2. generacije, povratni križanec s psom 1. in 2. generacije) smo nato preverili koliko osebkov, ki so v resnici križanci, dodeli k volkovom (razen pri volkovih, kjer smo preverili koliko volkov dodeli h križancem). V prvem stolpcu Preglednice 3 so prikazane izbrane mejne vrednosti, ki jih uporabimo za ločevanje med križanci in volkovi.

Preglednica 3: Primerjava učinkovitosti 3 setov markerjev (12, 14, 16) proti setu z vsemi (35) markerji.

35 markerjev	W	D	WDH	HC	BW1	BW2	BD1	BD2
0,85	0	0	0	0	8	64	0	0
0,88	0	0	0	0	1	50	0	0
0,89	0	0	0	0	1	40	0	0
0,90	0	0	0	0	1	36	0	0
0,92	0	0	0	0	0	21	0	0
0,95	4	0	0	0	0	10	0	0
16 markerjev	W	D	WDH	HC	BW1	BW2	BD1	BD2
0,85	0	0	0	0	19	53	0	0
0,88	3	0	0	0	12	45	0	0
0,89	5	0	0	0	8	42	0	0
0,90	7	0	0	0	6	38	0	0
0,92	8	0	0	0	2	28	0	0
0,95	26	0	0	0	1	16	0	0
14 markerjev	W	D	WDH	HC	BW1	BW2	BD1	BD2
0,85	0	0	0	1	18	55	0	0
0,88	3	0	0	0	10	44	0	0
0,89	3	0	0	0	8	39	0	0
0,90	3	0	0	0	7	38	0	0
0,92	8	0	0	0	3	31	0	0
0,95	31	0	0	0	0	16	0	0
12 markerjev	W	D	WDH	HC	BW1	BW2	BD1	BD2
0,85	3	0	0	1	23	52	0	0
0,88	3	0	0	1	11	46	0	0
0,89	3	0	0	0	9	42	0	0
0,90	6	0	0	0	8	36	0	0
0,92	12	0	0	0	4	24	0	0
0,95	37	0	0	0	0	12	0	0

W (čisti volkovi), WDH (križanci prve generacije), HC (križanci druge generacije), BW1 (povratni križanci z volkom prve generacije), BW2 (povratni križanci z volkom druge generacije), BD1 (povratni križanci s psom prve generacije), BD2 (povratni križanci s psom druge generacije).

V Preglednici 3 je prikazana številčnost osebkov, ki sicer spadajo znotraj navedenih razredov (volk, pes, križanci), vendar pa so bili zaradi višje q vrednosti (kot je določena mejna q vrednost) uvrščeni med volčjo populacijo oziroma v primeru volkov med križance. Vidimo lahko, da dobro prepoznamo volkove, pse ter križance prve in druge generacije. Pri povratnih križancih prve generacije je ločevanje malo slabše, za povratne križance druge generacije pa je pri nekaterih mejnih vrednostih prepoznavna precej slaba. V vsakem razredu je bilo 100 osebkov, zaradi česar lahko hitro izračunamo delež uspešnosti posamezne mejne vrednosti.

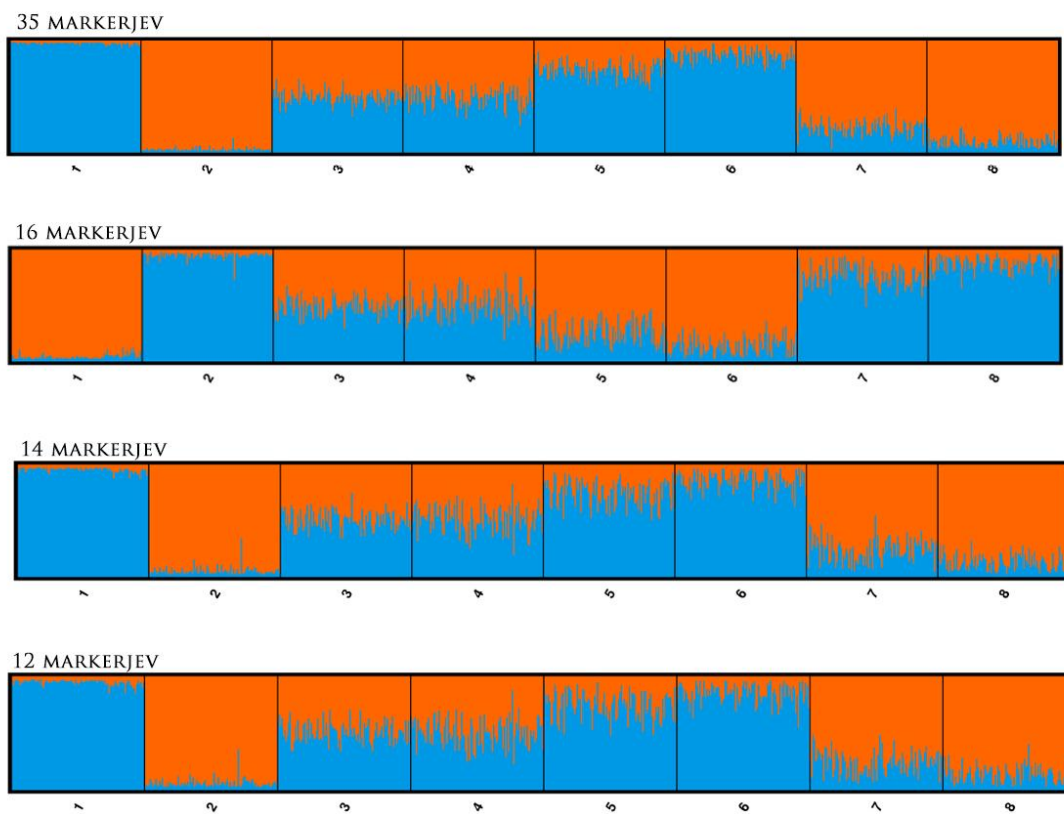
Kot pričakovano, je bil set 35 markerjev pri tem najboljši. Pri mejnih vrednostih od 0,92 do 0,85 tako ne bi nobenega volka določili kot križanca ter nobenega križanca prve in druge generacije kot volka. Dobro deluje tudi pri prepoznavi povratnih križancev z volkom, saj v prvi generaciji pravilno določi kar 100 % osebkov, v drugi 79 % (pri $q = 0,92$) in 99 % povratnih križancev z volkom prve generacije ter 64 % druge generacije (pri $q = 0,90$).

Set 16 markerjev le pri mejni vrednosti 0,85 ne zgreši nobenih volkov (jih uvrsti med križance), vendar pa več kot 50 % povratnih križancev druge generacije uvrsti med volkove. Z vsemi mejnimi vrednostimi zaznamo vse križance prve in druge generacije. Pri mejnih vrednostih $q = 0,92$ med križance dodeli 8 volkov, med povratnimi križanci prve generacije je med pravilno določenih 98 % osebkov, med povratnimi križanci druge generacije pa 72 %.

Set 14 markerjev pri vseh mejnih vrednostih pravilno prepozna vse križance prve in druge generacije. Pri mejni vrednosti 0,92 kot križance označi 8 volkov, med povratnimi križanci prve generacije je pravilno določenih 97 % ($q = 0,92$) med križanci druge generacije pa 69 % ($q = 0,92$).

Najslabše se je odrezal set 12 markerjev, ki med križance dodeli 12 ($q = 0,92$) in 6 ($q = 0,90$) volkov. Tudi ta set pravilno določi vse križance prve in druge generacije (pri $q = 0,92$ oziroma $q = 0,90$). Med povratnimi križanci prve generacije je pravilno določenih 96 % ($q = 0,92$) in 92 % ($q = 0,90$) osebkov, pri drugi generaciji pa je pravilno določenih 76 % ($q = 0,92$) ter 64 % ($q = 0,90$) osebkov.

Za določevanje križancev s setom 35 markerjev predlagamo mejno q vrednost 0,92, za preostale analizirane sete pa menimo, da je najbolj ugodna q vrednost 0,88, saj izgubimo manj volkov (le 3 %) in še vedno prepoznamo veliko večino povratnih križancev prve generacije. Set 14 markerjev izgleda najbolj primeren za določevanje križancev pri mejni vrednosti 0,88.



Slika 2: Slikovni prikaz po združitvi vseh desetih ponovitev za posamezne sete s programom CLUMPAK.

*Z vrednostjo 1 so označeni volkovi, z 2 psi, 3 križanci prve generacije F1 (volk x pes), v tekstu označeni tudi kot WDH. S 4 so označeni križanci druge generacije F2 (WDH x WDH), s 5 so označeni povratni križanci z volkom prve generacije (WDH x W) in jih v tekstu označujemo kot BW1, s 6 pa povratni križanci z volkom druge generacije (BW1 x W). Ti so v tekstu poimenovani z BW2. S 7 in 8 pa smo označili povratne križance s psom prve in druge generacije. Ti so v besedilu označeni kot BD1 ter BD2.

S prikazov lahko vidimo, da so križanci jasno vidni, težje je ločevanje med križanci prve (F1) in druge (F2) generacije.

S pomočjo osebkov, simuliranih s pomočjo programa HybridLab, smo lahko določili povprečne vrednosti pripadnosti posamezni skupini. Povprečen Q_{w35} za simuliranega čistega volka je 0,976, q_i vrednosti pa so bile v razponu med $0,932 < q_{i35} < 0,988$. Pri simuliranih psih je bila vrednost $Q_{d135} = 0,970$ z razponom vrednosti $0,866 < q_{i35} < 0,988$. Povprečen Q_{w14} za simuliranega čistega volka je 0,954, q_i vrednosti pa so bile v razponu med $0,872 < q_{i14} < 0,976$. Vrednosti za simulirane pse so $Q_{i14} = 0,944$ z razponom vrednosti $0,653 < q_{i14} < 0,976$.

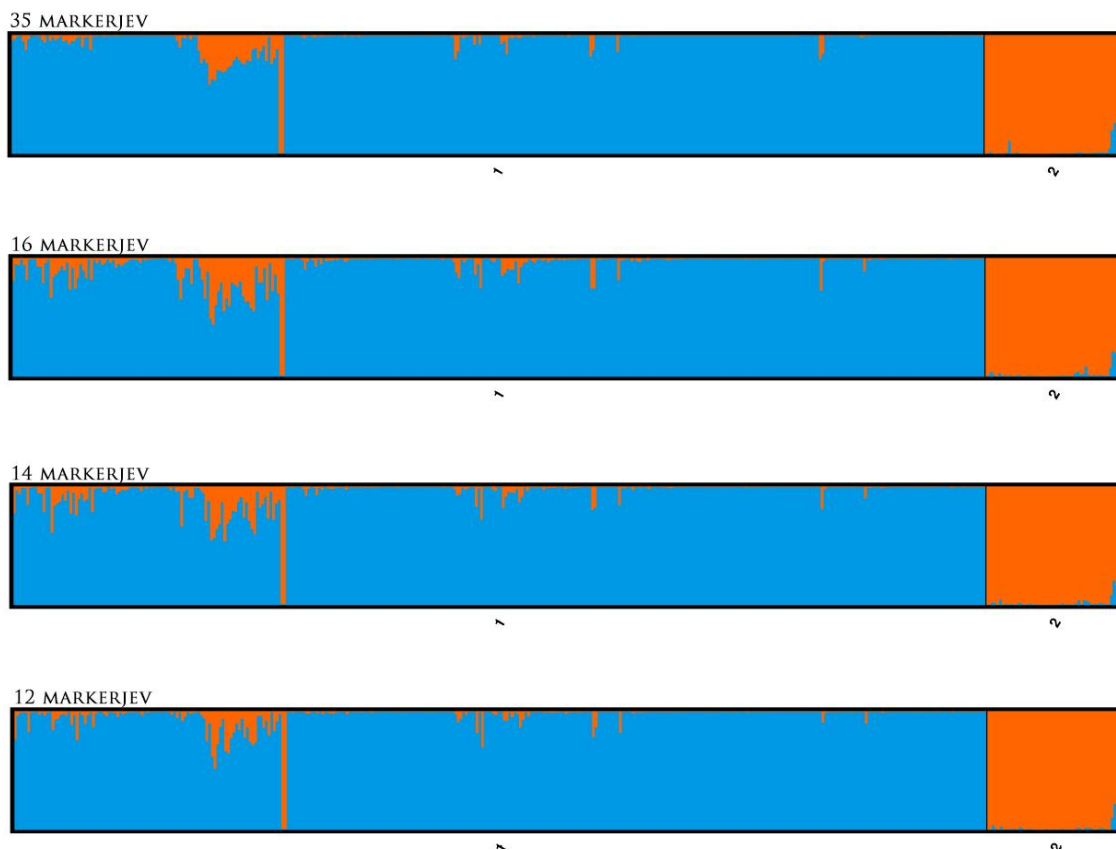
Preglednica 4: Izračuni povprečne Q_i vrednosti in intervalov zaupanja za simulirane osebkke pri vseh setih analiziranih markerjev.

