

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja JELENČIČ

**GENETSKA PESTROST RJAVEGA MEDVEDA (*Ursus arctos*)
V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GENETIC DIVERSITY OF BROWN BEAR (*Ursus arctos*)
IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Ivan KOS Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. Peter TRONTELJ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	doc. dr. Rudi VEROVNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13.10. 2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Maja Jelenčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	502.7:599.74(497.4)=163.6
KG	rjavi medved/ <i>Ursus arctos</i> /slovenska populacija medveda/dinarska populacija medveda/varstvena genetika/genetska pestrost/mikrosateliti/struktura populacije
KK	
AV	JELENČIČ, Maja
SA	TRONTELJ, Peter (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2008
IN	GENETSKA PESTROST RJAVEGA MEDVEDA (<i>Ursus arctos</i>) V SLOVENIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	VIII, 65 str., 18 pregl., 16 sl., 7 pril., 43 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Slovenija leži na severozahodnem robu strnjenega območja dinarske populacije medveda in je tako najbolj zahodni del strnjenega območja razširjenosti rjavega medveda v Srednji Evropi. Konec 19. in v začetku 20. stoletja je bila populacija medvedov v Sloveniji močno zdesetkana. Po številnih zaščitnih ukrepih si je populacija opomogla. Ohranitev slovenske populacije medveda je pomembna na ravni Slovenije in tudi na mednarodni ravni, saj populacija predstavlja vir osebkov za naravno rekolonizacijo Alp. V diplomskem delu smo na osnovi mikrosatelitskih markerjev proučili genetsko raznolikost slovenskega dela dinarske populacije rjavega medveda in pripravili izhodišče za nadaljnjo raziskavo. Analizirali smo 487 tkivnih vzorcev medvedov, ki so bili v letih 2003 do 2008 odvzeti iz narave. Za analize smo iz tkiv najprej izolirali DNA, ki smo jo nato na 22 mikrosatelitskih lokusih namnožili v PCR po treh različnih protokolih. Vseh 22 uporabljenih lokusov se je izkazalo za polimorfne. Ugotovili smo razmeroma visoko stopnjo genske variabilnosti in alelne diverzitete. Čeprav še ne poznamo genske diverzitete mikrosatelitskih lokusov preostalega dela dinarske populacije, je smiselno iskati razlog zanjo v povezavi s preostalim, večjim delom populacije. Garza Williamsonovi (GW) indeksi nakazujejo populacijsko ozko grlo konec 19. in v začetku 20. stoletja. V povprečju kažejo izgubo 30% alelov na lokusih. Test Hardy Weinbergovega ravnovesja kaže na z genetskega vidika približno naključno parjenje v populaciji. Ugotovili smo, da se zelo velik delež lokusov deduje v povezavi z drugimi lokusi. Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo, da je velikost dinarske populacije medveda verjetno precejšnja in da ima celotna populacija verjetno nizko efektivno velikost. Populacijo smo glede na leto odstrela razdelili v šest časovnih skupin in na osnovi standardnih diverzitetnih indeksov raziskali, ali se je genetska sestava med leti spreminjala. Izračunali smo štiri različne mere genetske distance, naredili Mantelov test in eksaktni test diferenciacije populacije ter analizo molekularne variance. Nobeden od testov ni pokazal statistično značilnih razlik med časovnimi populacijami. Iz tega sklepamo, da je populacija v teh šestih letih večinoma nespremenjena.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC 502.7:599.74(497.4)=163.6
 CX brown bear/*Ursus arctos*/Slovenian population of brown bear/Dinaric population of brown bear/conservation genetic/genetic diversity/microsatellites/population structure
 CC
 AU JELENČIČ, Maja
 AA TRONTELJ, Peter (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
 PY 2008
 TI GENETIC DIVERSITY OF BROWN BEAR (*Ursus arctos*) IN SLOVENIA
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO VIII, 65 p., 18 tab., 16 fig., 7 ann., 43 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Slovenia is on the edge of the north western area of the Dinaric population of brown bear and so it represents the most western part of contiguous distribution of the brown bear in the Central Europe. The number of brown bears was very low in the end of the 19th and at the beginning of the 20th century. Later they were protected and the protection resulted in recovery of the population. Conservation of bears is also important to our neighbouring countries because Slovenian bears represent the source for natural recolonization of the Alps. In our research we studied genetic diversity at 22 nuclear DNA microsatellite loci for 487 tissue samples of bears that were taken from the population in the regularly yearly kill (bag) or as victims of traffic in a period of 6 years (from 2003 to 2008). By a standard protocol we isolated DNA from the samples and then we amplified DNA for 22 different microsatellite markers in 3 PCRs protocols. All 22 markers turned out to be very polymorphic. We found relatively high genetic diversity. Although we do not know genetic diversity of the other part of the Dinaric population it is possible that such high diversity is linked with it. Garza Williamson (GW) index shows a population bottleneck. Average loss of alleles on locus is 30%. The population probably survived a bottleneck at the end of the 19th and in the beginning of 20th century. Test of Hardy Weinberg equilibrium shows that mating in population from the genetic point of view is approximately random. We found a surprising result in very high linkage disequilibrium. Based on we concluded that the effective population size of the Dinaric population is low and that the number of brown bears is overestimated. We distributed our population into 6 temporal groups and searched for a possible changes in population structure. We run tests for measures of genetic distance, Mantel test, exact test of population differentiation and analysis of molecular variance (AMOVA). None of the tests showed any significant differences among temporal populations. We can conclude that population has not changed during this 6 year period.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RJAVI MEDVED (<i>Ursus arctos</i> Linnaeus, 1758)	3
2.1.1 Sistematska uvrstitev	3
2.1.2 Razširjenost rjavega medveda	3
2.1.3 Ekologija rjavega medveda	6
2.1.4 Rjavi medved v Sloveniji	7
2.1.4.1 Območje razširjenosti	7
2.1.4.2 Rjavi medved nekoč in danes	9
2.2 POPULACIJSKA GENETIKA	11
2.2.1 Varstvena genetika in genetska variabilnost	11
2.2.2 Mikrosateliti	11
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 OBMOČJE ZBIRANJA VZORCEV	14
3.2 LABORATORIJSKE METODE	15
3.2.1 Izolacija DNA	15
3.2.2 Amplifikacija DNA	15
3.2.3 Določanje genotipov	21
3.3 METODE POPULACIJSKE GENETIKE/STATISTIČNE METODE	24
4 REZULTATI	35
4.1 POPULACIJSKO GENETSKI PARAMETRI	37
4.2 GENETSKÉ RAZLIKE MED ČASOVNIMI SKUPINAMI IN ČASOVNA STRUKTURA POPULACIJ	47
5 RAZPRAVA	51
6 SKLEPI	57
7 POVZETEK	59

8 VIRI	60
7.1 CITIRANI VIRI	61
7.2 DRUGI VIRI	66
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Populacije rjavega medveda v Evropi.	5
Preglednica 2:	Število osebkov odvzetih iz populacije po letih.	15
Preglednica 3:	Sekvence primerjev in barvila s katerimi so označeni	17
Preglednica 4:	Koncentracije primerjev v multipleksih.	19
Preglednica 5:	Volumni posameznih sestavin za PCR ene serije vzorcev.	20
Preglednica 6:	Protokol PCR.	20
Preglednica 7:	Prikaz izračunov kvadratov standardnih odklonov.	33
Preglednica 8:	Redki aleli na posameznem lokusu.	39
Preglednica 9:	Pogosti aleli na posameznem lokusu.	40
Preglednica 10:	Osnovni parametri, ki opisujejo gensko diverziteto.	42
Preglednica 11:	Opažena in pričakovana heterozigotnost ter <i>P</i> -vrednosti izračunane v eksaktnem testu Hardy Weibergovega ravnovesja.	43
Preglednica 12:	Mere Nei-jeve standardne genetske distance med pari populacij.	47
Preglednica 13:	Mera Nei-jeve genetske distance med pari populacij.	47
Preglednica 14:	Minimalni delež skupnih alelov med pari populacij.	48
Preglednica 15:	Mere <i>F</i> statistike (F_{ST}) med pari populacij.	48
Preglednica 16:	Rezultati Mantelovega testa za posamezno mero genetske distance	48
Preglednica 17:	AMOVA	50
Preglednica 18:	AMOVA rezultati, kot tehtano povprečje lokusov	50
Preglednica 19:	Genska in alelska diverziteta na osmih mikrosatelitskih lokusih nekaterih medvedjih populacij z različnih območij.	52

KAZALO SLIK

Slika 1:	Rjavi medved <i>Ursus arctos</i> (Linnaeus, 1758).	3
Slika 2:	Razširjenost rjavega medveda v Evropi.	4
Slika 3:	Območje stalne prisotnosti medveda v Sloveniji z mejami lovišč.	8
Slika 4:	Mikrosatelitski lokus na molekuli DNA.	12
Slika 5:	Karta lokacij iz narave odvezetih medvedov od leta 2003 do 2008.	14
Slika 6:	Primer mikrosatelitske sekvence (lokus UarMu26).	16
Slika 7:	Razporeditev mikrosatelitskih lokusov v treh multipleksih in izvedba optimizacije multipleksiranja.	18
Slika 8:	Protokol in urejanje vzorcev za pripravo PCR.	28
Slika 9:	Shema delovanja sekvenatorja.	29
Slika 10:	Algoritem za sprejemanje in označevanje alelov v izpisu sekvenatorja v programskem orodju GeneMapper.	23
Slika 11:	Elektroferogramski izpis genotipa za samico 527y odstreljeno 23. 6. 2007 v lovski družini Lož - Stari trg.	35
Slika 12:	Število alelov in efektivno število alelov na posamičnem lokusu v populaciji.	37
Slika 13:	Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost po lokusih.	40
Slika 14:	Garza Williamsonovi indeksi za posamezne lokuse.	43
Slika 15:	Število lokusov s katerimi je posamezni lokus v vezavnem neravnovesju.	44
Slika 16:	Vezano neravnovesje med pari lokusov v populaciji.	45

1 UVOD

Rjavi medved je pomemben element naravne in kulturne dediščine, ne le v Sloveniji ampak tudi drugod po Evropi (Krže, 1988). V večjem delu srednje in južne Evrope je bil sicer konec 19. stoletja močno zdesetkan, na nekaterih območjih pa celo iztrebljen. Danes se odnos ljudi do te velike zveri spreminja. Tako se v različnih delih Evrope veliko truda vlaga v projekte okrevanja populacij medveda: v Alpah na italijanski in avstrijski strani, v Pirinejih v Franciji, v osrednjem delu Apeninov v Abruzzih, v španski Kantabriji ter v Pindosu in Rodopih v Grčiji (Kaczensky in Knauer, 2000).

Na širšem območju Dinarskega gorstva so se medvedi ohranili zaradi ustreznega življenjskega okolja - širnih strnjenih gozdov na razgibanem in nepreglednem terenu visokega krasa in tudi naklonjenosti tamkajšnjih ljudi do obstoja te vrste (Strategija, 2002). Kot najzahodnejši del strnjene dinarske populacije slovenski medvedi predstavljajo pomemben vir za naravno rekolonizacijo Alp. Življenjski pogoji v Sloveniji so zelo podobni pogojem v območjih, na katerih lahko najdemo medvede oz. potencialnih območjih njihove prisotnosti v srednji in južni Evropi. Tako je strategija upravljanja z medvedom v Sloveniji pomembna tudi za druge evropske države (Kaczensky in Gossow, 2000).

Medveda uvrščamo med ranljive vrste zaradi njegovih prostorskih zahtev, oportunistične karnivore narave prehranjevanja, velike mobilnosti in očitne tolerance do prisotnosti ljudi. Od leta 1993 je uvrščen na rdeči seznam ogroženih vrst v Sloveniji (Adamič, 2003), ščitijo pa ga tudi številne druge mednarodne konvencije, kot npr. Bernska konvencija.

Varovanje in upravljanje redke, ogrožene in karizmatične vrste kot je medved ni enostavno, saj upravljalce na vsakem koraku spremlja javnost, katere mnenja pa so v primeru velikih zveri običajno deljena. Tu postane pomembno, da odločitve upravljalcev s populacijo temeljijo na znanstveno dokazanih dejstvih, ki jim ni mogoče oporekati. Upoštevanje le-teh upravljalcem omogoča, da se lahko izognejo morebitnim očitkom. Tako vedno večji pomen dobivajo metode varstvene genetike, s katerimi lahko pridobimo številne informacije o genetskem stanju populacije, dinamiki in številčnosti populacije,



spolni strukturi, disperziji ter o geografskem in filogenetskem izvoru osebkov. Na podlagi poznavanja populacije z vseh teh vidikov je mogoče bistveno boljše načrtovanje upravljanja z njo.

Namen diplomske naloge je proučiti osnovne populacijsko genetske parametre, ki jih bo v prihodnje mogoče vključiti v nadaljnje študije in tako prispevati k varovanju te velike zveri.



2 PREGLED OBJAV

2.1 RJAVI MEDVED (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758)

2.1.1 Sistematska uvrstitev

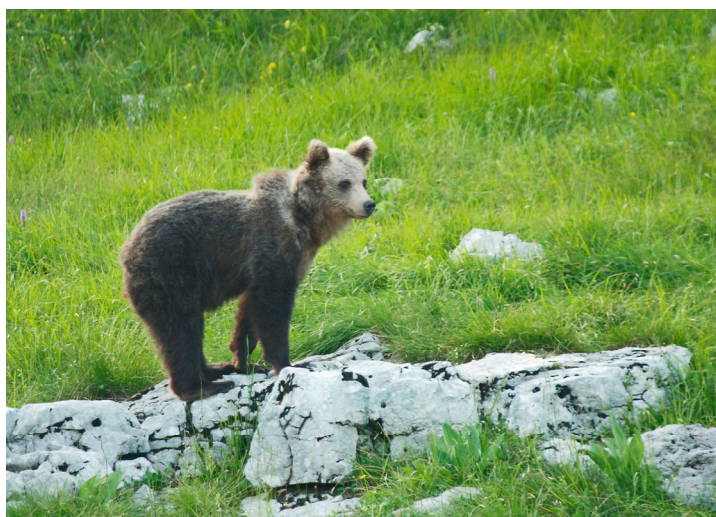
razred: MAMMALIA

red: CARNIVORA

družina: Ursidae

rod: *Ursus*

vrsta: *Ursus arctos* Linnaeus, 1758



Slika 1: Rjavi medved *Ursus arctos* (Linnaeus, 1758) (Foto: Krofel M.).