35	Q_w	Q_d	max q_w	min q_w	max q_d	min q_d	CI_{wolf}	CI_{dog}
W	0,976	0,024	0,988	0,932	0,068	0,012	0,918 - 1,000	0,000 - 0,082
D	0,030	0,970	0,134	0,012	0,988	0,866	0,000 - 0,100	0,900 - 1,000
WDH	0,495	0,505	0,664	0,323	0,677	0,336	0,347 - 0,641	0,359 - 0,653
HC	0,492	0,508	0,678	0,242	0,759	0,322	0,345 - 0,636	0,364 - 0,655
BW1	0,737	0,263	0,904	0,557	0,443	0,096	0,601 - 0,858	0,142 - 0,399
BW2	0,870	0,130	0,975	0,728	0,272	0,025	0,757 - 0,957	0,043 - 0,243
BD1	0,222	0,778	0,403	0,033	0,967	0,597	0,097 - 0,361	0,639 - 0,903
BD2	0,097	0,903	0,231	0,027	0,971	0,769	0,018 - 0,212	0,788 - 0,982
16	Q_w	Q_d	max q_w	min q_w	max q_d	min q_d	CI_{wolf}	CI_{dog}
W	0,956	0,044	0,978	0,869	0,131	0,022	0,857 - 0,999	0,001 - 0,143
D	0,051	0,949	0,268	0,021	0,979	0,732	0,001 - 0,160	0,840 - 0,999
WDH	0,506	0,494	0,704	0,325	0,675	0,296	0,311 - 0,697	0,303 - 0,689
HC	0,503	0,497	0,809	0,205	0,795	0,191	0,312 - 0,691	0,309 - 0,688
BW1	0,749	0,251	0,929	0,528	0,472	0,071	0,571 - 0,897	0,103 - 0,429
BW2	0,86	0,140	0,974	0,636	0,364	0,026	0,709 - 0,966	0,034 - 0,291
BD1	0,24	0,760	0,514	0,043	0,957	0,487	0,087 - 0,422	0,578 - 0,913
BD2	0,13	0,870	0,350	0,027	0,973	0,65	0,022 - 0,285	0,715 - 0,978
14	Q_w	Q_d	max q_w	min q_w	max q_d	min q_d	CI_{wolf}	CI_{dog}
W	0,954	0,046	0,976	0,872	0,128	0,024	0,850 - 1,000	0,000 - 0,150
D	0,056	0,944	0,347	0,024	0,976	0,653	0,002 - 0,173	0,827 - 0,998
WDH	0,51	0,490	0,747	0,342	0,658	0,253	0,306 - 0,710	0,290 - 0,694
HC	0,512	0,488	0,829	0,197	0,803	0,171	0,311 - 0,709	0,291 - 0,689
BW1	0,744	0,256	0,939	0,506	0,494	0,061	0,556 - 0,899	0,101 - 0,444
BW2	0,858	0,142	0,971	0,628	0,372	0,029	0,698 - 0,968	0,032 - 0,302
BD1	0,241	0,759	0,548	0,049	0,951	0,452	0,082 - 0,433	0,567 - 0,918
BD2	0,134	0,866	0,324	0,027	0,973	0,676	0,022 - 0,296	0,704 - 0,978
12	Q_w	Q_d	max q_w	min q_w	max q_d	min q_d	CI_{wolf}	CI_{dog}
W	0,947	0,053	0,973	0,843	0,157	0,027	0,828 - 0,999	0,001 - 0,172
D	0,062	0,939	0,363	0,029	0,971	0,637	0,002 - 0,189	0,811 - 0,998
WDH	0,512	0,488	0,708	0,337	0,663	0,292	0,296 - 0,724	0,276 - 0,704
HC	0,505	0,495	0,880	0,230	0,770	0,120	0,294 - 0,715	0,285 - 0,706
BW1	0,746	0,254	0,949	0,475	0,525	0,051	0,548 - 0,909	0,091 - 0,452
BW2	0,851	0,149	0,967	0,551	0,449	0,033	0,679 - 0,969	0,031 - 0,321
BD1	0,242	0,758	0,491	0,058	0,942	0,510	0,077 - 0,445	0,555 - 0,923
BD2	0,140	0,860	0,404	0,032	0,968	0,596	0,022 - 0,313	0,687 - 0,978

Q_i ... povprečen delež pripadnosti volku ali psu; q_i ... delež pripadnosti volku ali psu posameznega osebkke; $CI_{...}$ interval zaupanja.
Za simulirane razrede smo v preglednici uporabili kratice: W (volk), D (pes), WDH (križanec prve generacije), HC (križanec druge generacije), BW1 (povratni križanec z volkom prve generacije), BW2 (povratni križanec z volkom druge generacije), BD1 (povratni križanec s psom prve generacije), BD2 (povratni križanec s psom druge generacije).

4.3 DETEKCIJA KRIŽANCEV S POMOČJO PROGRAMA STRUCTURE

Vseh 10 ponovitev za posamezen set markerjev smo združili s programom CLUMPAK.



Slika 3: Pregled vseh križancev, ki so jih zaznali posamezni seti markerjev. S številko 1 so označeni vzorci volkov, s številko 2 pa vzorci psov.

Slika 3 prikazuje pripadnost osebkov posamezni populaciji, ki smo jo dobili po analizi Structure rezultatov s programom Clumpak. Vsak posameznik je prikazan z vertikalno črtico, ki je razdeljena na K obarvane segmente, ki predstavljajo populacijo (v našem primeru $K=2$). Tako ima vsak osebek delež genoma, ki pripada vsaj eni populaciji. Z modro barvo je označena volčja populacija, medtem ko je z oranžno barvo označena pasja populacija. Osebki si v vseh setih sledijo v istem zaporedju.

Vse križance, ki so jih naši seti markerjev zaznali, smo navedli v Preglednici 5, v kateri so podane tudi q vrednosti in CI intervali za posamezen osebek, kot jih je zaznal posamezen set.

Preglednica 5: Primerjava vseh zaznanih križancev med vsemi seti.

	12 markers		14 markers		16 markers		35 markers	
	q	CI interval	q	CI interval	q	CI interval	q	CI interval
AP.07MC	0,763	0,532-1,000	0,774	0,561-0,979	0,808	0,617-0,988	0,951	0,825-1,000
AP.0851	0,821	0,588-1,000	0,843	0,640-1,000	0,811	0,616-0,991	0,871	0,743-0,982
AP.07PF	0,964	0,789-1,000	0,785	0,561-1,000	0,789	0,584-0,982	0,959	0,819-1,000
AP.0802	0,842	0,526-1,000	0,608	0,362-0,847	0,667	0,441-0,876	0,952	0,804-1,000
AP.08AK	0,925	0,714-1,000	0,838	0,633-1,000	0,841	0,665-1,000	0,983	0,901-1,000
AP.07YL	0,938	0,731-1,000	0,856	0,638-1,000	0,866	0,681-1,000	0,955	0,820-1,000
CH.0LLX	0,970	0,805-1,000	0,873	0,626-1,000	0,891	0,681-1,000	0,972	0,857-1,000
AP.07YA	0,882	0,602-1,000	0,771	0,523-1,000	0,736	0,518-0,949	0,921	0,747-1,000
AP.087M	0,753	0,486-1,000	0,754	0,513-0,988	0,742	0,511-0,948	0,949	0,809-1,000
AP.08A6	0,987	0,907-1,000	0,894	0,667-1,000	0,829	0,612-1,000	0,977	0,869-1,000
AP.08AM	0,891	0,720-1,000	0,875	0,707-1,000	0,893	0,745-1,000	0,902	0,784-1,000
AP.081A	0,968	0,809 -1,000	0,892	0,673-1,000	0,830	0,618-1,000	0,981	0,889-1,000
AP.0817	0,869	0,634,1,000	0,783	0,559-0,993	0,815	0,608-0,999	0,878	0,732-1,000
AP.0875	0,992	0,948-1,000	0,963	0,792-1,000	0,818	0,569-1,000	0,951	0,785-1,000
AP.0841	0,915	0,571-1,000	0,661	0,356-1,000	0,651	0,383-0,933	0,894	0,756-1000
AP.081M	0,951	0,710-1,000	0,957	0,750-1,000	0,834	0,553-1,000	0,980	0,875-1,000
AP.084T	0,984	0,892-1,000	0,904	0,642-1,000	0,781	0,540-1,000	0,965	0,821-1,000
AP.08AE	0,967	0,797-1,000	0,970	0,826-1,000	0,920	0,706-1,000	0,871	0,740-0,976
CH.0LLM	0,940	0,753-1,000	0,945	0,780-1,000	0,815	0,624-0,964	0,764	0,607-0,902
AP.07X8	0,748	0,523-0,952	0,710	0,498-0,894	0,658	0,457-0,837	0,802	0,675-0,936
AP.081F	0,898	0,591-1,000	0,878	0,614-1,000	0,885	0,661-1,000	0,766	0,601-0,906
AP.07TU	0,615	0,385-0,829	0,547	0,327-0,760	0,489	0,285-0,692	0,581	0,424-0,732
CH.0LLY	0,515	0,273-0,756	0,565	0,330-0,790	0,439	0,224-0,657	0,631	0,471-0,782
AP.084X	0,721	0,501-0,909	0,640	0,433-0,828	0,603	0,407-0,785	0,617	0,462-0,765
AP.0870	0,871	0,590-1,000	0,679	0,453-0,897	0,721	0,518-0,906	0,707	0,550-0,850
AP.0886	0,938	0,707-1,000	0,870	0,629-1,000	0,796	0,576-1,000	0,701	0,546-0,842
AP.07U1	0,665	0,425-0,904	0,536	0,327-0,742	0,551	0,357-0,739	0,687	0,528-0,837
CH.0LLU	0,645	0,389-0,895	0,689	0,447-0,918	0,660	0,438-0,863	0,697	0,537-0,843
AP.087F	0,774	0,488-1,000	0,723	0,477-1,000	0,597	0,383-0,805	0,729	0,575-0,868
AP.0861	0,823	0,622-0,977	0,797	0,597-0,954	0,795	0,598-0,951	0,740	0,600-0,864
AP.082A	0,900	0,639-1,000	0,786	0,561-1,000	0,774	0,567-0,995	0,785	0,645-0,911
AP.0844	0,841	0,567-1,000	0,873	0,635-1,000	0,757	0,530-0,966	0,818	0,663-0,955
CH.0LM5	0,938	0,695-1,000	0,910	0,664-1,000	0,804	0,554-1,000	0,788	0,626-0,930
AP.086Y	0,775	0,552-0,976	0,739	0,530-0,924	0,679	0,479-0,862	0,765	0,627-0,889
AP.087Y	0,865	0,555-1,000	0,867	0,603-1,000	0,629	0,391-0,859	0,751	0,600-0,886
CH.0LLP	0,742	0,524-0,920	0,712	0,494-0,898	0,637	0,420-0,836	0,790	0,656-0,905
AP.0858	0,715	0,466-0,947	0,641	0,402-0,872	0,578	0,351-0,802	0,780	0,633-0,909
AP.0812	0,738	0,422-1,000	0,595	0,337-0,846	0,552	0,306-0,786	0,878	0,705-1,000
AP.0843	0,961	0,822-1,000	0,958	0,823-1,000	0,929	0,782-1,000	0,889	0,775-0,982

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 5: Primerjava vseh zaznanih križancev med vsemi seti.

AP.07Y6	0,964	0,806-1,000	0,821	0,624-1,000	0,791	0,616-0,948	0,800	0,646-0,975
AP.07UT	0,858	0,656-1,000	0,853	0,657-0,997	0,796	0,610-0,945	0,866	0,744-0,964
AP.0811	0,920	0,739-1,000	0,914	0,737-1,000	0,916	0,751-1,000	0,908	0,800-0,984
AP.0878	0,799	0,497-1,000	0,731	0,475-1,000	0,645	0,420-0,858	0,782	0,631-0,916
AP.0838	0,834	0,623-0,998	0,720	0,513-0,900	0,721	0,522-0,896	0,755	0,606-0,888
AP.088F	0,914	0,705-1,000	0,855	0,657-1,000	0,859	0,673-1,000	0,806	0,659-0,938
AP.0888	0,978	0,845-1,000	0,888	0,630-1,000	0,701	0,476-0,935	0,881	0,682-1,000
AP.0871	0,907	0,666-1,000	0,922	0,719-1,000	0,877	0,673-1,000	0,797	0,658-0,918
AP.087J	0,937	0,681-1,000	0,936	0,707-1,000	0,832	0,580-1,000	0,862	0,688-1,000
AP.07TX	0,815	0,473-1,000	0,829	0,530-1,000	0,861	0,607-1,000	0,918	0,776-1,000
AP.07M3	0,697	0,457-0,914	0,719	0,494-0,919	0,774	0,537-0,925	0,919	0,786-1,000
AP.0853	0,924	0,704-1,000	0,816	0,585-1,000	0,849	0,648-1,000	0,925	0,782-1,000
AP.07U3	0,920	0,641-1,000	0,914	0,669-1,000	0,874	0,632-1,000	0,950	0,778-1,000
AP.08A4	0,990	0,937-1,000	0,954	0,790-1,000	0,910	0,727-1,000	0,840	0,716-0,943
AP.081T	0,859	0,584-1,000	0,866	0,622-1,000	0,785	0,559-1,000	0,980	0,879-1,000
CH.0LM3	0,781	0,549-1,000	0,802	0,600-0,987	0,742	0,545-0,917	0,817	0,670-0,948
AP.0884	0,862	0,580-1,000	0,821	0,562-1,000	0,746	0,522-0,978	0,873	0,706-1,000
EE.14Y0	0,815	0,564-1,000	0,841	0,614-1,000	0,810	0,611-0,988	0,857	0,723-0,972
AP.08C2	0,904	0,609-1,000	0,807	0,535-1,000	0,725	0,482-0,989	0,796	0,649-0,928
AP.086J	0,985	0,899-1,000	0,978	0,861-1,000	0,974	0,857-1,000	0,844	0,673-1,000
CT.0YKM	0,010	0,000-0,068	0,011	0,000-0,071	0,014	0,000-0,087	0,109	0,000-0,343
AH.02UT	0,223	0,000-0,457	0,207	0,000-0,420	0,215	0,007-0,421	0,198	0,001-0,371
AH.02X0	0,158	0,000-0,377	0,162	0,000-0,366	0,203	0,036-0,384	0,263	0,112-0,424
AP.07XA	0,328	0,000-0,625	0,364	0,092-0,632	0,372	0,148-0,604	0,193	0,002-0,357

V Preglednici 5 smo navedli vse križance, ki smo jih zaznali z vsemi analizami. Tako lahko tudi primerjamo, kako so različni seti markerjev uvrstili posamezne osebkke.

Za dodatno pomoč pri določanju križancev smo uporabili tudi »*Prior population information*« model. Tu dobljene vrednosti ne predstavljajo deleža genoma, ki pripada posamezni populaciji (kot metoda »*Admixture*«, ki je bila uporabljena za zgornje rezultate), temveč verjetnost, da osebek pripada dodeljeni populaciji (torej populaciji, kateri smo ga dodelili pred pričetkom analize (volk ali pes), hkrati pa še poda verjetnosti, da je bil pripadnik nasprotne populacije kateri od nedavnih prednikov oziroma verjetnost, da je osebek križanec. Pri pregledu rezultatov za set 35 markerjev smo upoštevali le tiste vzorce, pri katerih smo že pri prejšnji analizi s programom Structure dobili q vrednost <0,920, torej smo jih označili kot križance. Za sete 12, 14 in 16 markerjev smo kot križance označili osebkke z q vrednostjo <0,88. Za osebkke, pri katerih je program pri rezultatih dodal tudi zvezdico, lahko trdimo, da so resnično križanci, pri ostalih pa je potrebno malo previdnosti pri interpretiranju rezultatov.

Preglednica 6: *Population information model* vrednosti za zaznane križance pri setu 35 markerjev.

Vzorec	Predvidena populacija	Nasprotna populacija	1. gen	2. gen	
AP.0851	Pop1: 0,728	Pop 2: 0	0	0,272	
AP.08AM	Pop1: 0,942	Pop 2: 0	0	0,058	
AP.0817	Pop1: 0,893	Pop 2: 0	0	0,107	
AP.0841	Pop1: 0,913	Pop 2: 0	0	0,087	
AP.08AE	Pop1: 0,428	Pop 2: 0	0	0,572	*
CH.0LLM	Pop1: 0,013	Pop 2: 0	0	0,987	***
AP.07X8	Pop1: 0,397	Pop 2: 0	0	0,603	*
AP.081F	Pop1: 0,023	Pop 2: 0	0,003	0,974	***
AP.07TU	Pop1: 0	Pop 2: 0,021	0,246	0,732	***
CH.0LLY	Pop1: 0	Pop 2: 0	0,001	0,999	***
AP.084X	Pop1: 0	Pop 2: 0	0,002	0,998	***
AP.0870	Pop1: 0,004	Pop 2: 0	0,001	0,995	***
AP.0886	Pop1: 0	Pop 2: 0	0,001	0,999	***
AP.07U1	Pop1: 0,013	Pop 2: 0	0,014	0,973	***
CH.0LLU	Pop1: 0,002	Pop 2: 0	0,002	0,996	***
AP.087F	Pop1: 0,003	Pop 2: 0	0	0,997	***
AP.0861	Pop1: 0,001	Pop 2: 0,003	0	0,996	***
AP.082A	Pop1: 0,029	Pop 2: 0	0	0,971	***
AP.0844	Pop1: 0,307	Pop 2: 0	0	0,693	*
CH.0LM5	Pop1: 0,071	Pop 2: 0	0	0,929	***
AP.086Y	Pop1: 0,031	Pop 2: 0	0	0,969	***
AP.087Y	Pop1: 0,037	Pop 2: 0	0	0,963	***
CH.0LLP	Pop1: 0,017	Pop 2: 0,004	0	0,979	***
AP.0858	Pop1: 0,01	Pop 2: 0	0	0,99	***
AP.0812	Pop1: 0,841	Pop 2: 0	0	0,159	
AP.0843	Pop1: 0,534	Pop 2: 0	0	0,466	
AP.07Y6	Pop1: 0,21	Pop 2: 0	0	0,79	**
AP.07UT	Pop1: 0,093	Pop 2: 0	0	0,907	***
AP.0811	Pop1: 0,468	Pop 2: 0	0	0,532	*
AP.0878	Pop1: 0,614	Pop 2: 0,001	0	0,385	
AP.0838	Pop1: 0,001	Pop 2: 0	0,001	0,998	***
AP.088F	Pop1: 0,254	Pop 2: 0	0	0,746	**
AP.0888	Pop1: 0,898	Pop 2: 0	0	0,102	
AP.0871	Pop1: 0,112	Pop 2: 0	0	0,888	**
AP.087J	Pop1: 0,752	Pop 2: 0	0	0,248	
AP.07TX	Pop1: 0,831	Pop 2: 0	0	0,169	
AP.07M3	Pop1: 0,893	Pop 2: 0	0	0,107	
AP.08A4	Pop1: 0,217	Pop 2: 0	0	0,783	**
CH.0LM3	Pop1: 0,129	Pop 2: 0	0	0,871	**
AP.0884	Pop1: 0,827	Pop 2: 0	0	0,173	
EE.14Y0	Pop1: 0,704	Pop 2: 0	0	0,296	
AP.08C2	Pop1: 0,034	Pop 2: 0	0	0,965	***

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 6: Population information model vrednosti za zaznane križance pri setu 35 markerjev.

AP.086J	Pop1: 0,748	Pop 2: 0	0	0,252	
CT.0YKM	Pop2: 0,9	Pop 1: 0	0	0,1	
AH.02UT	Pop2: 0,875	Pop 1: 0	0	0,125	
AH.02X0	Pop2: 0,136	Pop 1: 0	0	0,864	**
AP.07XA	Pop2: 0,77	Pop 1: 0	0	0,23	

Tako je na primer pri vzorcu AP.0851 verjetnost, da gre za volka 72,8 %, ter 0 %, da gre za psa. Analiza za dve generaciji nazaj kaže, da ima AP.0851 27,2 % verjetnost, da gre za povratnega križanca. Po tem sklepamo, da gre verjetno za povratnega križanca kasnejše generacije, vendar pa s to metodo ne moremo iti preko dveh generacij nazaj.

Vzorec AP.08AM je z verjetnostjo 94,2 % dodeljen v populacijo volka. S prejšno metodo smo ga zaznali kot križanca, s to pa ga uvrščamo med volkove. Ker vzorcev ne moremo analizirati za generacije povratnih križancev po BW1 (prva generacija), lahko le domnevamo, da gre povratnega križanca kasnejših generacij, ki ga s to metodo ne zaznamo.

Vzorec CT.0YKM je z verjetnostjo 90 % dodeljen med pse ter z verjetnostjo 10 % med povratne križance s psom (prve generacije). Osebek ima verjetno volčjega prednika dalj kot dve generacije nazaj.

Vzorec AH.02X0 je z verjetnostjo 13,6 % dodeljen med pse in z verjetnostjo 86,4 % povratnim križancem s psom. Torej ima 86,4 % verjetnost pasjega prednika dve generacije nazaj.

Preglednica 7: Population information model vrednosti za zaznane križance pri setu 16 markerjev.

Vzorec	Predvidena populacija	Nasprotna populacija	1. gen	2. gen	
AP.07MC	Pop1: 0,649	Pop 2: 0	0	0,351	
AP.0851	Pop1: 0,635	Pop 2: 0	0	0,365	
AP.07PF	Pop1: 0,731	Pop 2: 0	0	0,268	
AP.0802	Pop1: 0,76	Pop 2: 0	0,002	0,238	
AP.08AK	Pop1: 0,983	Pop 2: 0	0	0,017	
AP.07YL	Pop1: 0,967	Pop 2: 0	0	0,033	
AP.07YA	Pop1: 0,766	Pop 2: 0	0,001	0,233	
AP.087M	Pop1: 0,374	Pop 2: 0	0,014	0,612	*
AP.08A6	Pop1: 0,904	Pop 2: 0	0	0,096	
AP.081A	Pop1: 0,948	Pop 2: 0	0	0,052	
AP.0817	Pop1: 0,9	Pop 2: 0	0	0,1	
AP.0875	Pop1: 0,934	Pop 2: 0	0	0,065	
AP.0841	Pop1: 0,559	Pop 2: 0	0,024	0,417	

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Information model vrednosti za zaznane križance pri setu 16 markerjev.

AP.081M	Pop1: 0,945	Pop 2: 0	0	0,055	
AP.084T	Pop1: 0,851	Pop 2: 0	0,001	0,148	
CH.0LLM	Pop1: 0,605	Pop 2: 0	0	0,395	
AP.07X8	Pop1: 0,126	Pop 2: 0	0,006	0,868	**
AP.07TU	Pop1: 0,001	Pop 2: 0,011	0,207	0,782	***
CH.0LLY	Pop1: 0,007	Pop 2: 0,001	0,173	0,819	***
AP.084X	Pop1: 0,001	Pop 2: 0	0,01	0,989	***
AP.0870	Pop1: 0,407	Pop 2: 0	0,002	0,591	*
AP.0886	Pop1: 0,842	Pop 2: 0	0	0,158	
AP.07U1	Pop1: 0,02	Pop 2: 0	0,113	0,867	***
CH.0LLU	Pop1: 0,203	Pop 2: 0	0,011	0,787	**
AP.087F	Pop1: 0,32	Pop 2: 0	0,03	0,651	*
AP.0861	Pop1: 0,465	Pop 2: 0	0	0,535	*
AP.082A	Pop1: 0,899	Pop 2: 0	0	0,101	
AP.0844	Pop1: 0,77	Pop 2: 0	0	0,23	
CH.0LM5	Pop1: 0,855	Pop 2: 0	0,001	0,144	
AP.086Y	Pop1: 0,325	Pop 2: 0	0	0,674	*
AP.087Y	Pop1: 0,819	Pop 2: 0	0	0,18	
CH.0LLP	Pop1: 0,19	Pop 2: 0,004	0	0,806	**
AP.0858	Pop1: 0,082	Pop 2: 0	0,02	0,897	***
AP.0812	Pop1: 0,133	Pop 2: 0	0,185	0,682	**
AP.07Y6	Pop1: 0,761	Pop 2: 0	0	0,239	
AP.07UT	Pop1: 0,06	Pop 2: 0	0	0,94	***
AP.0878	Pop1: 0,534	Pop 2: 0	0,031	0,435	
AP.0838	Pop1: 0,024	Pop 2: 0	0,005	0,971	***
AP.088F	Pop1: 0,725	Pop 2: 0	0	0,275	
AP.0888	Pop1: 0,696	Pop 2: 0	0,001	0,303	
AP.0871	Pop1: 0,973	Pop 2: 0	0	0,027	
AP.087J	Pop1: 0,929	Pop 2: 0	0,001	0,071	
AP.07TX	Pop1: 0,924	Pop 2: 0	0,001	0,075	
AP.07M3	Pop1: 0,148	Pop 2: 0	0,002	0,85	**
AP.0853	Pop1: 0,848	Pop 2: 0	0	0,152	
AP.07U3	Pop1: 0,924	Pop 2: 0	0	0,076	
AP.081T	Pop1: 0,796	Pop 2: 0	0	0,204	
CH.0LM3	Pop1: 0,198	Pop 2: 0	0	0,802	**
AP.0884	Pop1: 0,765	Pop 2: 0	0	0,235	
EE.14Y0	Pop1: 0,947	Pop 2: 0	0	0,053	
AP.08C2	Pop1: 0,694	Pop 2: 0	0,002	0,304	
AH.02UT	Pop2: 0,867	Pop 1: 0	0	0,133	
AH.02X0	Pop2: 0,622	Pop 1: 0	0	0,377	
AP.07XA	Pop2: 0,212	Pop 1: 0,002	0,074	0,713	**

Preglednica 8: *Population information model* vrednosti za zaznane križance pri setu 14 markerjev.