Na svetu danes poleg rjavega poznamo še 7 vrst medvedov: ameriški črni medved (baribal), beli ali severni medved, azijski črni medved, andski medved (očalar), malajski ali sončni medved, termitski medved (šobar) in orjaški panda (Pages in sod., 2008).

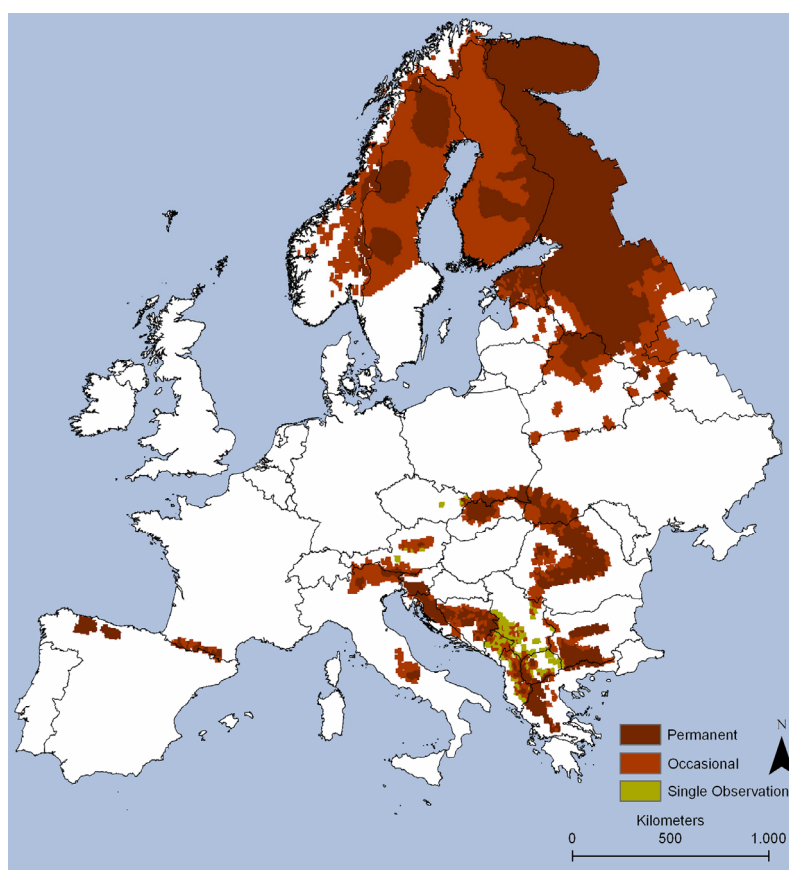
2.1.2 Razširjenost rjavega medveda

Rjavi medved je med večjimi (Bellemain, 2004) in s svojo holarktično distribucijo (Severna Amerika in Evrazija) tudi najbolj razširjena izmed osmih vrst medvedov



(Swenson in sod., 2000). Njegov življenjski prostor so gosti gozdovi, subalpinska in alpinska območja, pa tudi puščava in tundra (Bellemain, 2004).

Od zgodnjega srednjega pleistocena dalje je bil rjavi medved razširjen v celotni Evraziji (Schreve in Currant, 2003) razen na velikih otokih kot so Gotland (Švedska), Irska, Islandija, Korzika in Sardinija (Zedrosser in sod., 2001). Ljudje in medvedi imamo več kot 500.000 let skupne zgodovine (Turk, 2003). V pleistocenu sta bila človek in medved v neposredni kompeticiji za hrano in zavetje. Znano pa je tudi izkoriščanje medveda za osnovne življenjske potrebščine (kožuhovina, hrana, osebni predmeti iz podočnikov in kosti, uporaba kostnega mozga) (Schreve in Currant, 2003). Pozneje je zaradi naraščanja števila prebivalstva, lova ter izginjanja habitata zaradi deforestacije in naraščajočega kmetijstva na številnih območjih medved izginil (Zedrosser in sod., 2001).



Slika 2: Razširjenost rjavega medveda v Evropi (Legenda: temno rjava - stalna prisotnost; svetlo rjava - občasna prisotnost; zelena - posamezna opažanja) (Large ...).



V letu 2000 je bilo na območju Evrope (Slika 2), velikem 2,5 milijona km² (800 000 km² - brez Rusije) medvedov okoli 50.000 (od tega približno 14.000 zunaj Rusije) (Swenson in sod., 2000). V Preglednici 1 so povzete okvirne velikosti evropskih populacij medveda. Pomembno je poudariti, da so ocene pridobljene z različnimi metodami in zato med seboj niso povsem primerljive. Znano je namreč, da je velikost populacije medvedov težko oceniti in da so številne ocene, še posebej tiste, ki temeljijo na opazovanju javnosti, precenjene. Ocene v jugovzhodni Evropi so večinoma pridobljene s štetjem, ki ga izvedejo lovci enkrat do dvakrat letno na krmiščih. Ocene temeljijo na netestiranih predvidevanjih, da 80 - 90% osebkov iz populacije v času štetja obiše krmišče, a ne več kot eno. Tudi ocene številčnosti v Skandinaviji temeljijo na ekstrapolaciji, a v tem primeru gre za ekstrapolacijo razmerja označenih in neoznačenih medvedov na dveh raziskovanih območjih na ostali del območja razširjenosti medveda (Zedrosser in sod., 2001).

Preglednica 1: Populacije rjavega medveda v Evropi (Swenson in sod., 2000).

	število osebkov
VELIKA POPULACIJA (≥ 5000 osebkov)	
Severovzhodna Evropa	37 500
Karpati	8 100
SREDNJE VELIKA POPULACIJA (500 – 5 000 osebkov)	
Alpe – Dinaridi – Pindos	2 800
Skandinavija	1 000
Rila – Rodopi	520
MAJHNA POPULACIJA (< 100 osebkov)	
Stara planina (Balkan)	200
ZELO MAJHNE IZOLIRANE POPULACIJE	
Zahodni del Kantabrijskega gorovja	50 - 60
Apenini	40 - 50
Vzhodni del Kantabrijskega gorovja	20
Zahodni Pirineji	6
Severne Alpe	4

Največja populacijska gostota (100 - 200 medvedov na 1000 km²) je v Romuniji in v Dinaridih, najmanjša (0,5 - 1 medved na 1000 km²) pa v Fenoskandiji (Skandinavija, polotok Kola, Finska in Karelia). Populacijska gostota je verjetno odvisna od razpoložljive



hrane, vpliva človeka in od faze v kateri se populacija nahaja (porast/upad) (Swenson in sod., 2000).

2.1.3 Ekologija rjavega medveda

Medvedi so samotarske živali. Odnosi med posameznimi osebki zlasti odraslimi, temeljijo na medsebojnem izogibanju, razen v času parjenja. Kot večina drugih velikih zveri imajo tudi medvedi velike domače okoliše in se pojavljajo v nizkih populacijskih gostotah. Samice svoj domači okoliš vzpostavijo ob materinem, samci pa dispergirajo. Domači okoliši se prekrivajo. Medvedi so lahko aktivni podnevi in ponoči. Njihova aktivnost je odvisna od okoljskih pogojev, količine hrane in od človekove aktivnosti (Swenson in sod., 2000).

Medved je oportunistični omnivor. Značilno je, da izbira hrano z največjo hranilno vrednostjo, ki mu je v danem trenutku na voljo (Kryštufek, 2003). Večji del hrane medveda je rastlinskega izvora. Zanj je najtežje obdobje spomladi, zlasti do začetka vegetacijske sezone. V tem času lahko napade oslABLJENO parkljasto divjad, katere gibanje je zaradi poznega in pomrznjenega snega oteženo. Pomemben del spomladanske prehrane predstavlja tudi mrhovina - trupla živali, ki so poginile v zimskem času. Ko se prične vegetacijsko obdobje pa vse do pozne jeseni, zelo rad pase travo in uživa plodove gozdnih rastlin (dren, leska, jagode, borovnice, robide). V jeseni, ko si nabira tolščo za prezimovanje, so pomemben del prehrane plodovi gozdnega (žir, želod, kostanj, lešniki, orehi) in sadnega drevja v sadovnjakih (hruške, jabolka, slive). Beljakovinsko bogato hrano medvedu predstavljajo predvsem žuželke (mravlje, ose, čebele, lesni hrošči, minice, rilčkarji) ter njihove bube in že prej omenjena mrhovina (Krže, 1988). Priložnostno plenijo živino, zlasti drobnico. Hrano pa najdejo tudi na neurejenih smetiščih (Strategija ... , 2002). V primerih kadar si hrano poišče na posestvu ljudi (drobnica, sadovnjaki, čebelnjaki) in povzroči škodo, pogosto prihaja do konfliktov v odnosu z ljudmi.

Medved pozimi miruje, vendar to ni globoko zimsko spanje, kot ga poznamo na primer pri polhih. Telesna temperatura se zniža le za dve stopinji celzija. Upočasni se tudi srčni utrip in metabolizem. Ker v tem času ne uživa tekočine, se v telesu začnejo kopičiti strupeni



metabolni produkti, še posebej sečnina. Dušik iz sečnine se ponovno vgradi v telesne beljakovine, ki se odlagajo v limfi (sokrvnici). Medvedovo »zimsko spanje« je dejansko le posebna oblika stradanja z možnostjo nevtralizacije strupenih metabolnih produktov (Kryštufek, 2003). Nekateri medvedi južnejših evropskih populacij so lahko aktivni tudi celo leto. Preživljanje zime v brlogu je verjetno prilagoditev na pomanjkanje hrane v zimskem času in morda tudi na kotitev mladičev, ki niso sposobni termoregulacije (Swenson in sod., 2000).

Za medveda je značilna dolga življenjska doba (21 let je starost najstarejše evidentirane medvedke v Sloveniji (Jerina in Adamič, 2008), pozna spolna zrelost in raztegnjen reproduktivni cikel. Je poligamna vrsta. Parjenje poteka od sredine maja do zgodnjega julija. Po oploditvi se zarodki razvijejo do stadija blastociste. Nadaljnji razvoj je zaustavljen vse do poznega novembra in šele takrat pride do implantacije. Brejost potem traja še 6 do 8 tednov. Samice januarja ali februarja v brlogu skotijo 1 do 4 neobgljene mladiče, ki tehtajo okoli 0,5 kg. Mladiči odrastejo v 1,4 do 2,4 letih. Pri skandinavski populaciji, ki je najbolj intenzivno raziskovana evropska populacija, so ugotovili, da ima samica mladiče prvič med 4. in 6. letom starosti. Interval med eno in drugo brejostjo je razmeroma kratek, približno 2,4 leti (Swenson in sod., 2000).

2.1.4 Rjavi medved v Sloveniji

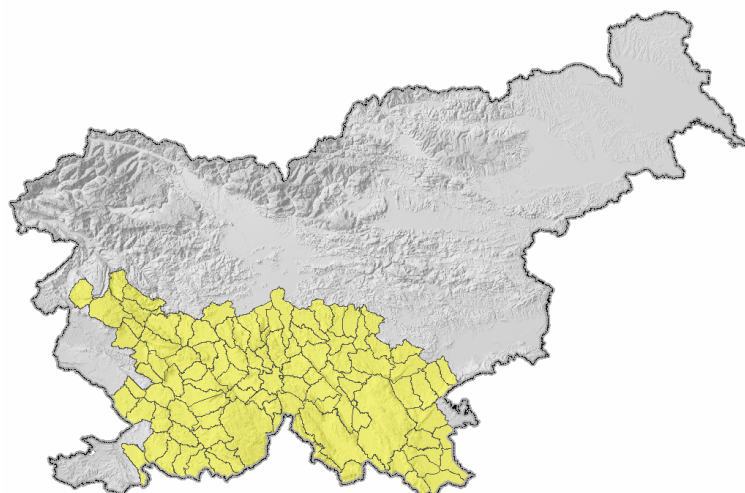
2.1.4.1 Območje razširjenosti

Slovenski medvedi so del alpsko – dinarsko – pindske populacije, ki zajema območje od vzhodnih Alp v Avstriji in severovzhodni Italiji vse do gorovja Pindos v Grčiji (Swenson in sod., 2000). Areal se tako razteza na območju naslednjih držav: Avstrija, Italija, Slovenija, Hrvaška, Bosna in Hercegovina, Makedonija, Črna gora, Srbija, Kosovo, Albanija in Grčija (Swenson in sod., 2000). Slovenija se nahaja na severozahodnem robu strnjenega območja dinarske populacije medveda in je s tem najbolj zahodni del areala populacije rjavega medveda v Srednji Evropi (Strategija ... , 2002).



Osrednje območje razširjenosti medveda v Sloveniji zajema visoki kras. To je območje strnjenih mešanih gozdov z razgibanim in nepreglednim terenom (Simonič, 2003). Najpogostejša združba je *Abieto-Fagetum-Dinaricum* v kateri prevladujejo bukev (*Fagus silvatica*) in jelka (*Abies alba*), v sestojih pa se mešajo tudi smreka (*Picea abies*), javor (*Acer pseudoplatanus*) in brest (*Ulmus* sp.) (Kaczensky, 2000). Na tem območju medved ni nikoli povsem izginil (Jerina in sod., 2003). Razdelimo ga lahko na tri večje dele (Simonič, 2003):

- ZAHODNI VISOKI KRAS (937 km²), ki se razteza severno od avtoceste Ljubljana - Postojna - Razdrto. Kljub temu, da je gozdni habitat zelo kvaliteten, še posebej na planotah Hrušica in Nanos, je gostota medvedov majhna.
- NOTRANJSKA (1306 km²) zajema zahodno pobočje Javornikov, Snežnik in Iško. Za ohranjanje velikih zveri je ta regija še posebej pomembna, saj se na svoji celotni južni meji nadaljuje v hrvaški Gorski kotar. Na tem območju, za razliko od Kočevske, kmetijskih pritiskov praktično ni.
- KOČEVSKO – BELOKRANJSKA REGIJA (2400km²) je največji del osrednjega območja medveda. Razteza se od Iške do Bele krajine. Z vidika ekologije ima največjo nosilno kapaciteto, a je tu medved vseeno bolj ogrožen kot na drugih dveh delih. Tu se namreč povečuje število ovc in koz ter drugih kmetijskih aktivnosti v gozdnatih predelih.