Vzorec	Predvidena populacija	Nasprotna populacija	1. gen	2. gen	
AP.07MC	Pop1: 0,445	Pop 2: 0	0	0,554	*
AP.0851	Pop1: 0,747	Pop 2: 0	0	0,253	
AP.07PF	Pop1: 0,666	Pop 2: 0	0,001	0,333	
AP.0802	Pop1: 0,583	Pop 2: 0	0,014	0,403	
AP.08AK	Pop1: 0,97	Pop 2: 0	0	0,03	
AP.07YL	Pop1: 0,934	Pop 2: 0	0	0,066	
CH.0LLX	Pop1: 0,914	Pop 2: 0	0,001	0,085	
AP.07YA	Pop1: 0,834	Pop 2: 0	0,001	0,165	
AP.087M	Pop1: 0,438	Pop 2: 0	0,012	0,55	*
AP.08AM	Pop1: 0,89	Pop 2: 0	0	0,1	
AP.0817	Pop1: 0,825	Pop 2: 0	0	0,175	
AP.0841	Pop1: 0,553	Pop 2: 0	0,036	0,411	
AP.07X8	Pop1: 0,299	Pop 2: 0	0,007	0,694	**
AP.081F	Pop1: 0,932	Pop 2: 0	0,003	0,065	
AP.07TU	Pop1: 0,04	Pop 2: 0,005	0,088	0,867	***
CH.0LLY	Pop1: 0,098	Pop 2: 0	0,075	0,827	***
AP.084X	Pop1: 0,005	Pop 2: 0	0,014	0,982	***
AP.0870	Pop1: 0,247	Pop 2: 0	0,012	0,741	**
AP.0886	Pop1: 0,918	Pop 2: 0	0	0,082	
AP.07U1	Pop1: 0,038	Pop 2: 0	0,15	0,812	***
CH.0LLU	Pop1: 0,318	Pop 2: 0	0,017	0,666	*
AP.087F	Pop1: 0,759	Pop 2: 0	0,004	0,237	
AP.0861	Pop1: 0,587	Pop 2: 0	0	0,413	
AP.082A	Pop1: 0,91	Pop 2: 0	0	0,09	
AP.0844	Pop1: 0,935	Pop 2: 0	0	0,065	
AP.086Y	Pop1: 0,622	Pop 2: 0	0	0,377	
AP.087Y	Pop1: 0,978	Pop 2: 0	0	0,022	
CH.0LLP	Pop1: 0,511	Pop 2: 0,002	0	0,487	
AP.0858	Pop1: 0,241	Pop 2: 0	0,011	0,748	**
AP.0812	Pop1: 0,267	Pop 2: 0	0,126	0,607	**
AP.07Y6	Pop1: 0,855	Pop 2: 0	0	0,145	
AP.07UT	Pop1: 0,452	Pop 2: 0	0	0,548	*
AP.0878	Pop1: 0,833	Pop 2: 0	0,005	0,162	
AP.0838	Pop1: 0,039	Pop 2: 0	0,009	0,953	***
AP.088F	Pop1: 0,602	Pop 2: 0	0	0,398	
AP.07TX	Pop1: 0,842	Pop 2: 0	0,01	0,148	
AP.07M3	Pop1: 0,089	Pop 2: 0	0,008	0,903	***
AP.0853	Pop1: 0,664	Pop 2: 0	0,002	0,335	
AP.081T	Pop1: 0,874	Pop 2: 0	0	0,126	
CH.0LM3	Pop1: 0,44	Pop 2: 0	0	0,56	*

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 8: *Population information model* vrednosti za križance pri setu 14 markerjev.

AP.0884	Pop1: 0,871	Pop 2: 0	0	0,129
EE.14Y0	Pop1: 0,953	Pop 2: 0	0	0,047
AP.08C2	Pop1: 0,849	Pop 2: 0	0,001	0,15
CT.0YF0	Pop2: 0,964	Pop 1: 0	0	0,036
AH.02UT	Pop2: 0,903	Pop 1: 0	0	0,097
AH.02X0	Pop2: 0,931	Pop 1: 0	0	0,069
AP.07XA	Pop2: 0,544	Pop 1: 0	0,023	0,433

Preglednica 2 *Population information model* vrednosti za zaznane križance pri setu 12 markerjev.

Vzorec	Predvidena populacija	Nasprotna populacija	1. gen	2. gen	
AP.07MC	Pop1: 0,358	Pop 2: 0	0,001	0,641	*
AP.0851	Pop1: 0,588	Pop 2: 0	0	0,411	
AP.0802	Pop1: 0,911	Pop 2: 0	0,002	0,088	
AP.087M	Pop1: 0,386	Pop 2: 0	0,021	0,593	*
AP.0817	Pop1: 0,932	Pop 2: 0	0	0,068	
AP.07X8	Pop1: 0,359	Pop 2: 0	0,006	0,635	*
AP.07TU	Pop1: 0,086	Pop 2: 0,003	0,052	0,859	***
CH.0LLY	Pop1: 0,061	Pop 2: 0	0,165	0,773	***
AP.084X	Pop1: 0,037	Pop 2: 0	0,012	0,951	***
AP.0870	Pop1: 0,837	Pop 2: 0	0,001	0,162	
AP.07U1	Pop1: 0,317	Pop 2: 0	0,046	0,637	*
CH.0LLU	Pop1: 0,207	Pop 2: 0	0,047	0,746	**
AP.087F	Pop1: 0,783	Pop 2: 0	0,004	0,213	
AP.0861	Pop1: 0,639	Pop 2: 0	0	0,361	
AP.0844	Pop1: 0,871	Pop 2: 0	0	0,129	
AP.086Y	Pop1: 0,703	Pop 2: 0	0	0,297	
AP.087Y	Pop1: 0,959	Pop 2: 0	0	0,041	
CH.0LLP	Pop1: 0,584	Pop 2: 0,001	0	0,414	
AP.0858	Pop1: 0,362	Pop 2: 0	0,006	0,632	*
AP.0812	Pop1: 0,65	Pop 2: 0	0,033	0,317	
AP.07UT	Pop1: 0,554	Pop 2: 0	0	0,446	
AP.0878	Pop1: 0,857	Pop 2: 0	0,005	0,139	
AP.0838	Pop1: 0,395	Pop 2: 0	0,002	0,603	*
AP.07TX	Pop1: 0,754	Pop 2: 0	0,033	0,213	
AP.07M3	Pop1: 0,054	Pop 2: 0	0,018	0,927	***
AP.081T	Pop1: 0,801	Pop 2: 0	0,001	0,199	
CH.0LM3	Pop1: 0,27	Pop 2: 0	0,001	0,729	**
AP.0884	Pop1: 0,874	Pop 2: 0	0	0,125	
EE.14Y0	Pop1: 0,916	Pop 2: 0	0	0,084	
AH.02UT	Pop2: 0,866	Pop 1: 0	0	0,134	
AH.02X0	Pop2: 0,942	Pop 1: 0	0	0,058	
AP.07XA	Pop2: 0,685	Pop 1: 0	0,013	0,302	

Preglednica 30: Primerjava uspešnosti izbranih setov markerjev glede na celoten set.

	16	14	12	35
Zaznani križanci	54	46	32	47
Potrjeni križanci	39	36	28	
Napaka tipa I	15	10	4	
Napaka tipa II	8	10	19	
% križancev	0,1619	0,1365	0,0921	0,1397
% skupne napake	0,4259	0,4347	0,7187	
Učinkovitost	0,8298	0,7659	0,5957	
Natančnost	0,7222	0,7826	0,8750	
Skupna uspešnost	0,5993	0,5994	0,5212	

Zaznane križance smo dobili s prvo analizo (*Admixture model*) s programom Structure, nato pa smo z naslednjo analizo (*Prior population information model*) preverili verjetnost prednika iz nasprotne generacije za dve generacije nazaj. Hkrati smo tudi izračunali napako tipa I in II ter ugotovili delež skupne napake. Delež križancev smo računali glede na celotno število volkov v vzorcu (315). Pri izračunu nismo upoštevali povratnih križancev s psom.

Set 35 markerjev je pri mejni vrednosti za volka $q = 0,92$ zaznal 47 križancev, medtem ko so seti 12, 14 in 16 markerjev pri $q = 0,88$ zaznali 32, 46 in 54 križancev. S primerjavo izbranih setov markerjev s setom 35 markerjev smo ugotovili, da ima set 14 markerjev največjo skupno uspešnost in je tako najbolj primeren za prepoznavo križancev. Set 12 markerjev ima sicer največjo natančnost zaznanih križancev, hkrati pa najslabšo učinkovitost.

V nadaljevanju smo se omejili le na primerjavo seta 14 in 35 markerjev.

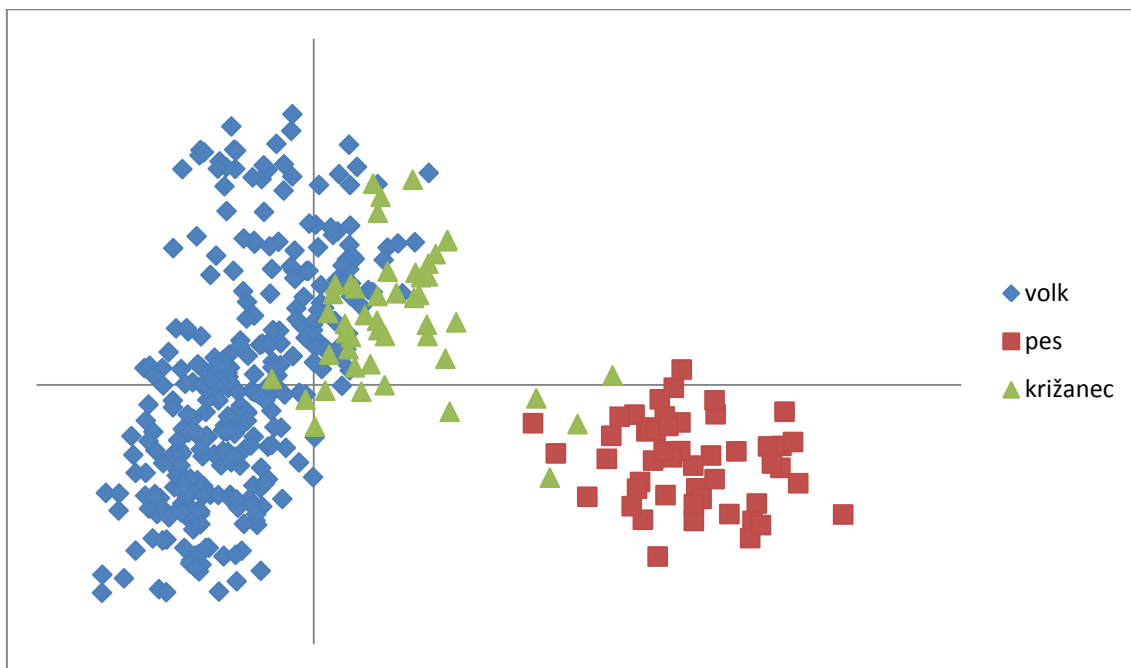
Set 16 markerjev je zgrešil 10 križancev (AP.08AE, CH.0LLM, CH.0LM5, AP.0843, AP.0811, AP.0871, AP.087J, AP.08A4, AP.086J, CT.0YKM) in napačno določil kot križanca 10 osebkov (AP.07MC, AP.07PF, AP.0802, AP.08AK, AP.07YL, CH.0LLX, AP.07YA, AP.087M, AP.0853, AP.081T).

Preglednica 41: Seznam vseh zaznanih križancev (s setom 35 markerjev) z njihovim izvorom in datumom pridobitve vzorca ter razredom križanja, določenim s pomočjo *prior population analize* (v oklepaju je podana verjetnost pripadnosti posameznemu razredu).

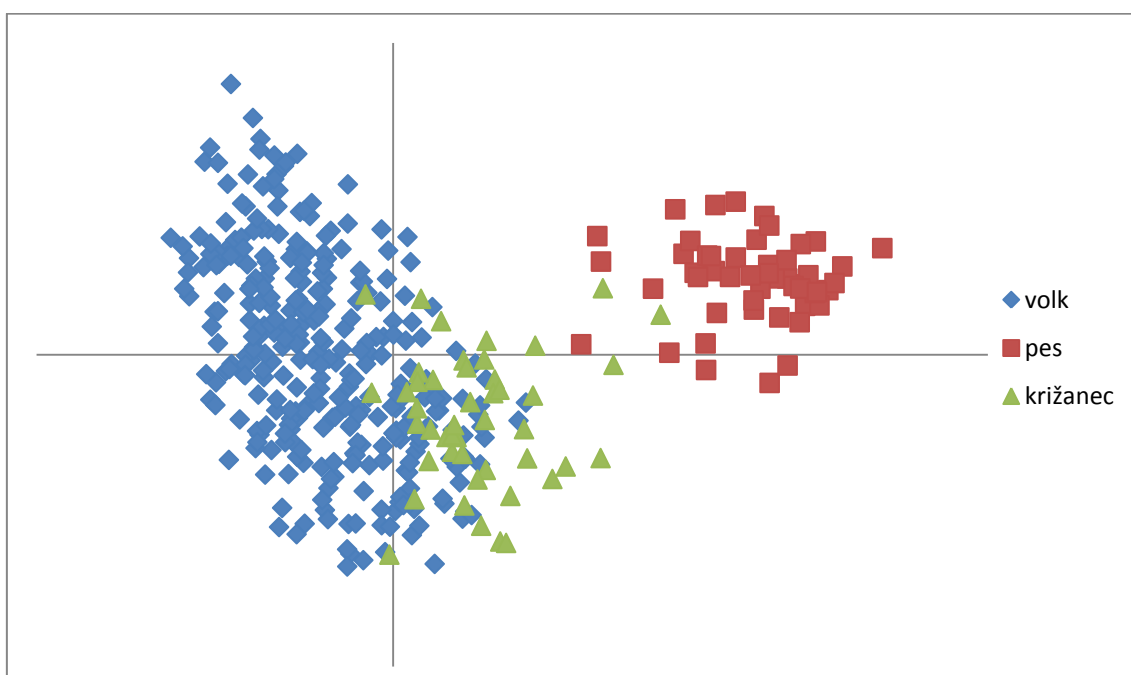
Vzorec	Izvor	Razred križanja	Datum vzorčenja	Vzorec	Izvor	Razred križanja	Datum vzorčenja
AP.0851	Dalmacija	volk (73%)	7.4.2009	AP.0858	Dalmacija	BW1 (99%)	24.12.2008
AP.08AM	Dalmacija	volk (94%)	27.1.2012	AP.0812	Dalmacija	volk (84%)	18.4.2005
AP.0817	Dalmacija	volk (89%)	27.3.2008	AP.0843	Dalmacija	volk (53%)	31.12.2009
AP.0841	Dalmacija	volk (91%)	21.9.2009	AP.07Y6	Dalmacija	BW1 (79%)	14.12.2003
AP.08AE	Dalmacija	BW1 (57%)	15.9.2010	AP.07UT	Dalmacija	BW1 (91%)	24.12.2005
CH.0LLM	Dalmacija	BW1 (99%)	19.9.2005	AP.0811	Dalmacija	BW1 (53%)	17.2.2005
AP.07X8	Dalmacija	BW1 (60%)	24.12.1998	AP.0878	Dalmacija	volk (61%)	27.10.2010
AP.081F	Dalmacija	BW1 (97%)	31.12.2007	AP.0838	Dalmacija	BW1 (100%)	12.1.2009
AP.07TU	Dalmacija	BW1 (73%)	19.1.2001	AP.088F	Dalmacija	BW1 (75%)	16.11.2010
CH.0LLY	Dalmacija	BW1 (100%)	4.1.2013	AP.0871	Hrvaška	BW1 (89%)	15.11.2010
AP.084X	Dalmacija	BW1 (100%)	1.5.2009	AP.087J	Hrvaška	volk (75%)	30.1.2011
AP.0870	Dalmacija	BW1 (100%)	29.10.2010	AP.07TX	Hrvaška	volk (83%)	14.12.2002
AP.0886	Dalmacija	BW1 (100%)	26.2.2011	AP.07M3	Lika	volk (89%)	22.6.2012
AP.07U1	Dalmacija	BW1 (97%)	15.7.2003	AP.08A4	Lika	BW1 (78%)	1.3.2011
CH.0LLU	Dalmacija	BW1 (100%)	17.1.2006	CH.0LM3	Lika	BW1 (87%)	14.2.2013
AP.087F	Dalmacija	BW1 (100%)	27.10.2010	AP.0884	Lika	volk (83%)	31.10.2011
AP.0861	Dalmacija	BW1 (100%)	28.11.2012	EE.14Y0	Slovenija	volk (70%)	31.5.2013
AP.082A	Dalmacija	BW1 (97%)	27.2.2006	AP.08C2	Slovenija	BW1 (97%)	29.1.2012
AP.0844	Dalmacija	BW1 (70%)	8.12.2009	AP.086J	Slovenija	volk (75%)	11.10.2012
CH.0LM5	Dalmacija	BW1 (93%)	25.1.2013	CT.0YKM	Slovenija	pes (90%)	21.3.2010
AP.086Y	Dalmacija	BW1 (97%)	11.1.2010	AH.02UT	Slovenija	pes (88%)	
AP.087Y	Dalmacija	BW1 (96%)	23.1.1998	AH.02X0	Slovenija	BD1 (86%)	
CH.0LLP	Dalmacija	BW1 (98%)	17.3.2012	AP.07XA	Slovenija	pes (77%)	7.3.2011
AP.0888	Dalmacija	volk (90%)	24.1.2010				

* z izrazom Hrvaška Hrvaška je mišljeno območje Hrvaške z izjemo Dalmacije, Like in Gorskega Kotarja, ki so v raziskavo vključene kot samostojne prostorske enote.

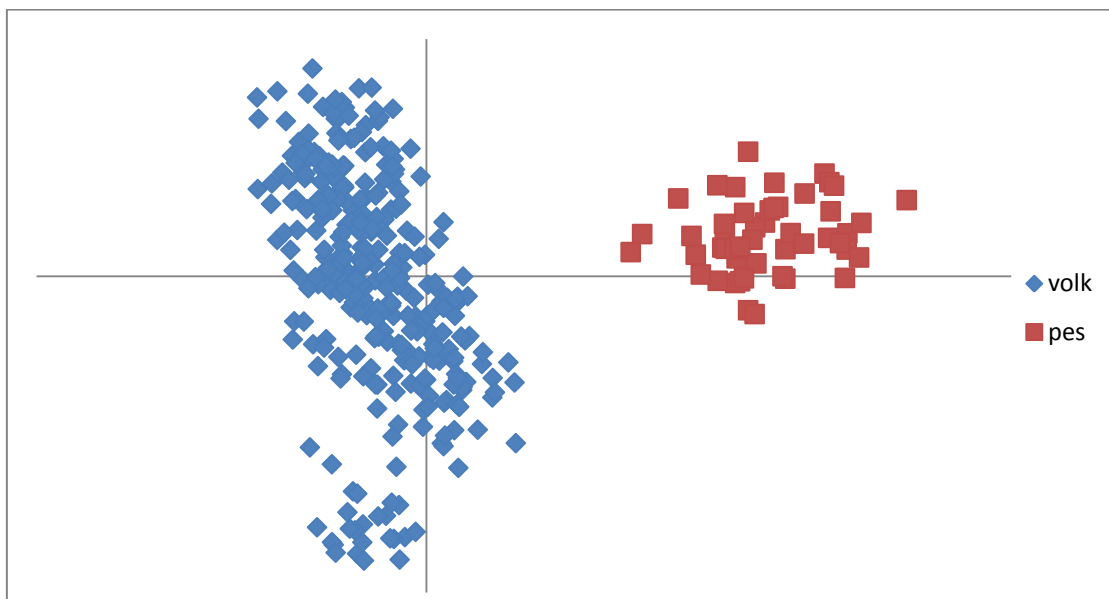
V naši nalogi smo pri analizi *prior population information* preverjali poreklo ("ancestry") osebkov le za dve generaciji nazaj (F1 križanec ter povratni križanec). Za to smo se odločili, ker pri setu 35 markerjev kar 20 % povratnih križancev druge generacije (BW2) dodelimo med volkove, medtem ko zaznamo vse povratne križance prve generacije (BW1). Pri setu 14 in 16 markerjev je napaka še večja. V kolikor bi imeli več ali bolj informativne markerje, bi lahko analizirali poreklo za več generacij nazaj. Tako lahko za vse križance, ki jih *prior population information model* označi kot volka, trdimo, da jih s trenutnim številom markerjev ne moremo zagotovo potrditi kot križance oziroma gre lahko za povratne križance kasnejših generacij.



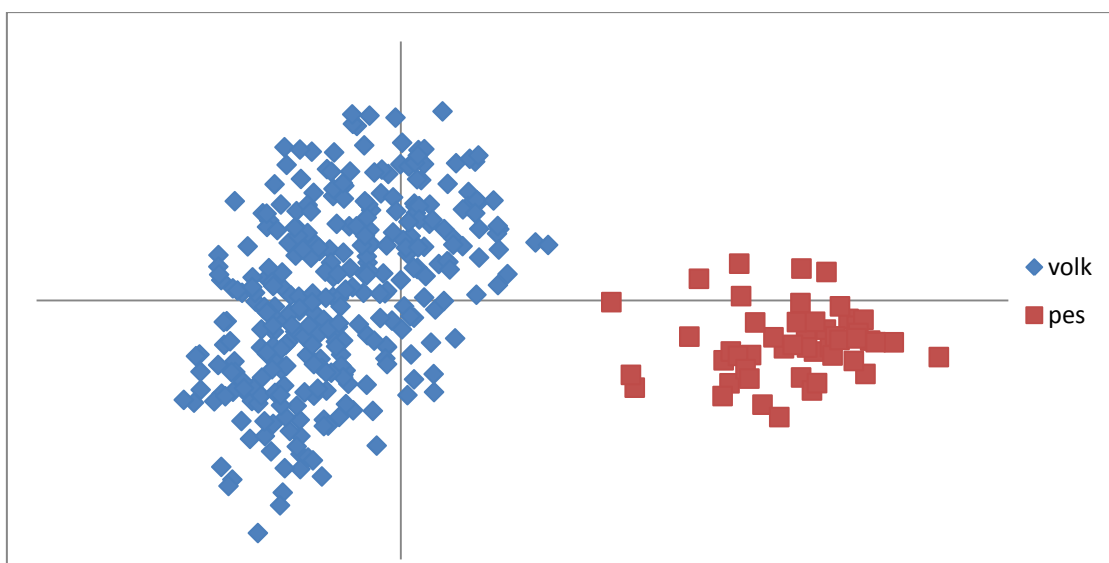
Slika 4: PCoA za set 35 markerjev.



Slika 5: PCoA analiza za 14 markerjev.



Slika 6: Prikaz grupiranja volka in psa (brez križancev) za 35 markerjev s pomočjo PCoA analize.



Slika 7: Prikaz grupiranja volka in psa (brez križancev) za 14 markerjev s pomočjo PCoA analize.

Preglednica 52: Primerjava vrednosti obeh setov markerjev

	35 markerjev		14 markerjev	
	VOLK	PES	VOLK	PES
N_a	7,314 (0,347)	7,971 (0,500)	7,000 (0,565)	7,214 (0,990)
H_o	0,672 (0,020)	0,601 (0,022)	0,647 (0,040)	0,568 (0,043)
H_e	0,698 (0,018)	0,719 (0,020)	0,664 (0,037)	0,672 (0,042)
F_{st}	0,040 (0,009)	0,165 (0,021)	0,030 (0,013)	0,156 (0,044)
N_{pa}	0,486 (0,138)	1,514 (0,302)	0,429 (0,137)	1,571 (0,453)

*N_a (število alelov na lokus), H_o (opažena heterozigotnost), H_e (pričakovana heterozigotnost), F_{st} (fiksacijski indeks), N_{pa} (število privatnih alelov).