Slika 3: Območje stalne prisotnosti medveda v Sloveniji z mejami lovišč.



2.1.4.2 Rjavi medved nekoč in danes

Čeprav je bil medved v Sloveniji večkrat resno ogrožen, ni nikoli povsem izumrl, kot se je to zgodilo v drugih delih Evrope (Jerina in sod., 2003). Konec 19. in v začetku 20. stoletja je bila velikost populacije ocenjena na 30 do 40 osebkov (Krže, 1988). Medvedi so preživeli v redko poseljenih delih južne in jugovzhodne Slovenije. Po njihovi zaščiti leta 1931 je številčnost populacije postopno naraščala. Konec petdesetih je bila velikost populacije ocenjena na 160 živali (Jerina in sod., 2003). Leta 1966 je bilo v južnem nekonfliktnem (majhna gostota prebivalstva, malo reje drobnice) delu Slovenije vzpostavljeno 3500 km² veliko centralno območje za upravljanje z medvedjo populacijo. Celoletna zaščita samic z mladiči, zalaganje krmišč (dopolnilno hranjenje) in vzpostavitev letne kvote odstrela v tem območju so bili verjetno vzroki za hitro rast populacije ter širjenje stalne prisotnosti medveda proti severu in zahodu države. Poleg tega je bil lov dovoljen le od 1. oktobra do 31. aprila naslednje leto. Izven tega območja pa je bil odstrel dovoljen vse leto. Da bi povečali disperzijo osebkov iz Dinaridov v Alpe, so leta 1991 zaščitili tudi medvede izven centralnega območja. Leta 1995 je bila sprejeta razširitev centralnega območja razširjenosti na približno 5200 km², ki velja še danes (Kaczensky, 2000).

Naraščanje števila medvedov pa ni bilo brez posledic. Povečalo se je število opazanj in znakov njegove prisotnosti. To je med ljudmi, ki so živeli v neposredni bližini območij pojavljanja, povzročilo nelagodno občutje, strah in nenaklonjenost. Konflikti so se pojavili tudi zaradi povečanega števila medvedjih napadov na drobnico. K temu so pripomogli še medvedu nenaklonjeni mediji, ki so s svojim poročanjem dodatno zaostрили situacijo (Jerina in sod., 2003). Znano je, da sobivanje človeka in medveda, kot tudi drugih velikih zveri, prinaša težave na obeh straneh. Pomembno je upoštevati, da je mogoče večino teh problemov rešiti ali ublažiti brez močnega zmanjšanja populacije »problematične« vrste (Jerina in sod., 2003).

Jerina in Adamič (2008) ocenjujeta, da je leta 1998 populacija štela okoli 290 osebkov, nakar naj bi se do leta 2006 postopoma dvigovala do okoli 370 medvedov. Potem pa je številčnost znova začela upadati in sta jo za leto 2008 ocenila na 320 osebkov. Ugotovljene



vrednosti so veliko manjše od dosedanjih uradnih ocen Zavoda za gozdove Slovenije, ki so bile podane ob letnih predlogih za odstrel velikih zveri. Te so npr. za leto 2007 znašale od 500 do 700 osebkov. Odstrel medveda v Sloveniji je že nekaj časa intenziven, kar lahko pripišemo trenutni visoki rodnosti in dotoku emigrantov s Hrvaške. Velik odstrel v mlajših starostnih razredih verjetno pomeni majhen »vrast« novih, mladih osebkov v reproduktivni razred. Večji del sedanjega reproduktivnega razreda bo v prihodnosti ostarel, kar bi lahko povzročilo naglo upadanje natalitete. To pomeni, da za ohranjanje medveda v Sloveniji ni pomembno le poznavanje njihove številčnosti, ampak tudi drugih značilnosti in dinamike populacije (Jerina in Adamič, 2008).

Ohranitev slovenske populacije medveda ni pomembna le na ravni Slovenije, pač pa tudi na mednarodni ravni, saj le-ta predstavlja vir osebkov za naravno rekolonizacijo Alp (Kaczensky in Gossow, 2000). Tako v Strategiji upravljanja z rjavim medvedom (*Ursus arctos*) v Sloveniji najdemo mednarodne dogovore, ki določajo njegovo varstvo:

- *Bernska konvencija* – konvencija o varstvu prostoživečega evropskega rastlinstva in živalstva ter njunih naravnih življenjskih prostorov,
- *Alpska konvencija* – protokol o izvajanju Alpske konvencije iz leta 1991 o varstvu narave in urejanju krajine,
- *CITES, Washingtonska konvencija* – konvencija o mednarodni trgovini z ogroženimi prostoživečimi živalskimi in rastlinskimi vrstami
- *Konvencija o biološki raznovrstnosti, Rio de Janeiro, 1992.*

Varstvo medveda določajo tudi predpisi Evropske unije:

- *FFH direktiva (Habitatna direktiva)* – Smernice za varstvo flore, favne in habitatov
- *Resolucija Evropskega parlamenta o varstvu rjavega medveda.*



2.2 POPULACIJSKA GENTIKA

2.2.1 Varstvena genetika in genetska variabilnost

Varstvena genetika je področje znanosti, ki z uporabo genetskih metod omogoča pravočasno zaznavanje problemov varstva populacij ter pravočasno ukrepanje pri redkih in ogroženih vrstah.

Za prilagajanje okoljskim spremembam je v populacijah/skupinah potrebna genetska variabilnost oz. diverzitet - raznolikost alelov in genotipov, ki so prisotni v preučevani skupini (populacija, vrsta ali skupina vrst) (Frankham in sod., 2002). Genetska variabilnost populacije je posledica delovanja mutacij in migracij. Do njenega zmanjšanja v majhnih populacijah prihaja zaradi genetskega drifta in usmerjene selekcije. V dolgem časovnem obdobju je genetska raznolikost pomembna z vidika adaptivnega evolucijskega potenciala, v kratkem pa predvsem kot reprodukcijski fitnes (Frankham in sod., 2002). Razumevanje dejavnikov, ki vplivajo na hitrost, s katero naravne populacije izgubljajo genetsko variabilnost, je ključno z vidika varstvene genetike. Za varstveno genetiko je pomembno tudi zaznavanje zmanjšanja genetske variabilnosti. To je še posebej izraženo pri velikih zvereh kamor spada medved, ki običajno živijo v nizkih populacijskih gostotah in so zelo občutljive na fragmentacijo habitata, ki jo povzroča človek (Paetkau in sod., 1998).

2.2.2 Mikrosateliti

Mikrosateliti so bili odkriti že pred več kot 25 leti, a so jih najprej imeli za sekvence, ki niso preveč zanimive. Z razvojem PCR (verižne reakcije polimeraze) so bili v poznih osemdesetih spoznani kot eni najboljših mendelskih markerjev, ki so bili kadarkoli odkriti (Jarne in Lagoda, 1996).





Slika 4: Mikrosatelitski lokus na molekuli DNA.

Mikrosatelit je večkratna ponovitev kratke sekvence jedrne DNA (motiva), dolge od 1 do 5 baz. Število ponovitev je v populaciji zelo variabilno, ker lahko med replikacijo DNA pride do mutacije zaradi »zdrsa«. Na ta način se zmanjša ali poveča trenutno število ponovitev motiva za en bazni par oz. eno enoto ali več (Frankham in sod., 2002). Stopnja mutacije mikrosatelitov je z vidika raziskovanja zelo pomembna, saj je odločilna za ohranjanje variabilnosti v populaciji, ki jo lahko z našimi metodami zaznamo (Jarne in Lagoda, 1996). V primerjavi s točkovnimi mutacijami, ki so reda verjetnosti od 10^{-9} do 10^{-10} na generacijo, je stopnja mutacije pri mikrosatelitih višja. Iz analiz rodovnikov pri ljudeh so stopnje mutacij ocenili na 10^{-3} na lokus na generacijo (Hancock, 1999).

Za razumevanje nekaterih populacijsko genetskih metod moramo ločiti tri različne modele mutacij mikrosatelitov. Prvi je IAM (Infinite Allele Model), po katerem vsaka mutacija ustvari nov alel s stopnjo/hitrostjo u . Model ne dovoljuje homoplazije, kar pomeni, da imajo identični aleli skupnega prednika (Identical-by-descent). Drugi je KAM (K - alelni model), kjer je možno K alelno stanje. Verjetnost, da katerikoli alel mutira v drugi alel ($K-1$), je enaka. Aleli mutirajo s stopnjo/hitrostjo $u/(K-1)$. Ta model dovoljuje homoplazijo, kar pomeni, da so aleli identični v stanju (Identical-In-State), nimajo pa skupnega prednika. IAM je le posebna oblika KAM, kjer je $K = \infty$. Tretji model je SMM (Stepwise Mutation Model), kjer mutacija doda ali odvzame (z enako verjetnostjo) eno enoto k oz. od določenega alela. Posledično so si aleli podobnih dolžin bolj sorodni kot aleli, ki imajo dolžine zelo različne (Balloux in Lugon-Moulin, 2002).



Zaradi visoke variabilnosti so mikrosateliti posebej uporabni za ugotavljanje nedavne demografske zgodovine, vključno z zaznavanjem človekovih vplivov na populacijo (Pearse in Crendall, 2004). Diverziteto mikrosatelitov ugotavljamo z namnožitvijo tarčne DNA v PCR in analizo na sekvenatorju, kjer fragmente ločimo na podlagi njihove dolžine (Frankham in sod., 2002). V populacijskih študijah lahko ločimo alele z natančnostjo enega baznega para. Okarakteriziramo jih po številu ponovitev na analiziranem lokusu (Jarne in Lagoda, 1996). Število mikrosatelitnih alelov enega lokusa v populaciji se v populacijah z naključnim parjenjem običajno giblje med 5 in 10 (Frankham in sod., 2002). Sicer mikrosatelite najdemo predvsem v nekodirajočih delih genoma (introni). Do sedaj so bili najdeni v vsakem raziskovanem organizmu (Hancock, 1999).

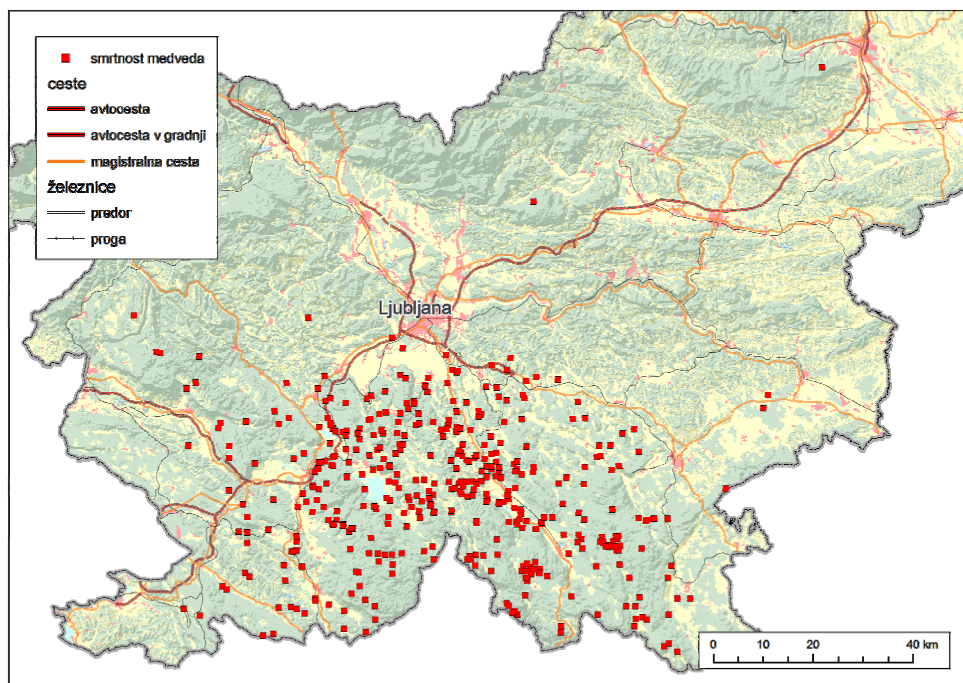
Ker združujejo visoko variabilnost in kodominantno dedovanje, imajo kar nekaj prednosti pred drugimi genetskimi markerji. Ker so razmeroma kratki in enostavni za pomnoževanje v PCR, so uporabni tudi za analize neinvazivnih in forenzičnih vzorcev (dlaka, iztrebki, slina, jajčne lupine, peresa, luske itd.). Njihova slabost je, da jih je v večini primerov potrebno razviti za vsako vrsto posebej. Kljub temu pa lahko za sorodne vrste pogostokrat uporabimo enake oligonukleotidne primerje (Frankham in sod., 2002), kar smo storili tudi v naši študiji, kjer smo mikrosatelite, razvite za črnega medveda (*Ursus americanus*), uporabili pri rjavem medvedu. V zadnjem času so bili uporabljeni za ugotavljanje genetske diverzitete velikega števila vrst, od katerih je veliko ogroženih (Frankham in sod., 2002).



3 MATERIAL IN METODE

3.1 OBMOČJE ZBIRANJA VZORCEV

Večina vzorcev tkiv je pridobljenih z območja stalne prisotnosti medveda v Sloveniji. Nekateri vzorci so pridobljeni tudi iz širše Slovenije, saj medvedi pogosto zaradi svoje narave (veliki domači okoliši, dispresija mladih osebkov, iskanje hrane) zaidejo tudi drugam. Tkivne vzorce medvedov odvzetih iz narave v Skupini za ekologijo živali, na Katedri za ekologijo in varstvo okolja Oddelka za biologijo, v sodelovanju z Zavodom za gozdove Slovenije sistematično zbirajo od leta 2003. Vključno s pomladjo 2008 jih v tkivni banki v času pisanja te naloge hranijo okoli 500. V naši raziskavi smo jih uporabili 487, saj so nekateri izmed njih pridobljeni tudi od živali iz drugih držav in živali iz ujetništva.



Slika 5: Karta lokacij iz narave odvezetih medvedov od leta 2003 do 2008. Podatki za 2007 in 2008 niso popolni. Pozicijska natančnost je ~ 5 km.



Preglednica 2: Število osebkov odvzetih iz populacije po letih.