* V oklepaju je vrednost standardne napake.

4.4 PREDLAGANI MULTIPLEKS

Preglednica 6: Predlagan multipleks glede na rezultate programa Multiplex Manger.

	Multipleks 1	Multipleks 2
FAM	CPH22	AHTk211 CPH5 CPH9 REN162C04 REN54P11
VIC	AHT137	FH2096
NED	CPH6	FH2137 REN169D01
PET	C20.253 VWF	CPH4
	Povprečna temperatura: 55,2°C	Povprečna temperatura: 58,1°C

Multipleks smo sestavljali s programom Multiplex Manager (Holleley in Geerts, 2009).

5 RAZPRAVA

Eden od problemov, na katere smo naleteli pri izbiri mejne q vrednosti, ki bi jo uporabili za ločevanje med volkom in psom, je bila napaka tipa I in II. Napaka tipa I (lažno pozitivna vrednost) je napaka, ko zavrneemo ničelno domnevo, kadar je ta resnična. Napaka tipa II (lažno negativna vrednost) pa je napaka, ko ne zavrneemo ničelne domneve, kadar ta ni resnična. V našem primeru bi tako čistega volka označili kot križanca (napaka tipa I) oziroma križanca kot čistega volka (napaka tipa II). V nalogi smo verjetnost tega testirali s pomočjo naše simulirane baze osebkov (W, D, WDH, HC, BW1, BW2, BD1, BD2), kjer so bili posamezni razredi sestavljeni iz čistih osebkov oziroma križancev različnih stopenj.

Z nadaljnjo analizo smo nato preverili, koliko osebkov znotraj posameznega razreda določimo pravilno (torej v razred, kamor dejansko spadajo), ter koliko jih dodelimo napačnemu razredu. Pri tem so nas predvsem zanimali čisti volkovi, ki smo jih napačno določili kot križance, ter križanci, ki so bili prepoznani kot čisti volkovi. Višjo q vrednost, kot smo izbrali, manj križancev smo zgrešili, vendar pa smo na ta račun med križance tudi dodelili več volkov. Ko pa smo vzeli nižje q vrednosti, smo pravilno določili večino volkov, vendar pa smo hkrati zgrešili več križancev. Tako gre pri odločitvi za kompromis med natančnostjo in učinkovitostjo oziroma je le-ta odvisna od tega, kaj nam je bolj pomembno. Ker je bil naš cilj oblikovati set markerjev, ki bi nam omogočil čim boljše zaznavo križancev, nam je bila učinkovitost bolj pomembna od natančnosti. Pri tem je potrebno upoštevati tudi, da je križanec, ki bi ga po analizi uvrstili med volkove, povratni križanec višje generacije, ki nima veliko pasjih alelov.

Pri iskanju najboljšega seta markerjev za prepoznavo križancev iz neinvazivnih vzorcev smo glede na to, da je bilo 35 markerjev najvišje število, ki ga imamo trenutno na voljo, križance, ki jih je zaznal ta set, vzeli kot pravilno določene in glede na njih primerjali uspešnost ostalih setov. Naš cilj je bil uporabiti čim manjše število markerjev, ki še omogoča zanesljivo primerjavo, zato smo primerjali tri različne sete: 12, 14 in 16 markerjev. Pokazalo se je, da je set 14 markerjev najboljši, kar je presenetljivo, saj smo pričakovali, da bo več markerjev povečalo uspešnost prepoznave.

Izbrani set 14 markerjev je trenutno najboljši set, ki ga lahko oblikujemo za testiranje neinvazivnih vzorcev. Vanj smo vključili 12 markerjev, ki imajo najvišjo F_{st} vrednost, in dva markerja z najnižjo P_I vrednostjo. Izbrani set bi lahko še izboljšali, če bi namesto seta 35 markerjev uporabili večje število markerjev. Tiste novo dodane markerje, ki imajo višjo F_{st} vrednost in bi po velikosti ustrezali našim zahtevam, bi lahko uporabili za nadomestitev že izbranih slabših markerjev oziroma markerjev z nižjo F_{st} vrednostjo. Izbrani set temelji na frekvenci alelov obeh skupin. Ker se frekvence alelov zaradi genetskega zdrsa (ki je hitrejši v majhnih populacijah) sčasoma spreminjajo, bi bilo dobro čez nekaj časa ponoviti analizo in preveriti, ali je izbranih 14 markerjev še vedno najbolj ustreznih.

Do križanja med volkom in psom zelo verjetno prihaja skozi celotno zgodovino (Muñoz-Fuentes in sod., 2010), vendar le občasno in v manjšem številu. Problem predstavlja tam, kjer se to dogaja v večjem številu in pogosto oziroma kjer so volčje populacije manjše in poseljujejo območja, ki mejijo na urbanizirana območja. Večina raziskav se strinja, da do križanja prihaja na robnih območjih, kjer je prisoten konflikt med volkom in človekom. Križanje naj bi še posebej velik problem predstavljalo v Španiji, na Portugalskem, v Italiji, Grčiji in Izraelu (Torres in Fonseca, 2016). Vsa ta območja imajo veliko število potepuških oziroma prostoživečih psov. Uradnih podatkov sicer ni na voljo, vendar pa naj bi bilo po nekaterih ocenah (ESDAW, 2016) v Španiji 800.000 prostoživečih psov, na Portugalskem 250.000, v Grčiji 500.000 ter v Italiji 600.000. Za Slovenijo je podana ocena približno 40.000 prostoživečih psov, za Hrvaško pa 150.000. Večje število prostoživečih psov tako povečuje verjetnost križanja, sploh na območjih, kjer prihaja tudi do odstrela volkov. Dodatno možnost za križanje predstavljajo tudi psi, ki jih uporabljajo za varovanje drobnice, še posebej na območjih, kjer so le-ti bolj prepuščeni sami sebi in je stik s človekom redek, saj si morajo hrano iskati sami. Tako pogosteje prihajajo v stik z volkovi (Kopaliani in sod., 2014).

Med vzorci psov, ki smo jih uporabili v tej nalogi, lahko opazimo tudi štiri osebke, ki imajo višjo q vrednost kot ostali osebki.

Preglednica 7: Štirje psi, ki po q vrednostih izstopajo iz skupine.

CT.0YKM	0,109 (0,000-0,343)
AH.02UT	0,198 (0,001-0,371)
AH.02X0	0,263 (0,112-0,424)
AP.07XA	0,193 (0,002-0,357)
D	0,030 (0,000-0,100) min q: 0,012 max q: 0,134
BD1	0,0222 (0,097-0,361) min q: 0,033 max q: 0,403

V nadaljni analizi (*prior population information*) le enega (AH.02X0) z večjo verjetnostjo dodelimo v skupino povratnih križancev s psom (BD1), in sicer 86,4 %. Preostali so z večjo verjetnostjo uvrščeni med pse: CT.0YKM (90 %), AH.02UT (87,5 %) in AP.07XA (77 %). Vzorec AH.02X0 je bil skupaj z vzorcem AH.02UT odvzet od dveh psov pri istem lastniku v okviru škodnega primera na žrebičku. Nimamo podatka ali gre za sorodna osebka.

Pri psih je genetska pestrost veliko večja kot pri volku, kar je verjetno posledica več dogodkov domestifikacije in introgresije v njihovi zgodovini (Godinho in sod., 2011).

Razpon q vrednosti znotaj posameznega razreda je zato širši in so osebkki z q vrednostjo 0,100 ali več še vedno znotraj razreda psov. Mejne vrednosti posameznih razredov križancev, ki smo jih določili s pomočjo simulacije, so lahko pri psih širše, kot smo jih podali v tej nalogi. Za simulacijo smo namreč za čistega psa (tako kot za volka), izbrali le osebkke s q vrednostjo 0,990, s čimer smo že v začetku zožili razpon vrednosti. Tako bi lahko bili osebkki, za katere se zdi, da po q vrednosti izstopajo, le posledica večje genetske pestrosti in ne introgersije volčjih genov v populacijo.

Odkrivanje križancev z volkom s pomočjo tkivnih vzorcev je oteženo, saj je živali za pridobitev vzorca potrebno ujeti, kar pa je pri divjih živalih, ki se človeka izogibajo, dolgotrajen in pogosto neuspešen proces, ali pa je žival že odstranjena iz populacije v primeru smrti. Z uporabo neinvazivnih vzorcev lahko hitreje in z manj napora pridobimo več vzorcev. Tako lahko skoraj sproti spremljamo stanje volčjih tropov, v primeru odkritja križanca pa lahko sklepamo, ali gre za migranta ali osebk, rojen v katerem izmed »domačih« tropov.

V Preglednici 15 so prikazani zaznani križanci, število volkov s posameznega območja, stopnja križanja in delež križanja. Tri od zaznanih križancev (Preglednica 5) bi lahko glede na q vrednost uvrstili med križance prve generacije (WDH): AP.07TU ($q = 0,580$, CI 0,424-0,732), CH.0LLY ($q = 0,631$, CI 0,471-0,782) in AP.084X ($q = 0,617$, CI 0,462-0,765). Glede na simulirane podatke bi lahko te tri vzorce uvrstili med križance prve generacije (WDH) z višjimi q vrednostmi ali pa med povratne križance prve generacije (BW1) z nižjimi q vrednostmi. Interval zaupanja jih ravno tako uvrsti med omenjene razrede križancev. Analiza *prior population information* za dve generaciji nazaj pa vse tri uvrsti med povratne križance (Preglednica 6). Vzorec AP.07TU ima tako 24,6 % verjetnost za križanca prve generacije in 73,2 % verjetnost za povratnega križanca prve generacije. Pri vzorcih CH.0LLY in AP.084X je bila verjetnost za križanca prve generacije še manjša, in sicer 0,01 % in 0,02 %, med povratne križance pa sta bila oba uvrščena z verjetnostjo več kot 99 %. Glede na dobljene rezultate lahko tako sklepamo, da gre zelo verjetno za povratne križance in ne F1 križance.

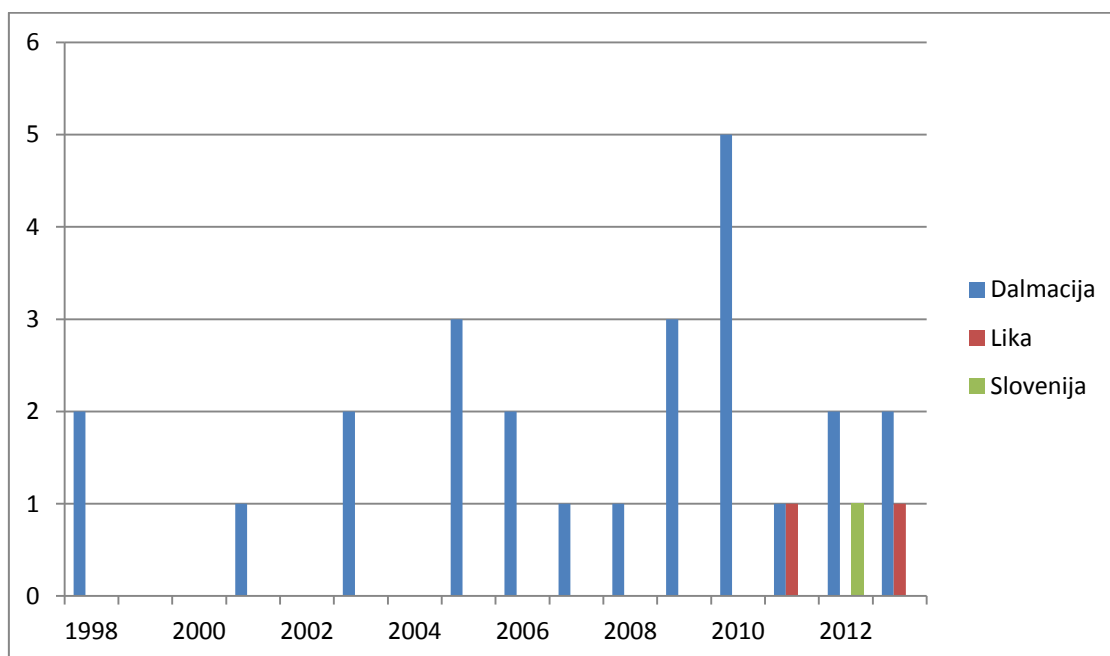
Preglednica 8: Prikaz rezultatov in deleža križanja.

	SLOVENIJA	GORSKI KOTAR	LIKA	DALMACIJA	HRVAŠKA**
Število volkov	144	62	44	99	214
Križanci F1	0	0	0	0	0
Povratni križanci	3(1)*	0	4(2)	33 (25)	40 (28)
Delež križanja	0,021 (0,007)*	0	0,091 (0,045)	0,333 (0,253)	0,187 (0,131)

Vrednosti v oklepajih upoštevajo rezultate *prior population information* analize, s katero smo potrdili nekatere od osebkov za katere smo po prvi analizi sklepali, da gre za križance.

*V primeru, da so vsi trije križanci, ki smo jih zaznali v Sloveniji, migranti s Hrvaške, je frekvenca križanja pri nas 0.

**Z izrazom Hrvaška zajemamo celotno območje vzorčenja (vključno z Liko, Gorskim Kotarjem in Damacijo) ter vsebuje vse volkove in križance s tega območja. Poleg volkov iz treh poimenovanih regij je bilo v raziskavo vključenih še 9 volkov z preostalega območja Hrvaške. Trije osebki so imeli nižje q vrednosti, ki so nakazale na možnost križanja, z nadaljno analizo pa smo lahko pri enem križanje potrdili.



Slika 8: Prikaz zaznanih križancev po letih vzorčenja.

Ker ne zaznavamo križancev prve generacije (F1) z območja Hrvaške, lahko sklepamo, da gre le za križanje med potomci križancev (povratnimi križanci) in volkovi, lahko pa le niso bili povzorčeni in so se neodkriti razmnoževali naprej. Z uporabo neinvazivnega vzorčenja

bi lahko povzorčili celotno območje in ugotovili, ali so prisotni tudi F1 križanci. Zanimivo bi bilo ugotoviti tudi sorodstvene povezave med že odkritimi križanci. Na podlagi tega bi lahko ocenili tudi kolikokrat je prišlo do križanja med volkom in psom. Zanimivo je, da so vsi križanci na območju Slovenije povratni križanci. Glede na to, da so naši volkovi dobro povzorčeni, prve križance pa smo opazili šele leta 2012, lahko sklepamo, da gre za migrante z območja Hrvaške. Možno je tudi, da so se F1 križanci izognili odstrelu in smo jih opazili šele sedaj, ko je že prišlo do introgresije v volčjo populacijo, vendar je glede na število volkov in vzorcev, ki jih zberemo vsako leto, to malo verjetno.



Slika 9: Prikaz vseh zaznanih križancev na območju Slovenije in Hrvaške.

Z rumeno so označeni križanci, pri katerih smo pri prvi Structure analizi (admixture model) zaznali nižjo q vrednost (pod 0.88 pri setu 35 markerjev), z naslednjo analizo (prior population information) pa nismo mogli zagotovo potrditi statusa križanca.

V kolikor so trije zaznani križanci res z ozemlja Slovenije, je stopnja križanja v Sloveniji 2 % oziroma 0,7 %, v kolikor pa gre za migrante, je stopnja križanja pri nas 0. Tudi v Gorskem Kotarju je stopnja križanja 0. Z območja Like je bilo 9 % oziroma 4,5 % vzorcev križancev, največ križancev pa smo imeli z območja Dalmacije, kar 33 oziroma 25,3 %. V povprečju je tako stopnja križanja za Hrvaško 18,7 % oziroma 13 %. V primerjavi z ostalimi državami v Evropi je stopnja križanja na Hrvaškem precej višja. Raziskava na bolgarskih volkovi (Moura in sod., 2014) poroča o 10 % stopnji križanja. Kopaliani in

sod. (2014) poročajo o 13 % stopnji križanja na območju Kavkaza. S Portugalske poročajo o 4 % stopnji križanja (Godinho in sod., 2011), medtem ko je v Italiji zaznana 5-10 % stopnja križanja (Randi, 2008; Verardi in sod., 2006; Randi in Lucchini, 2002).

Pomanjkanje križancev prve generacije (F1) z območja Dalmacije je presenetljivo glede na število povratnih križancev, ki smo jih zaznali. Ena razlaga za to stanje je lahko "*gene surfing*". Volkovi so se na območje Dalmacije razširili med in po zadnji (domovinski) vojni, ko so se ljudje umikali z območja. Poleg redkih volkov je bilo veliko tudi psov, ki so jih lastniki pustili za seboj. Če je med prvimi volkovi ("*founderji*") in okoliškimi psi prišlo do nekaj hibridizacijskih dogodkov, bi lahko zaradi tega dobili veliko genotipov povratnih križancev. Ker je bila populacija volka majhna, je lahko prihajalo do parjenja F1 in BC osebkov, kar bi preprečilo razredčitev pasjih genov in tako zvišanje *q* vrednosti. Tako bi lahko na tem območju nastal roj križancev, ki se pari med seboj. Po vojni so se ljudje začeli vračati in je tako območje postalo manj prehodno za volkove, povečala pa se je smrtnost. Tako bi se lahko nekaj posameznih dogodkov križanja še danes poznalo v velikem številu povratnih križancev, kljub temu, da so izvorni F1 osebki poginili že dve desetletji nazaj.

Hrvaška subpopulacija volkov je ravno tako kot slovenska del Dinarsko-Balkanske populacije. Večina volkov je na območju Like, Gorskega Kotarja in Dalmacije, in sicer v regijah (županijah) Lika-Senj, Primorje-Gorski Kotar, Šibenik-Knin, Split-Dalmacija, Zadar in Dubrovnik-Neretva (Wolf management plan for Croatia, 2005). Največ konfliktov med volkom in človekom se zgodi ravno v Dalmaciji, od koder smo zaznali največ križancev. Lika in Gorski Kotar sta večinoma gorski regiji z veliko gozdnate površine (50-70 %) in nizko gostoto prebivalstva, zaradi česar je stopnja konfliktov nizka (Bath in Majič, 2001). V Dalmaciji je veliko ekstenzivnih rejcev, gostota naravnega plena pa je manjša kot v Liki ali Gorskem Kotarju. Raziskava prehrane s pomočjo iztrebkov na območju Gorskega Kotarja in Dalmacije je pokazala, da večji del prehrane volkov v Gorskem Kotarju predstavlja naravni plen (srnjad, jelenjad in divji prašič), kar 84,2 %. V iztrebkih volkov z območja Dalmacije pa so v večini (73,4 %) našli dlake domačih živali, od tega je bilo 36 % kozjih dlak in 22 % dlak goveda (Report on the status of the wolf population in Croatia in 2014, 2014). Volkovi so se prehranjevali tudi s klavniškimi odpadki ter mrtvimi živalmi. Po podatkih iz omenjenega poročila je bilo leta 2013 na območju Dalmacije, kar 50% vse drobnice in živine na Hrvaškem. Na tem območju je tudi največ škod po volku (97,9 % vseh škod na Hrvaškem, podatek za leto 2013). Na območju Like je bilo istega leta 1,7 % vseh škod, v Gorskem Kotarju pa škod ni bilo.

Raziskave odnosa javnosti do volka na Hrvaškem v različnih obdobjih so pokazale spreminjanje mnenja ljudi s številčnostjo volka. Prve raziskave, narejene v obdobju, ko se je število volkov zmanjševalo, kažejo, da je javnost med 80. in 90. leti prejšnjega stoletja postala bolj tolerantna do volkov (Radišić in sod., 1994 cit. po Majič in Bath, 2010). Z

opuščanjem kmetijske dejavnosti in seljenjem v urbana središča se je število volkov pričelo zviševati, hkrati pa se je povečalo tudi število ljudi, ki so pokazali negativen odnos do prisotnosti volka. Raziskavi, izvedeni leta 1999 in 2003 (Majić in Bath, 2010), sta pokazali, da se lahko mnenje javnosti spremeni v zelo kratkem času. V raziskavo so vključili naključno izbrane prebivalce iz Gorskega Kotarja, Like in Dalmacije, anketiranci pa so bili starejši od 14 let. V obeh vprašalnikih so opazovali znanje anketirancev o volkovih, odnos do volkov in upravljaljskih strategij ter izkušnje z volkovi glede na starost anketirancev. Med obema raziskavama je hrvaška vlada izvedla program za lajšanje škode volkov, znotraj katerega so rejcem donirali električne mreže in pse za varovanje čred, hkrati pa so v Liki in Dalmaciji organizirali tudi delavnice in seminarje. Rezultati druge raziskave kažejo na premik odnosa anketirancev iz negativnega mnenja v bolj nevtralnega (zmanjšalo se je število ljudi, ki so zagovarjali zaščito volkov ter teh, ki so zagovarjali kontrolo številčnosti volkov).

Veliko število konfliktov v Dalmaciji se odraža v majhni toleranci ljudi do volkov. To vpliva na povečano smrtnost volkov na tem območju, tako z nelegalnim odstrelom kot zastrupljanjem živali. Zaradi teh dejavnikov, skupaj z velikim številom prostoživečih psov, je verjetnost za križanje veliko večja kot v Sloveniji.

Trenutno ni nobenega načrta, ki bi obravnaval tematiko križancev in navajal ustrezne ukrepe, ki bi jih bilo potrebno upoštevati ob odkritju njihove prisotnosti. Večina držav, kjer se križanci pojavljajo, prakticira odstranitev le-teh, večinoma z usmrčitvijo, za rešitev problema pa bi bilo potrebno storiti več. Na robnih območjih oziroma kjer je populacija volka manj številčna bi bilo potrebno trope redno spremljati s pomočjo neinvazivnega genetskega vzorčenja. Še bolj pomembno bi bilo, da se izobrazi in obvešča ljudi na teh območjih, da bi zlasti v obdobju parjenja volkov omejili gibanje svojih psov, na območjih z velikim številom prostoživečih psov pa bi bilo treba omogočiti cenejšo sterilizacijo živali.

6 SKLEPI

Raziskave križancev med psom in volkom iz Evrope ugotavljajo, da križanci prve generacije (F1) niso sterilni ter da prihaja do integracije pasjih genov v volčje populacije. Podatkov o nižjem fitnessu križancev zaenkrat ni, vendar pa je to težko oceniti, saj se križanci iz narave odstranjujejo. Ravno tako ni podatkov o razliki v razmnoževalnem obdobju ali preživetju legel križancev.

Neinvazivno vzorčenje in nato testiranje osebkov s tveganih ("*high risk*") območij omogoči hitro zaznavo križancev in ukrepanje. S setom lokusom, ki smo ga razvili v tej nalogi, lahko hitro analiziramo vzorce, hkrati pa smo še vedno sposobni prepoznati posamezne osebkke. S setom 14 markerjev lahko prepoznamo vse križance prve in druge generacije, uspešnost prepoznave povratnih križancev prve in druge generacije pa je 90 % in 56 %.

Potrdili smo križance z območja Dalmacije in Like, za križan osebek, ki je bil najden na območju Slovenije pa se ne ve ali gre za migranta ali domačega volka. Zaradi možne migracije posameznih osebkov (odrasli mladiči iz tropov, za katere vemo, da je eden od staršev križanec ali pa v primeru razpada tropa) je stanje potrebno še naprej spremljati in testirati vzorce. Glede na to, da do križanja večinoma prihaja na robnih območjih populacij volka, bi bilo smiselno večino truda usmeriti v ta območja, hkrati pa bi bilo potrebno razmisliti tudi o smiselnosti odstrela na robnih območjih, saj se po razpadu tropa poveča verjetnost za križanje (Caniglia in sod., 2014). Predvsem pa bi bilo treba na teh območjih rešiti problem prostoživečih psov. Odstranjevanje križancev je zgolj blaženje problema – potrebno je zmanjšati število prostoživečih psov (Lorenzini in sod., 2014).

Potrebno bi bilo tudi, da se določi, kdaj oziroma po koliko generacijah povratnega križanja lahko osebek oziroma njegove potomce obravnavamo kot čiste volkove. Ta dogovor bi morali sprejeti in upoštevati tudi vsi ostali laboratoriji, ki se ukvarjajo s to tematiko.

7 POVZETEK

Križanje med volkovi in psi je v Evropi še večinoma redek primer, s stopnjo križanja do 5 %, a z nekaj vročimi točkami, kjer se križanje pojavlja v večjem deležu. Do križanja naj bi prišlo v zadnjih dveh stoletjih. Dosedanje raziskave kažejo na spolno asimetričnost pri parjenju, saj je večina potomcev rezultat parjenja med samico volka in samcem psa, z le nekaj izjemami. Z razvojem molekularnih markerjev in metod je prepoznavanje križancev lažje, zato se je tudi povečalo število raziskav na tem področju.