LETO ODSTRELA	ŠT. OSEBKOV ODVZETIH IZ POPULACIJE	ŠT. ANALIZIRANIH VZORCEV	ŠT. SAMCEV V VZORCU	ŠT. SAMIC V VZORCU	ŠT. MLADIH [§] OSEBKOV V VZORCU
2003	72**	51	28	23	13
2004	81**	77	49	28	31
2005	95**	84	42	42	34
2006	126**	120	65	55	57
2007	108 [†]	105	57	48	55
2008*	62 [†]	50	31	19	20
SKUPAJ	544	487	213	274	210

* za raziskavo smo uporabili le osebkke, ki so bili odstreljeni v pomladanskem delu rednega letnega odstrela

** Jerina in Adamič, 2008 in [†]Odvzem ... 2008

[§]kot mlade osebkke štejemo tiste, ki so stari 2 leti ali manj

3.2 LABORATORIJSKE METODE

3.2.1 Izolacija DNA

Za analize smo uporabili DNA izolirano iz tkiv medvedov, ki so bili odvzeti iz populacije v rednem letnem ali izrednem odstrelu (»problematicni medvedi«) in najdeni povoženi ali, poginuli. Vzorci so shranjeni v 96% etanolu na -20°C. Vsi vzorci so evidentirani v relacijski bazi podatkov skupaj z njihovimi genotipi, ki so končni rezultat analize DNA.

DNA iz tkiv smo izolirali z izolacijskim kitom GeneElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma). Izolirano DNA hranimo pri -20°C, saj je tako shranjena lahko uporabna več let.

3.2.2 Amplifikacija DNA

V projektu »Varstvena genetika medveda, risa in jelenjadi v Sloveniji«, ki so ga med leti 2003 in 2007 izvedli Skrbinšek in sod., so izolirano DNA amplificirali na trinajstih polimorfnih mikrosatelitskih lokusih. Vsi lokusi imajo (GT)_n dinukleotidno repetitivno



sekvenco. Lokusi G10B, G10C, G10D, G10J, G10L, G10M, G10P in G10X so klonirani iz genetske knjižnice črnega medveda (Paetkau in Strobeck 1994; Paetkau in sod. 1995). Lokusi UarMu10, UarMu23, UarMu50, UarMu51 in UarMu59 pa so klonirani iz genetske knjižnice rjavega medveda (Taberlet in sod. 1997; Bellemain in Taberlet, 2004). Za določanje spola so amplificirali lokus SRY, ki je vezan na Y spolni kromosom (Bellemain in Taberlet, 2004).

Za boljši vpogled v genetsko stanje populacije slovenskih medvedov smo v naši raziskavi razširili paleto mikrosatelitskih lokusov na 22 in ohranili SRY. Dodali smo UarMu05, UarMu09, UarMu11, UarMu15, UarMu26, UarMu61, G1A, G10H, Cxx20. Tako smo 236 vzorcev iz prejšnje študije dodatno amplificirali še na novih mikrosatelitskih lokusih, na novo pridobljene vzorce pa na vseh 22 mikrosatelitskih in SRY lokusu.

GTACTCTTAATCCCCTTCACCTATTTTCATCCATCCCCCTACCCATCTCCCCCTCCAGCAATCACC
AGTTTGTTCTCCATATTTAAAAGACTAGTTTTCTGTTTGTCTTTTTCTTTGTTTCATTTGTTTTAT
TTCTTAAATTCCACATATAAATGGATTATGTGGTATCTATCTTTCTTTAAATTACTCATTTTAC
TTAGCATTAAACANCCCCCCCCCAAAATTGGGTGATGGGCATTAAGGAGGGCACTTGATGTAA
NTGAGCACTGGGTGTTATATGCAACTNGATGAATCACTAAATTTTACCCCCCTAGATCATCC
ATTCT**GCCTCAAATGACAAGATTTC**AATCCTTTTTTTGTGGCTGAGAATTCATTGTATGTAT**G**
TGTGNATACATATATATTTATGGTATGTTAT
GTGTAAAGAAGATAAACATCTTCTTTATCCATTCATCTATAGATGGACACTTGG**GCTGCTTCC**
TATTTTAATTGAGGAAACTTCATATTATTTTCCATAGTGNCTGCACCAGTTTAGATTCTCATC

Slika 6: Primer mikrosatelitske sekvence (lokus UarMu26). Zeleno in rumeno sta začetna oligonukleotida (primerja). Poševni podčrtani tisk pa je polimorfna (GT)_n sekvenca mikrosatelita.

Vsak mikrosatelitski lokus smo pomnožili s parom specifičnih primerjev, od katerih je bil eden označen s fluorescentnim barvilom. Uporabljali smo petih barvil, in sicer 6-FAM (modra), VIC (zelena), NED (rumena), PET (rdeča) in LIZ (oranžna). V vse PCR produkte smo dodali dolžinski standard GS500-Liz (Applied Biosystems), ki zavzema oranžni del spektra, torej je označen z LIZ. Pomembno je, da so barvila znotraj enega multipleksa (tj. zmes mešanice želenih primerjev (kratki specifični oligonukleotidi), vode in pripravkov kita, ki vsebujejo nukleotide, pufer, Taq polimerazo in mono- ter divalentne katione) izbrana tako, da se fragmenti različnih lokusov, a enakih dolžin, ne pokrivajo. V



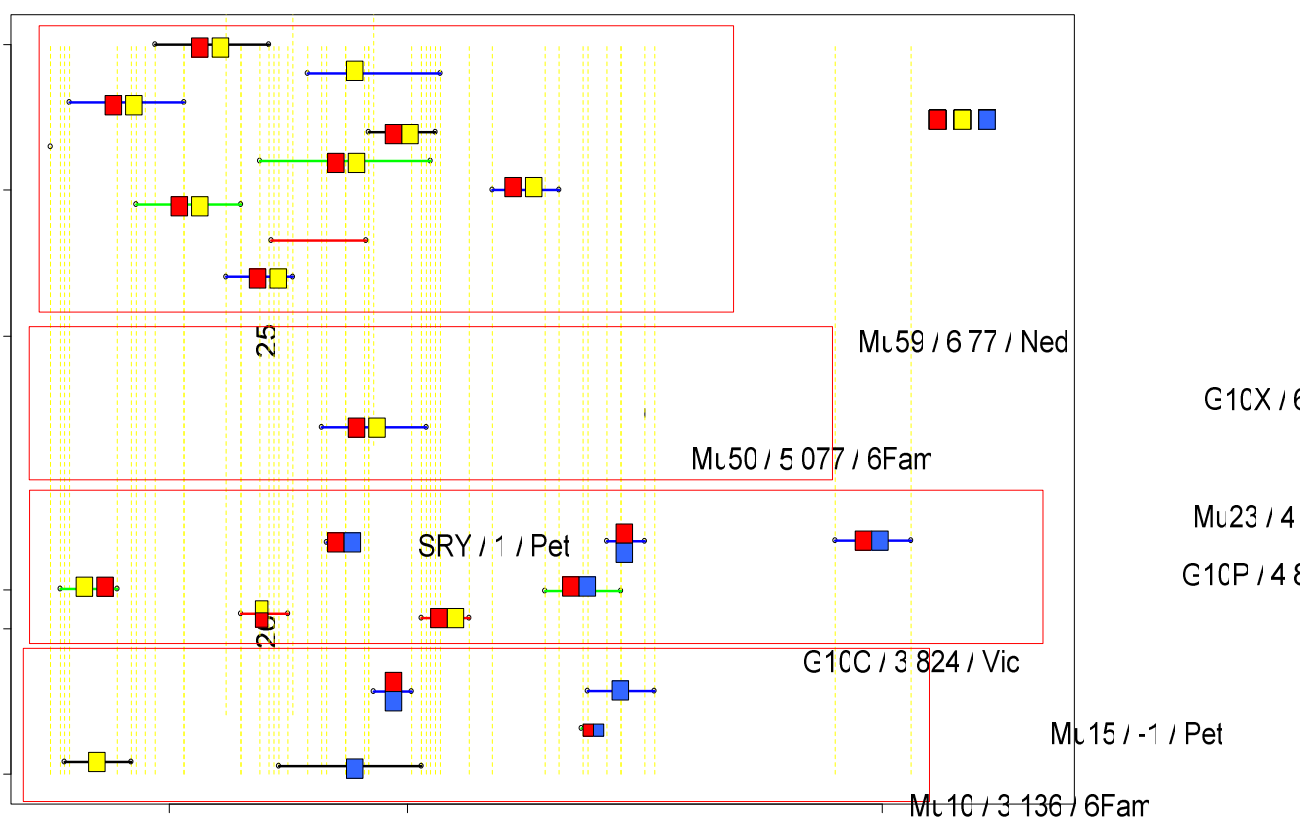
Preglednici 3 so zbrane v naši raziskavi uporabljene sekvence primerjev in fluorescentna barvila, s katerimi je označen po eden izmed primerjev v paru. Za PCR smo oblikovali razporeditev primerjev v posamezne multiplekse kot je prikazano na Sliki 7. Pri oblikovanju le-teh smo bili pozorni predvsem na optimalno temperaturo primerjev za vezavo na matrično DNA in prekrivanje mikrosatelitnih lokusov.

Preglednica 3: Sekvence primerjev in barvila s katerimi so označeni

Lokus	F primer	R primer	Vir
<i>Cxx20</i>	5'-AGCAACCCCTCCCATTACT-3'	5'- NED -TTGTCTGAATAGTCCTCTGCC-3'	Waits
<i>G10B</i>	5'-GCCTTTTAATGTTCTGTTGAATTTG-3'	5'- 6FAM -GACAAATCACAGAAACCTCCATCC-3'	Waits
<i>G10C</i>	5'- VIC -AAAGCAGAAGGCCTTGATTTCCTG-3'	5'-GGGACATAAACACCGAGACAGC-3'	Waits; Skrbinšek
<i>G10D</i>	5'-ATCTGTGGGTTTATAGGTTACA-3'	5'- 6FAM -CTACTCTTCTACTCTTTAAGAG-3'	Taberlet
<i>G10H</i>	5'- 6FAM -CAACAAGAAGACCACTGTAA-3'	5'-AGAGACCACCAAGTAGGATA-3'	Taberlet, Waits
<i>G10J</i>	5'- NED -GATCAGATATTTTCAGCTTT-3'	5'-AACCCCTCACACTCCACTTC-3'	Waits
<i>G10L</i>	5'- PET -ACTGATTTTATTCACATTTCCC-3'	5'-GATACAGAAACCTACCCATGCG-3'	Bellemain
<i>G10M</i>	5'- 6FAM -TTCCCTCATCGTAGGTTGTA-3'	5'-GATCATGTGTTTCCAAATAAT-3'	Waits
<i>G10P</i>	5'-TACATAGGAGGAAGAAAGATGG-3'	5'- VIC -AAAAGGCCTAAGCTACATCG-3'	Waits, Taberlet
<i>G10X</i>	5'- 6FAM -CCCTGGTAACCACAAATCTCT-3'	5'-TCAGTTATCTGTGAAATCAAAA-3'	Taberlet, Waits
<i>G1A</i>	5'- VIC -GACCCTGCATACTCTCTCTGATG-3'	5'-GCACTGTCCTGCGTAGAAGTGAC-3'	Waits
<i>Mu05</i>	5'- 6FAM -AATCTTTTCACTTATGCCCA-3'	5'-GAAACTTGTATGGGAACCA-3'	Waits, Taberlet
<i>Mu09</i>	5'-AGCCACTTTGTAAGGAGTAGT-3'	5'- VIC -ATATAGCAGCATATTTTGGCT-3'	Taberlet
<i>Mu10</i>	5'-ATTCAGATTTTCATCAGTTTGACA-3'	5'- 6FAM -TCAGCATAGTTACACAAATCTCC-3'	Bellemain; Taberlet;
<i>Mu11</i>	5'- VIC -AAGTAATTGGTGAAATGACAGG-3'	5'-GAACCCTTCACCGAAAATC-3'	Taberlet
<i>Mu15</i>	5'- PET -CTGAATTATGCAATTAAACAGC-3'	5'-AAATAAGGGAGGCTTGGG T-3'	Taberlet
<i>Mu23</i>	5'- NED -TAGACCACCAAGGCATCAG-3'	5'-TTGCTTGCTTAGACCACC-3'	Bellemain, Taberlet
<i>Mu26</i>	5'- 6FAM -GCCTCAAATGACAAGATTTC-3'	5'-TCAATTAAAAATAGGAAGCAGC-3'	Taberlet
<i>Mu50</i>	5'-GTCTCTGTCAATTCCCCATC-3'	5'- 6FAM -AACCTGGAACAAAAATTAACAC-3'	Bellemain
<i>Mu51</i>	5'-AGCCAGAATCCTAAGAGACCT-3'	5'- PET -AAAGAGAAGGGACAGGAGGTA-3'	Bellemain; Skrbinšek
<i>Mu59</i>	5'-GCTCCTTTGGGACATTGTAA-3'	5'- NED -TGACTGTCACCAGCAGGAG-3'	Bellemain
<i>Mu61</i>	5'- 6FAM -TCCACTGGAGGGAAAATC-3'	5'-CTGCTACCTTTCATCAGCAT-3'	Taberlet
<i>SRY</i>	5'-GAACGCATTCTTGGTGTGGTC-3'	5'- PET -TGATCTCTGAGTTTGCATTG-3'	Bellemain, Taberlet

* F (Forward) – označuje primerje, ki se vežejo na matrično DNA na 5' koncu; R (Reverse) – pa primerje, ki se vežejo 3' koncu. **vsaka od barv označuje imena barv za fluorescentna barvila **NED** - rumena; **VIC** - zelena; **6FAM** - modra; **PET** - rdeča.





Slika 7: Razporeditev mikrosatelitskih lokusov v treh multipleksih in izvedba optimizacije multipleksiranja (graf je bil uporabljen za dejansko optimizacijo reakcij). Na x osi je dolžina alelov, črte pri posameznem lokusu pa ponazarjajo razpon pričakovanih dolžin alelov. Barvni kvadrati ponazarjajo temperaturo vezave oligonukleotidov (annealing), pri kateri se lokus bolje amplificira – rdeče višja temperatura (~60°C), rumeno srednja (~55°C) in modro nižja temperatura (~50°C). Dva kvadrata vodoravno kažeta da se pri prvi (levi) temperaturi bolje amplificira kot pri drugi, dva kvadrata navpično pa kažeta, da se pri obeh temperaturah lokus amplificira podobno (Skrbinšek T.).

Za amplifikacijo smo uporabljali Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen). V eni PCR smo sočasno amplificirali od pet do devet lokusov. Tako smo za amplifikacijo vseh 22 lokusov naredili tri multiplekse, natančneje je to zmes ene od predhodno pripravljenih mešanic (MultiA MM; MultiC MM; MultiD MM) zelenih primerjev (kratki specifični oligonukleotidi) s točno določenimi koncentracijami, ki so predstavljene v Preglednici 4, vode, MasterMix-a in Q Solution-a (pripravki kita, ki vsebujejo nukleotide, pufer, Taq polimerazo in mono- ter divalentne katione). Uporabljeni volumni so predstavljeni v Preglednici 5.

G10C / 3 191 / Ned

Cxx20 / -1 /

Preglednica 4: Koncentracije primerjev v multipleksih

Primerji (Multi A MM)	Koncentracija primerja (μ M)	Primerji (Multi C MM)	Koncentracija primerja (μ M)	Primerji (Multi D MM)	Koncentracija primerja (μ M)
Mu 59 F	0,20	Mu 05 F	0,13	Mu61 F	0,10
Mu 59 R	0,20	Mu 05 R	0,13	Mu61 R	0,10
G10X F	0,27	Mu51 F	0,09	G10M F	0,40
G10X R	0,27	Mu51 R	0,09	G10M R	0,40
Mu50 F	0,10	Mu 11 F	0,20	Mu09 F	0,07
Mu50 R	0,10	Mu 11 R	0,20	Mu09 R	0,07
Mu23 F	0,11	G10L F	0,10	G10J F	0,10
Mu23 R	0,11	G10L R	0,10	G10J R	0,10
G10P F	0,09	Mu 26F	0,08	Cxx20 F	0,30
G10P R	0,09	Mu 26 R	0,08	Cxx20 R	0,30
G10D F	0,18	G1A F	0,08		
G10D R	0,18	G1A R	0,08		
G10C F	0,07	G10H F	0,10		
G10C R	0,07	G10H R	0,10		
Mu15 F	0,25				
Mu15 R	0,25				
Mu10 F	0,16				
Mu10 R	0,16				
SRY F	0,08				
SRY R	0,08				

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



Preglednica 5: Volumni posameznih sestavin za PCR ene serije vzorcev (94 tkivnih vzorcev in 2 negativni kontroli)

MultiA/MultiC/MultiD	
Število vzorcev	106 (96 vzorcev + 10%*)
DNA	1 µl
Volumen PCR	10 µl
UHQ voda	284,88 µl
Quaigen Mastermix (2×)	530 µl
Q solution 5× (0,5×)	106 µl
Multi A/C/D MM (32×)	33,13 µl
Skupni volumen mastermiksa	954 µl
Volumen PCR miksa/epico	9 µl
V / multichanel dist.	110,7 µl

*10% dodatnega volumna zaradi izgub pri pipetiranju **UHQ - Ultra High Quality

PCR smo izvajali s termociklerji Eppendorf MasterCycler EP Gradient po protokolu, ki je predstavljen v Preglednici 6.

Preglednica 6: Protokol PCR

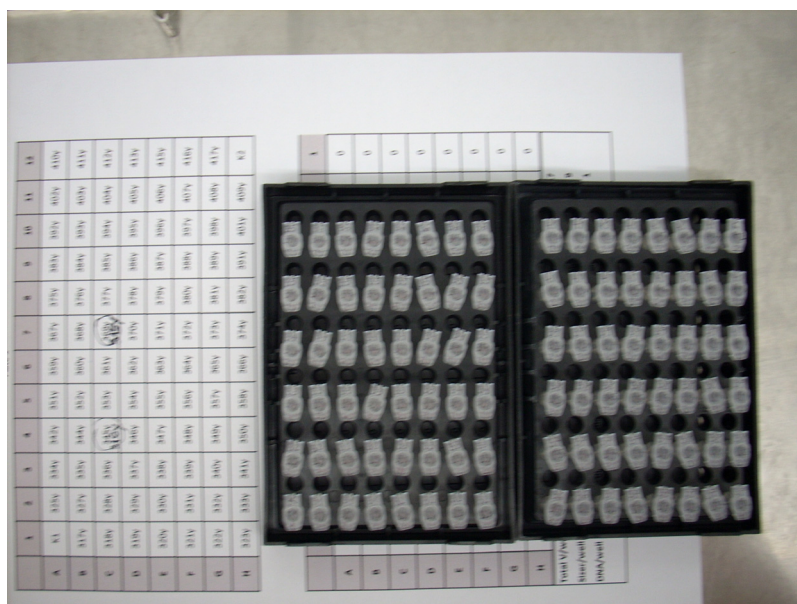
	Multipleks A in C		Multipleks D	
Začetna denaturacija:	95°C	15 min	95°C	15 min
Število ciklov:	29		29	
Denaturacija :	94°C	30 sec	94°C	30 sec
Vezava primerjev:	58°C	90 sec	49.5°C	90 sec
Elongacija:	72°C	60 sec	72°C	60 sec
Končna elongacija	60°C	30 min	60°C	30 min

*Protokola se zaradi razlik v optimalni temperaturi za vezavo primerjev na matrično DNA razlikujeta v temperaturi reakcij.

Pri tako velikem številu vzorcev lahko kaj kmalu pride do napak zaradi človeškega faktorja (zamenjave vzorcev, napake pri pipetiranju), zato smo uvedli sistem laboratorijskega dela, s katerim smo večino napak zaznali in popravili. Pred vsakim začetkom pipetiranja smo si pripravili protokol (Priloga A) z razporeditvijo vzorcev, kot bi morala biti na končni PCR plošči. Vzorce smo predhodno alikvotirali v 0,2 ml epruvete, tako da smo jih lahko uredili v načrtovane razporeditve in jih nato neposredno pipetirali z osemkanalno pipeto. Pred



pipetiranjem smo urejene vzorce fotografirali, nato pa fotografijo primerjali z načrtovano razporeditvijo v protokolu. Vsa pipetiranja so bila izključno z osemkanalno pipeto, kar prav tako zmanjša možnost napake zaradi zamenjave vzorcev. Na vsaki plošči smo pomnoževali serijo 94 vzorcev in dve negativni kontroli. Ponovili smo vse amplifikacije vzorcev, katerih genotipi so bili nezanesljivi. Za oceno napake smo načrtno »slepo« ponovili 10% vseh genotipizacij, kot priporočajo (Bonin in sod., 2004), vendar smo v praksi zaradi ponovitev vzorcev, ki so bili na posameznem lokusu slabo amplificirani, na ostalih pa zanesljivi, dejansko na vseh lokusih 2-krat ponovili 35,3% vzorcev, 3-krat 12,1%, 4-krat 12,1%. Maksimalno število narejenih ponovitev je 6. V prilogi C je preglednica s številom ponovitev na posameznem lokusu.



Slika 8: Protokol in urejanje vzorcev za pripravo PCR (Foto: Jelenčič M.).

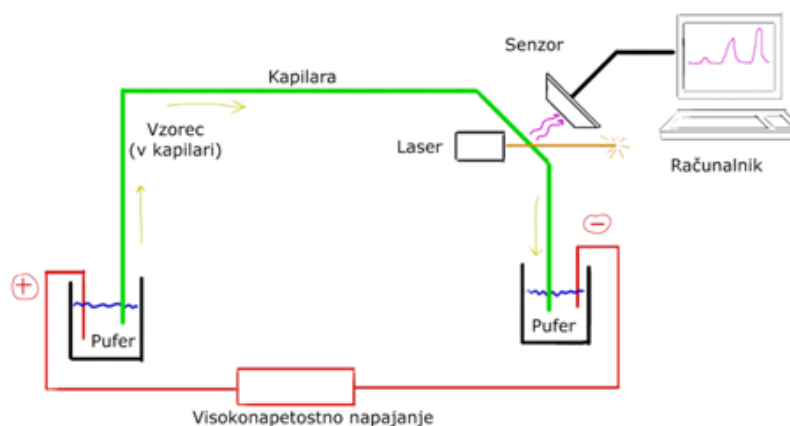
3.2.3 Določanje genotipov

Po končani PCR smo po 1 μ l PCR produkta vsakega vzorca prenesli v 9 μ l mešanice formamida (Applied Biosystems) (927,5 μ l) in dolžinskega standarda GS500-Liz (Applied Biosystems) (26,5 μ l) (volumni ustrezajo seriji 94 vzorcev in dveh negativnih kontrol ter 10% dodatnega volumna zaradi izgub pri pipetiranju), ki smo jo predhodno razdelili v jamice PCR plošče. Vse skupaj smo nato še 4 minute denaturirali v termociklerju pri



temperaturi 95 °C. Takoj po končani denaturaciji smo PCR ploščo prenesli na led in počakali, da se je ohladila.

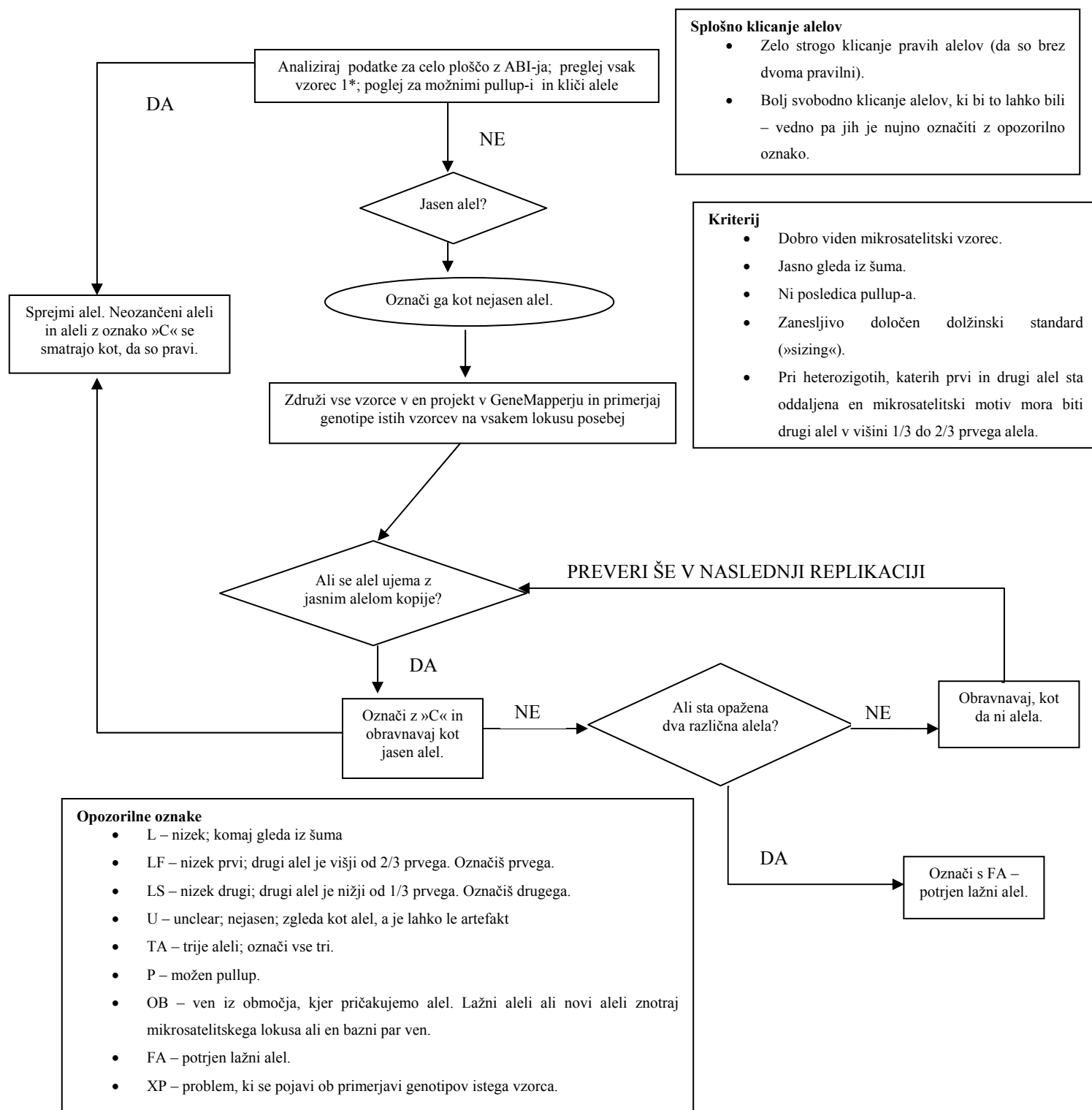
Dolžine alelov smo določali na 16 kapilarnem sekvenatorju ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). V kapilarah sekvenatorja, ki so dolge 36 cm, poteka elektroforeza, ki omogoča ločevanje DNA fragmentov glede na njihovo dolžino. DNA z elektroinjekcijo potegnemo v medij (polimer) POP-7TM (Applied Biosystems), ki otežuje njeno gibanje. Ker so molekule DNA pozitivno nabite, se gibajo proti negativni elektrodi. Daljši fragmenti se gibljejo počasneje od krajših in tako da se sčasoma fragmenti med seboj ločijo po dolžini. Primerji so bili označeni s prej omenjenimi fluorescentnimi barvili, ki oddajo specifično valovno dolžino ob presvetlitvi z laserjem, ki se nahaja ob koncu kapilare. Svetlobo zazna senzor, ki signal preda računalniku, s pomočjo katerega podatke interpretiramo. Na Sliki 9 je predstavljeno delovanje sekvenatorja. Za ugotavljanje dolžine fragmentov smo v vsak vzorec dodali dolžinski standard GS500-Liz (Applied Biosystems), v katerem so fragmenti DNA znane dolžine, s pomočjo katerih lahko kasneje zelo natančno določimo dolžino iskanih fragmentov.



Slika 9: Shema delovanja sekvenatorja (Skrbinšek T.).

Za analizo elektroferogramov (izpisov iz sekvenatorja; Slika 11 v poglavju Rezultati) smo uporabili programsko orodje GeneMapper (Applied Biosystems). Za sprejemanje genotipov smo uporabili algoritem (Slika 10), ki so ga razvili Skrbnišek in sodelavci (2007).