V nalogi smo primerjali tri različne sete in izbrali najboljšega v primerjavi s setom vseh 35 markerjev. Za najboljšega se je izkazal set 14 markerjev, s katerim lahko s 77 % uspešnostjo in 78 % natančnostjo prepoznavamo križance. Kot mejno vrednost, s katero ločujemo med volkom in psom, smo izbrali $q = 0,880$. Z njo prepoznamo 97 % vseh volkov, vse križance prve in druge generacije ter 90 % in 56 % povratnih križancev z volkom prve in druge generacije. Izmed 411 analiziranih osebkov (358 volkov in 53 psov) iz Slovenije in Hrvaške iz obdobja 1998–2015 smo odkrili 43 križancev, od tega 33 iz Dalmacije, štiri iz Like in tri iz preostale Hrvaške ter tri iz Slovenije. Z nadaljno analizo smo lahko potrdili 29 križancev, 25 iz Dalmacije, dva iz Like, enega iz preostale Hrvaške ter enega iz Slovenije.

Ker naš izbrani set markerjev temelji na alelnih frekvencah, te pa se sčasoma v populaciji spreminjajo, bi bilo potrebno čez nekaj časa ponovno testirati primernost našega seta. V primeru, da bi se frekvence močno spremenile, bi bilo potrebno ponovno oblikovati nov set markerjev. Ravno tako bi v primeru dodajanja novih markerjev k celotnemu setu 35-ih bilo smiselno ponoviti analizo, če je morda kateri od novih markerjev bolj primeren od izbranih, in temu ustrezno prilagoditi končni set.

8 VIRI

- Allendorf F. W., Leary R. F., Spruell P., Wenburg J. K. 2001. The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 613-622
- Andersone Ž., Lucchini V., Randi E., Ozoliņš J. 2002. Hybridization between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammalian Biology*, 67: 79-90
- Asadi Aghbolaghi M., Rezaei H. R., Scandura M., Kaboli M. 2014. Low gene flow between Iranian Grey Wolves (*Canis lupus*) and dogs documented using uniparental genetic markers. *Zoology of the Middle East*, 60: 95-106
- Bath A., Majić A. 2001. Human dimensions in wolf management in Croatia. *Manuskript i nettversjon, Large Carnivore Initiative for Europe*.
http://www1.nina.no/lcie_new/pdf/635011364836702351_Bath%20LCIE%20Croatian%20attitudes.pdf (16. 9. 2016)
- Boitani L. 1982. Wolf management in intensively used areas of Italy. V: *Wolves of the world*. Harrington F. H., Paquet P. C. (ur.). Park Ridge, Noyes Publications: 158-172
- Boitani L. 1984. Genetic considerations on wolf conservation in Italy. *Bolletino di Zoolgia*, 51: 367-373
- Boitani L. 2000. Action Plan for the conservation of the wolves (*Canis lupus*) in Europe. *Nature and environment*, 113: 1-85
- Boitani L. 2014. Conceptual and methodological issues in studying and managing hybridization between wild and domestic species. V: *International Conference on mammalian species hybridization*, Grosseto, 2 - 4. 11. 2014.
<http://www.ibriwolf.it/en/content/download?page=1> (7. 8. 2016)
- Cadiou E., Neff M. W., Quignon P., Walsh K., Chase K., Parker H. G., VonHoldt B. M., Rhue A., Boyko A., Byers A., Wong A., Mosher D. S., Elkahouloun A. G., Spady T. C., Andre C., Lark K. G., Cargill M., Bustamante C. D., Wayne R. K., Ostrander E. A. 2009. Coat Variation in the Domestic Dog Is Governed by Variants in Three Genes. *Science*, 326: 150-153
- Caniglia R., Fabbri E., Galaverni M., Milanesi P., Randi E. 2014. Noninvasive sampling and genetic variability, pack structure, and dynamics in an expanding wolf population. *Journal of Mammalogy*, 95: 41-59
- Casas F., Mougeot F., Sánchez-Barbudo I., Dávila J. A., Viñuela J. 2012. Fitness consequences of anthropogenic hybridization in wild red-legged partridge

- (*Alectoris rufa*, Phasianidae) populations. *Biological Invasions*, 14: 295-305
- Ciucci P., Lucchini V., Boitani L., Randi E. 2003. Dewclaws in wolves as evidence of admixed ancestry with dogs. *Canadian Journal of Zoology*, 81: 2077-2081
- Coombs J. A., Letcher B. H., Nislow K. H. 2008. Create: A software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Resources*, 8: 578-580
- Ellington E. H., Murray D. L. 2015. Influence of hybridization on animal space use: A case study using coyote range expansion. *Oikos*, 124: 535-542
- ESDAW - European Society of Dog and Animal Welfare
<http://www.esdaw.eu/stray-animals-by-country.html> (20. 6. 2016)
- Genovart M. 2009. Natural hybridization and conservation. *Biodiversity and Conservation*, 18: 1435-1439
- Genovesi P. 2002. National action plan for wolf conservation in Italy (*Canis lupus*). *Quaderni di Conservazione della Natura*, 13: 1-94
- Godinho R., López-Bao J. V., Castro D., Llaneza L., Lopes S., Silva P., Ferrand N. 2015. Real-time assessment of hybridization between wolves and dogs: Combining noninvasive samples with ancestry informative markers. *Molecular Ecology Resources*, 15: 317-328
- Godinho R., Llaneza L., Blanco J. C., Lopes S., Álvares F., García, E. J., Palacios V., Cortés Y., Talegón J., Ferrand N. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20: 5154-5166
- Hindrikson M., Männil P., Ozolins J., Krzywinski A., Saarma U. 2012. Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves. *PLoS One* 7: e46465. doi:10.1371/journal.pone.0046465: 12 str.
- Holley C. E., Geerts P. G. 2009. Multiplex Manager 1.0: A cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques*, 46: 511-517
- Hughes J., Macdonald D. W. 2013. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. *Biological Conservation*, 157: 341-351
- Iacolina L., Scandura M., Gazzola A., Cappai N., Capitani C., Mattioli L., Vercillo F., Apollonio M. 2010. Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: A contribution to the study of wolf-dog hybridization patterns. *Mammalian Biology*, 75: 341-347

- Kobl Müller S., Nord M., Wayne R. K., Leonard J. A. 2009. Origin and status of the Great Lakes wolf. *Molecular Ecology*, 18: 2313-2326
- Kopaliani N., Shakarashvili M., Gurielidze Z., Qurkhuli T., Tarkhnishvili D. 2014. Gene flow between wolf and shepherd dog populations in Georgia (Caucasus). *Journal of Heredity*, 105: 345-353
- Kopelman N. M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N. A., Mayrose I. 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15: 1179-1191
- Kumar S., Subramanian S. 2002. Mutation rates in mammalian genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 803-808
- Kusak J., Majić Skrbinšek A., Huber D., 2005. Home ranges, movements, and activity of wolves (*Canis lupus*) in the Dalmatian part of Dinarids, Croatia. *European Journal of Wildlife Research*, 51: 254-262
- Larsen P. A., Marchán-Rivadeneira M. R., Baker R. J. 2010. Natural hybridization generates mammalian lineage with species characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 11447-11452
- Lehe R., Hallatschek O., Peliti L. 2012. The Rate of Beneficial Mutations Surfing on the Wave of a Range Expansion. *PLoS Computational Biology*, 8: e1002447, doi:10.1371/journal.pcbi.1002447: 13 str.
- Leonard J. A., Echegaray J., Randi E., Vila C. 2013. Impact of hybridization with domestic dogs on the conservation of wild canids. V: *Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation*, Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation. Gompper M. E. (ur.). Oxford, Oxford University Press: 170-184
- Lohmus A. 2001. Status of Large Carnivore Conservation in the Baltic States. Large Carnivore Control and Management Plan for Estonia, 2002-2011. Strassburg, Council of Europe: 53 str.
- Lorenzini R., Fanelli R., Grifoni G., Scholl F., Fico R. 2014. Wolf-dog crossbreeding: "Smelling" a hybrid may not be easy. *Mammalian Biology*, 79: 149-156
- Majić A., Bath A. J. 2010. Changes in attitudes toward wolves in Croatia. *Biological Conservation*, 143: 255-260
- Mallet J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 229-237
- Management plan for the wolf population in Finland. 2005. Helsinki, Publications of Ministry of Agriculture and Forestry Finland: 69 str.

- Massei G., Miller L., Killian G. 2010. Immunocontraception to control rabies in dog populations. *Human-Wildlife Interactions*, 4: 155-157
- Mech D., Botani L. 2003. Wolf social ecology. V: *Wolves. Behavior, Ecology and Conversation*. Mech D., Boitani L. (ur.). Chicago, The University of Chicago Press: 472 str.
- Moura A. E., Tsingarska E., Dabrowski M. J., Czarnomska S. D., Jedrzejewska B., Pilot M. 2014. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: The cautionary case of Bulgarian wolves. *Conservation Genetics*, 15: 405-417
- Muñoz-Fuentes V., Darimont C. T., Paquet P. C., Leonard J. A. 2010. The genetic legacy of extirpation and re-colonization in Vancouver Island wolves. *Conservation Genetics*, 11: 547-556
- Peakall R., Smouse P. E. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295
- Peakall R., Smouse P. E. 2012. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539
- Pearse D. E., Crandall K. A. 2004. Beyond F_{ST}: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, 5: 585-602
- Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6: 847-859
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959
- Randi E. 2011. Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Review*, 41: 99-111
- Randi E. 2008. Detecting hybridization between wild species and their domesticated relatives. *Molecular Ecology*, 17: 285-293
- Randi E., Lucchini V. 2002. Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conservation Genetics*, 3: 31-45
- 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. *Conservation Biology*, 14: 464-473

- Randi E., Lucchini V., Francisci F. 1993. Allozyme variability in the Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Heredity*, 71: 516-522
- Report on the status of the wolf population in Croatia in 2014. 2014. Jeremić J., Štrbenac A. (ur.). Zagreb, State Institute for Nature Protection: 93 str.
- Schwartz M. K., Pilgrim K. L., McKelvey K. S., Lindquist E. L., Claar J. J., Loch S., Ruggiero L. F. 2004. Hybridization between Canada lynx and bobcats: Genetic results and management implications. *Conservation Genetics*, 5: 349-355
- Selkoe K. A., Toonen R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615-629
- Wolf management plan for Croatia. 2005. Štrbenac A. (ur.). Zagreb, State Institute for Nature Protection: 109 str.
- Taberlet P., Waits L. P., Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 323-327
- Torres R. T., Fonesca C. 2016. Perspectives on the Iberian wolf in Portugal: population trends and conservation threats. *Biodiversity and Conservation*, 25: 411-425
- Turnpenny P., Ellard S. 2005. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 12th ed. Edinburgh; New York, Elsevier Churchill Livingstone: 443 str.
- Vähä J. P., Primmer C. R. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*, 15: 63-72
- Verardi A., Lucchini V., Randi E. 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology*, 15: 2845-2855
- Vilà C., Amorim I. R., Rice J. E., Honeycutt R. L., Crandall K. A., Lundeberg J., Wayne R. K. 2009. Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog Carles Vila. *Science*, 276: 1687-1689
- Vilà C., Walker C., Sundqvist A-K., Flagstad Ø., Andersone Z., Casulli A., Kojola I., Valdmann H., Halverson J., Ellegren H. 2003. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity*, 90: 17-24
- Vilà C., Wayne R. K. 1999. Hybridization between wolves and dogs. *Conservation Biology*, 13: 195-198

- Waits L. P., Luikart G., Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: Cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, 10: 249-256
- Wayne R. K., Leonard J. A., Vilá C. 2006. Genetic analysis of dog domestication. V: Documenting domestication: new genetic and archaeological paradigms. Zeder M. A. (ur.). Berkeley, University of California Press: 279-293
- Wilkins A. S., Wrangham R. W., Tecumseh Fitch W. 2014. The “domestication syndrome” in mammals: A unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics*, 197: 795-808
- Wright S. 1949. The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila dr. Raquel Godinho, iz inštituta CIBIO - Research Centre in Biodiversity and Genetic Resources, na Portugalskem, ki me je bila pripravljena sprejeti na Erasmus prakso ter deliti svoje znanje in izkušnje z mano. Hvala za vso pomoč pri pripravi računalniških simulacij, za veliko potrpežljivosti pri razlagah, ki jih je večkrat morala ponoviti in vse dodatne ure za pomoč in svetovanje prek elektronskih sporočil, ko sem prakso zaključila. Brez vas te naloge verjetno sploh ne bi bilo.

Zahvaljujem se doc. dr. Tomažu Skrbinšku za vso pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Za iskanje vzrokov in razlag, ko rezultati niso izgledali čisto tako kot bi morali, za vso potrpežljivost in posvete o križancih.

Posebna zahvala pa gre seveda tudi mojim staršem, ki so me med časom študija ves čas podpirali, tako finančno kot moralno. Mami je vedno vedela, kdaj potrebujem dodatno motivacijo za pisanje in spodbudo, ko mi kaj ni šlo.