Slika 10: Algoritem za sprejemanje in označevanje alelov v izpisu sekvenatorja v programskem orodju GeneMapper (Skrbinšek in sod., 2007).



Populacijsko-genetske parametre smo ocenili s pomočjo računalniških programov Microsatellite Analyser (MSA) (Dieringer in Schlotterer, 2003) in Arlequin (Excoffier in sod., 2005). Vzorce smo obravnavali na dva načina: 1. kot eno skupno populacijo in 2. kot šest časovnih populacij, ki smo jih oblikovali glede na leto odstrela posameznega osebk. Mere genetskih distanc, genetsko diferenciacijo in strukturo populacije smo ocenili za vsako od šestih časovnih skupin. Vse ostale parametre pa smo ocenili za obe različici podatkov.

3.3 METODE POPULACIJSKE GENETIKE/STATISTIČNE METODE

Standardni diverzitetni indeksi

Genski polimorfizem smo za vsako od populacij ocenili na 22 mikrosatelitskih lokusih s številom alelov na posameznem lokusu (A) ter opaženo (H_o) in pričakovano (H_e) heterozigotnostjo.

Frekvence alelov, ki so pomembne za opis variabilnosti populacije in predstavljajo osnovo za ugotavljanje vrste drugih populacijsko genetskih parametrov, smo izračunali po enačbi:

Frekvenca alela i = št. kromosomov z alelom i / št. vseh kromosomov s tem lokusom v vzorcu

... (1)

Heterozigotnost se nanaša na stanje, kjer ima posamičen osebek na nekem lokusu dva različna alela. Pravimo, da je heterozigot. V populacijski genetiki se pojem heterozigotnosti razširi na celotno populacijo, tj. skupina osebkov v populaciji, ki so na določenem lokusu heterozigotni. Ločimo opaženo in pričakovano heterozigotnost, kateri primerjamo v testu Hardy Weinbergovega ravnovesja. Opažena heterozigotnost (H_o) je heterozigotnost, ki smo jo dejansko opazili – razmerje med številom osebkov, ki so na lokusu heterozigotni in številom vseh pregledanih osebkov. Pričakovana (H_e) pa je heterozigotnost, kot bi jo pričakovali glede na opažene frekvence alelov pod predpostavko Hardy Weinbergovega ravnovesja. Heterozigotnost je dobro merilo stopnje genetske diverzitete na lokusu (Frankham in sod.2002).



Pričakovano heterozigotnost izračunamo po enačbi:

$$H_e = \left(n / n - 1 \right) \left(1 - \sum_{i=1}^{st.alelov} p_i^2 \right) \quad \dots (2)$$

p_i ... frekvenca i-tega alela.

n ... število osebkov v populaciji.

Osnova za izračun opažene heterozigotnosti pa je spodnja enačba (Hedrick, 2005):

$$H_o = \sum_{i \neq j}^n P_{ij} \quad \dots (3)$$

P_{ij} ... ocenjena frekvenca genotipa ij .

H_o ... vsota vseh frekvenc vseh heterozigotov.

Hardy-Weinbergovo ravnovesje

V neskončno velikih populacijah z naključnim parjenjem in v odsotnosti migracije, mutacije ter selekcije se frekvence genov in genotipov iz generacije v generacijo ne spreminjajo. Pravimo, da so frekvence alelov v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. To se vzpostavi že po eni generaciji naključnega parjenja, če na populacijo ne delujejo zgoraj omenjeni dejavniki. Odstopanja od H-W ravnovesja nam omogočajo odkrivati parjenje v sorodstvu, fragmentacijo populacij, migracijo in selekcijo (Frankham in sod.2002).

Testirali smo, ali so aleli v HW ravnovesju, kar torej pomeni, da sta pričakovana in opažena heterozigotnost po lokusih enaki. Naredili smo eksaktni test z 1.000000 koraki v Markovski verigi. Test je analogen Fisherjevemu eksaktnemu testu (Excoffier in sod., 2005).

Garza-Williamsonov indeks smo uporabili za ugotavljanje populacijskih »ozkih grl« - drastičnih zmanjšanj številčnosti populacije v preteklosti (Garza in Williamson, 2001). Izračunali smo jih le za 20 lokusov, saj imata lokusa G10H in Mu23 točkovno mutacijo, ki spremeni vzorec ponavljanja alelov na lokusu, tako da ta več ne ustreza SMM. Ker je ta



mutacijski model osnova za izračun Garza-Williamsonovega indeksa, le tega za omenjena lokusa nismo mogli izračunati.

Izračun indeksa temelji na spodaj zapisanem razmerju:

$$M = \frac{k}{R+1} \quad \dots (4)$$

k ... št. alelov na določenem lokusu.

R ... razpon velikosti lokusa v št. ponovitev.

* v izvorni obliki je bil imenovalac definiran z R ; leta 2005 je Excoffier R prištel 1, saj je prej v primeru monomorfnih vzorcev prišlo do deljenja z 0 (Excoffier in sod., 2005).

Razmerje M je dejansko razmerje med številom alelov, ki jih na določenem lokusu po SMM pričakujemo in številom alelov, ki jih dejansko opazimo. To razmerje se v populaciji, ki je preživela populacijsko ozko grlo, zmanjša. Redki aleli se ob zmanjšanju populacije zaradi genetskega drifta prej izgubijo kot bolj pogosti aleli (Garza in Williamson, 2001). Na lokusih se na mestih, kjer so se redki aleli izgubili, pojavijo vrzeli (Excoffier in sod., 2005), ki jih po SMM ne bi smelo biti. Vrednost Garza Williamsonovega indeksa naj bi bila nižja pri populacijah, ki so nedavno preživele populacijsko ozko grlo (Excoffier in sod., 2005).

Vezavno neravnovesje lokusov (Linkage disequilibrium; LD)

Vezavno neravnovesje je nenaključno združevanje alelov z različnih lokusov v gamete. Izraža se ob naključnih dogodkih v majhnih populacijah, v populacijah, ki so šle skozi ozko grlo, po nedavni združitvi različnih populacij, zaradi selekcije (Frankham in sod.2002) in parjenja v sorodstvu (Hedrick, 2005). Praviloma bi se morali aleli z različnih lokusov v veliki populaciji z naključnim parjenjem dedovati neodvisno (Frankham in sod.2002), kar smo preverili s testom vezavnega neravnovesja.



Mera odklona od naključnega združevanja med aleli na različnih lokusih je koeficient vezavnega neravnovesja D . Definiran je kot razlika produkta frekvenc *CIS* gamet (A_1B_1 , A_2B_2 ; r in u) in produkta *TRANS* gamet (A_1B_2 , A_2B_1 ; s in t):

$$D = ru - st \quad \dots (5)$$

V vezavnem ravnovesju je D enak 0. Najvišja vrednost D je 0,25 za *CIS* in najnižja -0,25 za *TRANS* gamete. Aleli z različnih lokusov frekvenc, ki jih pričakujemo v vezavnem ravnovesju, ne dosežejo v eni generaciji, ampak se jim le asimptotično približajo s stopnjo, ki je odvisna od frekvence rekombinacije lokusov.

$$D_t = D_0 (1 - c)^t \quad \dots (6)$$

D_t ... D v populaciji t

D_0 ... D na začetku

c ... stopnja rekombinacije

Stopnja, s katero se D približuje 0, torej vezavnemu ravnovesju, je odvisna od tega, kako ohlapno sta lokusa med seboj povezana (Frankham in sod.2002).

Kadar so geni v haploidnem stanju in je tako poznana gametična faza (haploidni organizmi, mtDNA, cpDNA, Y - kromosomi), lahko frekvence gamet in neravnovesje ocenimo neposredno. Za multiple heterozigote pa frekvenc gamet ni mogoče ugotoviti neposredno, saj ne moremo ugotoviti gametične faze. Vseeno pa je mogoče oceniti obseg vezavnega neravnovesja (Hedrick, 2005).

Kadar sta na lokusu več kot dva alela, je težje izraziti stopnjo povezave med lokusi. Koeficient vezavnega neravnovesja D je v tedaj razširjen kot (Hedrick, 2005):

$$D_{ij} = x_{ij} - p_i q_j \quad \dots (7)$$

x_{ij} ... ocena frekvenc gamet $A_i B_j$

p_i, q_i ... oceni frekvenc za vsakega od alelov A_i in B_j



Obstaja več različnih načinov, kako pridobiti iskane informacije za gamete z večjim številom alelov (multiple alelske gamete). Ena od direktnih metod (Hill, 1975; Hedrick, 1987) je podana s statistiko:

$$Q = n \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^l \left(\frac{D_{ij}^2}{p_i q_j} \right) \quad \dots (8)$$

k, l ... število alelov na lokusih A in B

n ... število vseh obstoječih gamet

p_i, q_j ... oceni frekvenc za vsakega od alelov A_i in B_j

Če je $D_{ij} = 0$, potem Q sledi χ^2 – distribuciji s $(k - 1)(l - 1)$ stopinjami prostosti. Ta pristop so različni avtorji razširili in posplošili za možnost ocenjevanja vezavnega neravnovesja za primere multiplih alelov dvojnih heterozigotov z neznano gametično fazo. Tako lahko z uporabo EM algoritma (Expectation of Maximization) ocenimo najbolj verjetne frekvence haplotipov, ki so odvisne od začetne točke (Hedrick, 2005).

Verjetnost opaženih podatkov D z dano frekvenco haplotipov p je v EM algoritmu podana kot:

$$L(D|p) = \sum_{i=1}^n \prod_{j=1}^{g_i} G_{ij} \quad \dots (9)$$

$\sum$... upošteva vse posameznike n v vzorcu

$\prod$... upošteva vse možne genotipe g teh posameznikov

$G_{ij} = 2p_i p_j$, če $i \neq j$ oz. $G_{ij} = 2p_i^2$, če $i = j$

$(p_i$ in q_j sta oceni frekvenc za vsakega od alelov A_i in B_j)

Vezavno neravnovesje med lokusi smo testirali s permutacijskim testom (s 1000 permutacijami), ki uporablja EM algoritem. Uporabljena metoda predvideva podatke z vezavnim neravnovesjem L_{H^*} po hipotezi, da so frekvence haplotipov produkti frekvenc alelov. Za podatke, ki so v vezavnem ravnovesju L_H , pa z uporabo EM oceni frekvence haplotipov. Test razmerja verjetij S je podan kot:



$$S = -2 \log (L_{H^*} / L_H) \quad \dots (10)$$

Dobljena vrednost S praviloma sledi χ^2 - distribuciji, kjer sta $(k_1 - 1) (k_2 - 1)$ stopinje prostosti. (k - število alelov na določenem lokusu) (Excoffier in sod., 2005).

Genetske distance

Genetska distanca je mera genetske diferenciacije v frekvencah alelov med dvema populacijama (Frankham in sod.2002). Štiri različne mere genetske distance smo uporabili za ugotavljanje razlik v frekvencah alelov med pari šestih časovnih populacij, na podlagi katerih bi lahko sklepali na diferenciacijo populacije v času. Le-te so podane v obliki matrik.

Nei-jevo standardno genetsko distanco (D_N) (Nei, 1978) smo izračunali po enačbi:

$$D_N = -\ln (I_N) \quad \dots (11)$$

I_N ... Nei-jev indeks podobnosti, ki ga izračunamo kot:

$$I_N = \frac{\sum_{i=1}^m p_{ix} p_{iy}}{\left[\left(\sum_{i=1}^m p_{ix}^2 \right) \left(\sum_{i=1}^m p_{iy}^2 \right) \right]^{1/2}} \quad \dots (12)$$

$p_{ix} (p_{iy})$... frekvenca alela i v populaciji x (y)

m ... število alelov na lokusu

Kadar so frekvence alelov v dveh populacijah podobne, je genetska podobnost blizu 1 in je genetska distanca blizu 0. Če je genetska podobnost enaka 0, pa je genetska distanca neskončno velika (Frankham in sod.2002).



Nei-jevo genetsko distanco (D_A) (Nei, 1983) smo izračunali po enačbi:

$$D = 1 - \sum_k^D \sum_i^m \frac{\sqrt{p_{ix} p_{iy}}}{D} \quad \dots (13)$$

D ... število lokusov

p_{ix} (p_{iy}) ... frekvenca i -tega alela na k -tem lokusu v populaciji x (y)

(Dieringer in Schlotterer, 2003)

Najmanjši delež skupnih alelov (ps) (Proportion of shared alleles) je za določen lokus definiran kot povprečje vsot minimalnih relativnih frekvenc vseh alelov med primerjanimi populacijami glede na vse lokuse. Pove nam torej najmanjši delež skupnih alelov dveh populacij. Izračunamo pa ga kot (Dieringer in Schlotterer, 2003):

$$ps = \frac{\sum_k^D \sum_{i_{\min}}^m p_{ix} p_{iy}}{D} \quad \dots (14)$$

D ... število lokusov

p_{ix} (p_{iy}) ... min frekvenca i -tega alela na k -tem lokusu v populaciji x (y)

$$Dps = -\ln(ps) \text{ ali } Dps = 1 - ps \quad \dots (15)$$

»**F statistike**« so kvantitativne mere zmanjšanja heterozigotnosti na različnih ravneh populacijske hierarhije. Fiksacijski indeks F_{ST} združuje učinke, ki jih povzroči delitev v subpopulacije znotraj regij in znotraj celotne populacije. F_{ST} je delež skupnega inbridinga v populaciji zaradi diferenciacije (genetski drift) med subpopulacijami. Inbriding opišemo s koeficientom inbridinga F , ki je verjetnost, da imata alela na lokusu posameznega osebk skupni izvor (Frankham in sod.2002). Če je F_{ST} enak 0 potem ni diferenciacije, če pa je enak 1, so populacije diferencirane in imajo fiksirane različne alele (Hartl in Clark, 1997).



$$F_{ST} = (H_T - H_s) / H_s = (2pq - 2p_iq_i) / 2pq \quad \dots (16)$$

$H_T, 2pq$... pričakovana heterozigotnost v celotni populaciji z naključnim parjenjem

$H_s, 2p_iq_i$... pričakovana heterozigotnost znotraj subpopulacij z naključnim parjenjem (Hartl)

Populacijsko specifični indeks F_{ST} lahko izračunamo tako, da je skupni F_{ST} tehtano povprečje populacijskih specifičnih F_{ST} vrednosti:

$$F_{ST} = \sum_{i=1}^P n_i F_{STi} / \sum_{i=1}^P n_i \quad \dots (17)$$

n ... število kopij genov vzorčenih v i -ti populaciji

P ... število vseh populacij

Za vsako od populacij pa F_{STi} izračunamo po spodnji enačbi (Excoffier in sod., 2005):

$$F_{STi} = \frac{1}{\frac{n}{\sigma_T^2}} \left[\frac{1}{P-1} SSD(AP) - \frac{1}{n_i} \frac{N}{N-P} SSD(WP_i) \right] \quad \dots (18)$$

$SSD(AP)$... vsota kvadratov deviacij med populacijami

$SSD(WP_i)$... vsota kvadratov deviacij znotraj populacij

σ_T ... pričakovana skupna varianca

N ... število vseh osebkov

n ... število kopij genov vzorčenih v i -ti populaciji

Variacije med F_{ST} vrednostmi dveh populacij lahko uporabimo kot trenutne mere genetske distance med populacijami (Excoffier in sod., 2005). Vrednosti F_{ST} smo izračunali za časovne populacije. F_{ST} vrednosti smo izračunali tudi za posamične lokuse v vseh šestih populacijah in poiskali statistično značilne razlike med njimi. Statistično značilnost smo testirali z 10.000 permutacijami.



Mantelov test smo uporabili za ugotavljanje korelacij med vsako od mer genetske distance in časovno komponento, na podlagi katerih lahko sklepamo o razlikah med časovnimi populacijami kot o posledicah časovne razdalje med njimi.

Mantelova statistika temelji na naslednji enačbi:

$$Z_{XY} = X * Y = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^i x_{ij} y_{ij} \quad \dots (19)$$

$x, y \dots$ spremenljivki na mestih i in j

S testom določimo vrednost Z_{XY} iz izvornih matrik. Nato pa permutiramo vrstice in stolpce ene matrike, druga pa ostaja nespremenjena (konstantna). Vedno znova izračunamo vrednost Z_{XY}^* za permutirano matriko ter jo primerjamo z vrednostjo Z_{XY} izvirne matrike, ki izhaja iz opaženih podatkov (Excoffier in sod., 2005).

V našem primeru matrika X iz zgornje enačbe izpolnimo s podatki o genetskih distancah, ki so rezultat prej omenjenih štirih različnih metod, matrika Y pa je izpolnjena s časovnimi razlikami med posameznimi časovnimi populacijami. V skladu z Mantelovo statistiko v našem primeru izvajamo permutacije na matriki X . Test smo izvedli s 1000 permutacijami.

Eksaktni test diferenciacije populacije

Z eksaktnim testom diferenciacije populacije smo želeli ugotoviti ali med šestimi časovnimi populacijami obstajajo večje razlike med frekvencami alelov, na podlagi katerih bi lahko potem sklepali na delitev populacije v subpopulacije.

Testirali smo hipotezo naključne distribucije k različnih genotipov med r populacijami. Test je analogen Fisherjevemu eksaktnemu testu s kontingenčno tabelo 2×2 , ki je razširjena na $k \times r$ (Excoffier in sod., 2005). Vsaka vrstica predstavlja populacijo in vsak stolec predstavlja alel. N_{ij} je število kopij alela j v populaciji i . Ničelna hipoteza je neodvisna od stolpca in vrstice in pravi, da populacija ni diferenciacirana (Raymond in Rousset, 1995). Za genotipsko obliko podatkov, kjer gametična faza ni znana, tabela vsebuje frekvence



genotipov vzorca. Tabela smo obdelali z 1.000.000 koraki v Markovski verigi, pri čemer smo ocenili verjetnost, da je preučevana tabela manj ali enako verjetna kot opažena konfiguracija vzorca pod ničelno hipotezo panmiksije (Excoffier in sod., 2005). Test smo izvedli za časovne populacije in za vsakega od 22 lokusov, ki smo jih prav tako primerjali med temi šestimi populacijami.

AMOVA - Analiza molekularne variance

S to metodo smo raziskovali genetsko strukturo populacije. Metoda temelji na analizi variance frekvence genov, ki sicer upošteva število mutacij med molekularnimi haplotipi, katere pa je potrebno najprej oceniti (Excoffier in sod., 2005).

Z določitvijo skupin populacij, definiramo določeno genetsko strukturo, ki jo želimo testirati. V našem primeru smo analizo izvedli za eno skupino populacij, ki je sestavljena iz šestih subpopulacij. V preglednici so prikazane poti izračunov kvadratov standardnih odklonov oz. varianc.

Preglednica 7: Prikaz izračunov kvadratov standardnih odklonov.

Izvor variacij	Stopinje prostosti	Vsota kvadratov/varianc (SSD)	Pričakovane srednje vrednosti kvadratov/ varianc
Med populacijami	$P - 1$	SSD(AP)	$n\sigma_a^2 + \sigma_b^2$
Znotraj populacij	$2N - P$	SSD(WP)	σ_b^2
Skupaj	$2N - 1$	SSD(T)	σ_T^2

* P je število vseh populacij; N je število vseh posameznikov; AP – med populacijami (**A**mong **P**opulations); WP – znotraj populacij (**W**ithin **P**opulations); T – skupaj (**T**otal); a je efekt subpopulacije; b je efekt variacij posameznikov



n in F_{ST} sta definirana kot:

$$n = \frac{2N - \sum_p \frac{2N_p^2}{N}}{P - 1} \quad \dots (20)$$

$$F_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2} \quad \dots (21)$$

Statistično značilnost F_{ST} in σ_a^2 smo s pomočjo računalniškega programa Arlequin (Excoffier in sod., 2005) testirali z neparametričnim permutacijskim testom, ki temelji na permutaciji posameznih genotipov med populacijami. Po vsakem krogu permutacij ponovno izračunamo vse statistike, da dobimo njihovo ničelno distribucijo (Excoffier in sod., 2005). Test smo izvedli s 1000 permutacijami. Tudi z metodo analize variance smo obravnavali vsak lokus posebej.

Informativnost mikrosatelitskih markerjev

O informativnosti lokusa nam največ pove efektivno število alelov (Frankham in sod.2002), ki smo ga izračunali po spodnji enačbi:

$$n_e = \frac{1}{\sum p_i^2} \quad \dots (22)$$

p_i ... frekvenca i -tega alela

To je število alelov, ki bi v primeru enakomernega pojavljanja, rezultiralo kot opažena homozigotnost. Je manjše od dejanskega števila alelov, razen če imajo vsi aleli enako frekvenco (Frankham in sod.2002). To število korigira celotno število alelov glede na njihovo pogostost (Skrbinšek in sod., 2007).



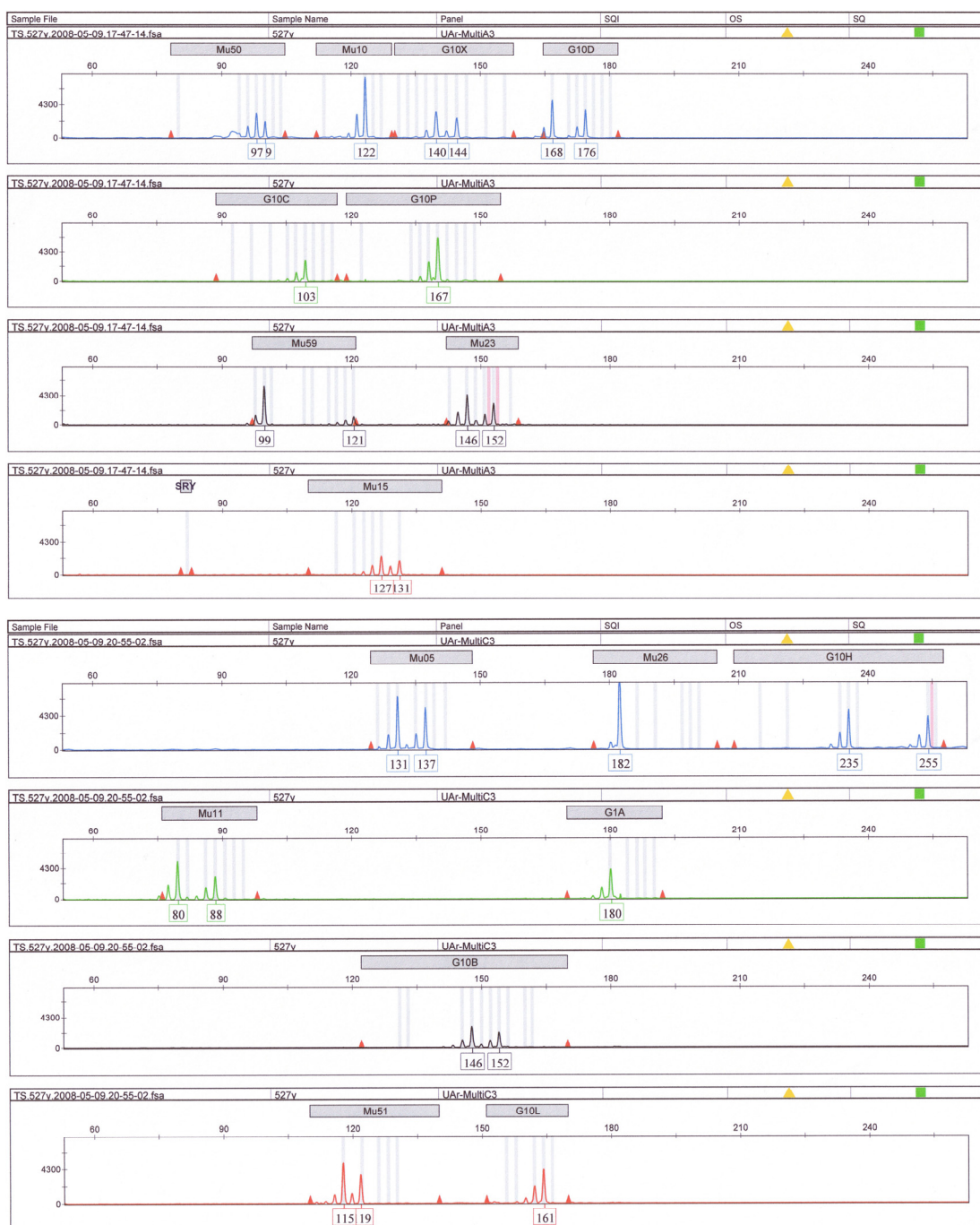
4 REZULTATI

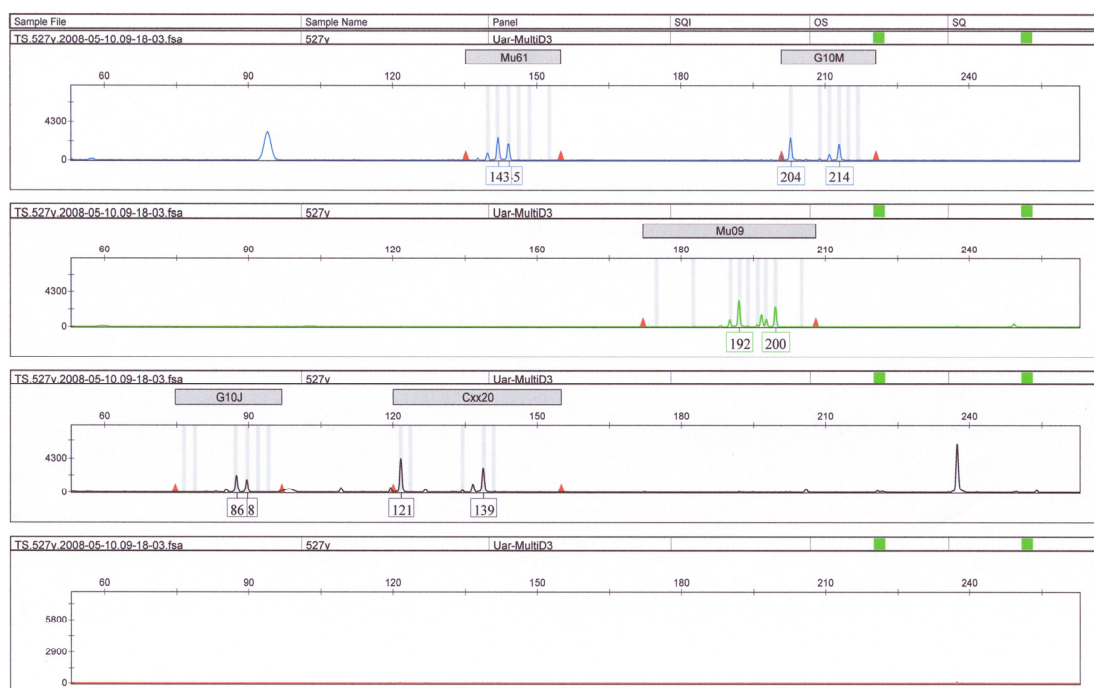
4.1 POPULACIJSKO GENETSKI PARAMETRI

Na 22 polimorfnih mikrosatelitskih lokusih in na Y spolni kromosom vezan SRY lokus smo genotipizirali 487 tkivnih vzorcev medvedov. Na Sliki 11 je primer elektroferogramskega izpisa genotipa za vzorec 527y. Za 17 vzorcev (3,4%) nismo uspeli pridobiti popolnega genotipa.

Delež napake genotipizacije v vseh vzorcih na vseh lokusih smo ocenili na 1,7%. Število vzorcev z eno napako v celotnem genotipu smo tako ocenili na 8,3. Ta ocena velja samo za vzorce, ki so bili amplificirani le enkrat. Najpogostejša zaznana napaka je bila, da smo lažni alel (FA) potrdili kot pravi alel. Večkrat nam je težave povzročal tudi lokus G10H, ki se nahaja na delu, kjer se pogostokrat pojavijo težave z dolžinskim standardom in tako ne moremo določiti natančne dolžine alelov. Na tem lokusu (v primerjavi z ostalimi) največjo napako (1,54%) pričakujemo zaradi izpada alelov (alelic drop out). Največji delež napake na lokus (0,81%) posledično odpade prav na ta lokus. Na lokusu G10P pa je največja možnost napake (0,12%) zaradi potrditve lažnih alelov (FA) kot pravih. Ker ima lokus težavo z adenilacijo (artefakt PCR zaradi nepopolnega dodajanja končnega adenina amplificiranemu fragmentu DNA), je tako pri večini vzorcev treba dobro razmisliti, kaj je pravzaprav pravi alel.





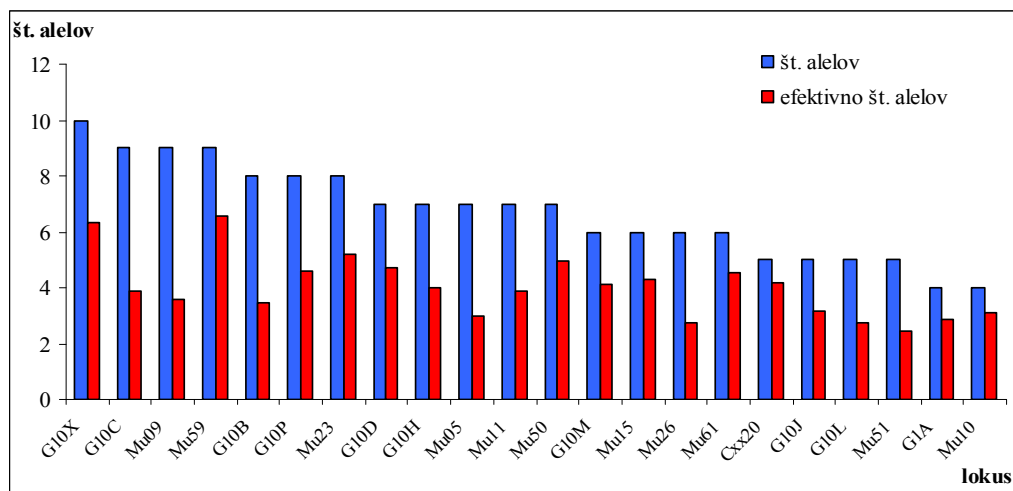


Slika 11: Elektroferogramski izpis genotipa za samico 527y odstreljeno 23.6.2007 v lovski družini Lož - Stari trg.

Mere genske raznolikosti

Na vseh lokusih smo dobili skupaj 148 različnih alelov. Število alelov na lokusih se giblje od 4 do 10. Povprečno število alelov na lokus je 6,7, povprečno število učinkovitih alelov na lokus pa 4,0. Iz Slike 12 je razvidno, da ima največ alelov lokus G10X. Najbolj informativen pa je vseeno lokus Mu59, ki ima najvišje število učinkovitih alelov (G10X ima 3 zelo redke alele). Najmanj informativen lokus je Mu51 s skupaj petimi aleli (z dvema zelo redkima in dvema zelo pogostima aleloma).





Slika 12: Število alelov in efektivno število alelov na posamznem lokusu v populaciji.

Frekvence alelov

V populaciji smo na vseh 22 lokusih dobili 43 alelov (29,1%), ki se pojavljajo s frekvenco manjšo od 0,053 (alel smo opazili 50 krat ali manj, kar je 10,3% opažanj ali manj) (Preglednica 8). Največ takšnih alelov ima lokus G10C, Cxx20 pa tako redkih alelov nima. V povprečju ima lokus 2,05 redkih alelov.



Preglednica 8: Redki aleli na posameznem lokusu

<i>Lokus</i>	<i>Redki aleli</i>	<i>Število redkih alelov</i>
<i>Cxx20</i>	-	0
<i>G10B</i>	144, 154	2
<i>G10C</i>	89, 95, 105, 107, 109	5
<i>G10D</i>	178	1
<i>G10H</i>	221, 233, 257	3
<i>G10J</i>	90, 92	2
<i>G10L</i>	159, 163	2
<i>G10M</i>	214, 218	2
<i>G10P</i>	173, 175	2
<i>G10X</i>	138, 150, 154	3
<i>G1A</i>	186	1
<i>Mu05</i>	127, 139, 141	3
<i>Mu09</i>	194, 196, 198, 206	4
<i>Mu10</i>	126	1
<i>Mu11</i>	82, 86, 94	3
<i>Mu15</i>	123, 125	2
<i>Mu23</i>	142	1
<i>Mu26</i>	190, 198, 200	3
<i>Mu50</i>	101, 103	2
<i>Mu51</i>	127	1
<i>Mu59</i>	117	1
<i>Mu61</i>	153	1
<i>SKUPAJ</i>	-	43

Dobili smo 15 alelov (Preglednica 9), ki se pojavljajo s frekvenco 0,35 ali več (vsaj 324 opazanj oz. 66,7%). Opaziti jih je bistveno manj kakor redkih, saj smo v tem primeru dobili le 10,1% alelov. V povprečju ima vsak lokus 0,64 tako pogostih alelov. Najpogostejši alel je na lokusu Mu26, ki smo ga opazili kar 487 krat. Tako visoko frekvenco lahko pripišemo homozigotnosti osebkov.



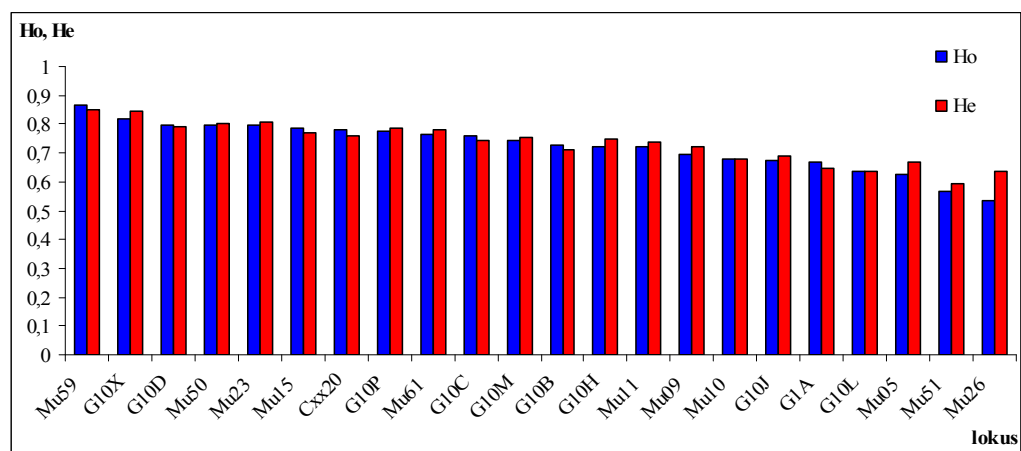
Preglednica 9: Pogosti aleli na posameznem lokusu

<i>Lokus</i>	<i>Pogosti aleli</i>	<i>Število pogostih alelov</i>
<i>Cxx20</i>	-	0
<i>G10B</i>	146	1
<i>G10C</i>	103	1
<i>G10D</i>	-	0
<i>G10H</i>	256	1
<i>G10J</i>	88	1
<i>G10L</i>	161	1
<i>G10M</i>	216	1
<i>G10P</i>	167	1
<i>G10X</i>	-	0
<i>G1A</i>	180	1
<i>Mu05</i>	135	1
<i>Mu09</i>	192	1
<i>Mu10</i>	112	1
<i>Mu11</i>	-	0
<i>Mu15</i>	-	0
<i>Mu23</i>	-	0
<i>Mu26</i>	182	1
<i>Mu50</i>	-	0
<i>Mu51</i>	119, 123	2
<i>Mu59</i>	-	0
<i>Mu61</i>	-	0
<i>SKUPAJ</i>	-	15

Genska diverziteta

Vrednosti opažene heterozigotnosti po lokusih H_o so med 0,54 in 0,87 (Preglednica 10). Večina lokusov ima opaženo heterozigotnost H_o sicer nad 0,6. Samo za lokusa Mu26 in Mu50 je nižja, vendar pa ni manjša od 0,5 (Slika 13). Na lokusih Cxx20, G10B, G10C, G10D, G1A, Mu15 in Mu59 je opažena heterozigotnost celo malenkostno višja od pričakovane. Povprečna vrednost opažene heterozigotnosti na vseh lokusih je 0,72, pričakovane pa 0,73.



Slika 13: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost po lokusih.

Preglednica 10: Osnovni parametri, ki opisujejo gensko diverziteto rjavih medvedov v Sloveniji

<i>Lokus</i>	<i>št. alelov</i>	<i>efektivno št. alelov</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>min. alel</i>	<i>maks. alel</i>	<i>razpon alelov [(GT)_n]</i>	<i>GW indeksi</i>
<i>Cxx20</i>	5	4,177	0,778	0,760	121	141	10	0,455
<i>G10B</i>	8	3,452	0,730	0,710	130	154	12	0,615
<i>G10C</i>	9	3,869	0,761	0,743	89	109	10	0,818
<i>G10D</i>	7	4,721	0,798	0,790	168	182	7	0,875
<i>G10H</i>	7	3,994	0,672	0,690	221	257	-	-
<i>G10J</i>	5	3,192	0,674	0,687	78	92	7	0,625
<i>G10L</i>	5	2,762	0,639	0,638	153	163	5	0,833
<i>G10M</i>	6	4,090	0,744	0,756	204	218	7	0,750
<i>G10P</i>	8	4,592	0,778	0,784	147	175	14	0,533
<i>G10X</i>	10	6,351	0,818	0,843	132	154	11	0,833
<i>G1A</i>	4	2,851	0,669	0,650	180	190	5	0,667
<i>Mu05</i>	7	2,994	0,624	0,668	127	141	7	0,875
<i>Mu09</i>	9	3,587	0,694	0,723	174	206	16	0,529
<i>Mu10</i>	4	3,125	0,680	0,680	112	126	7	0,500
<i>Mu11</i>	7	3,855	0,723	0,740	80	94	7	0,875
<i>Mu15</i>	6	4,319	0,787	0,769	117	131	7	0,750
<i>Mu23</i>	8	5,186	0,749	0,770	142	156	-	-
<i>Mu26</i>	6	2,739	0,537	0,634	182	200	9	0,600
<i>Mu50</i>	7	4,968	0,796	0,800	79	103	12	0,539
<i>Mu51</i>	5	2,453	0,566	0,593	115	127	6	0,714
<i>Mu59</i>	9	6,588	0,866	0,850	97	121	12	0,692
<i>Mu61</i>	6	4,545	0,764	0,780	141	153	6	0,857
<i>povprečje</i>	6,727	4,019	0,720	0,730	-	-	10,318	0,697
<i>s.d.</i>	1,695	1,105	0,082	0,069	-	-	6,399	0,141

**H_o* in *H_e* – opažena in pričakovana heterozigotnost; min in maks alel – najmanjša in največja dolžina alela na lokusu; razpon alelov ((dolžina najdaljšega alela - dolžina najkrajšega)/dolžina motiva); GW – Garza Williamsonov indeks



Za populacijo so statistično značilna odstopanja od Hardy Weinbergovega ravnovesja na treh lokusih (Preglednica 11): G10B ($P = 0,00531$), G10X ($P = 0,04951$) in Mu26 ($P < 0,00001$).

Preglednica 11: Opažena in pričakovana heterozigotnost ter P -vrednosti izračunane v eksaktnem testu Hardy Weinbergovega ravnovesja

<i>Lokus</i>	H_o	H_e	<i>Vrednost - P</i>	<i>S.D.</i>
<i>Cxx20</i>	0,778	0,760	0,91186	0,00065
<i>G10B</i>	0,730	0,710	0,00531	0,00024
<i>G10C</i>	0,761	0,743	0,14234	0,00103
<i>G10D</i>	0,798	0,790	0,79782	0,00101
<i>G10H</i>	0,672	0,690	0,12411	0,00081
<i>G10J</i>	0,674	0,687	0,44305	0,00105
<i>G10L</i>	0,639	0,638	0,09094	0,00066
<i>G10M</i>	0,744	0,756	0,24941	0,00098
<i>G10P</i>	0,778	0,784	0,20403	0,00099
<i>G10X</i>	0,818	0,843	0,04951	0,00057
<i>G1A</i>	0,669	0,649	0,14879	0,00081
<i>Mu05</i>	0,623	0,668	0,11130	0,00088
<i>Mu09</i>	0,694	0,723	0,26803	0,00092
<i>Mu10</i>	0,680	0,680	0,93879	0,00088
<i>Mu11</i>	0,723	0,740	0,17968	0,00124
<i>Mu15</i>	0,787	0,769	0,24263	0,00100
<i>Mu23</i>	0,749	0,770	0,69308	0,00093
<i>Mu26</i>	0,537	0,634	0,00000	0,00000
<i>Mu50</i>	0,796	0,800	0,72565	0,00106
<i>Mu51</i>	0,566	0,593	0,05300	0,00075
<i>Mu59</i>	0,866	0,850	0,94706	0,00057
<i>Mu61</i>	0,764	0,780	0,70872	0,00105

* Obarvana so statistično značilna odstopanja H_o od H_e ($P < 0,05$).

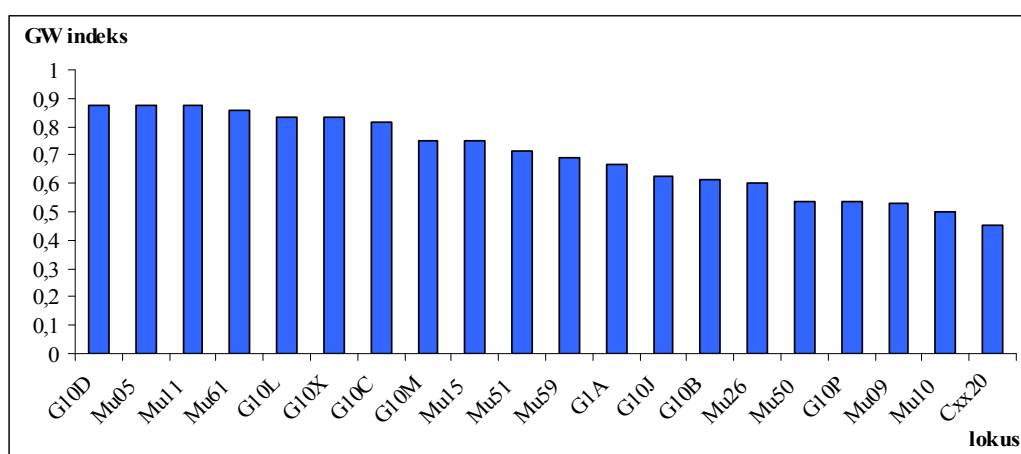
Garza Williamsonovi indeks (GW indeks)

GW indekse smo izračunali le za 20 lokusov. Lokusa G10H in Mu23 imata, kot smo že omenili v opisu uporabljenih metod, točkovno mutacijo, ki spremeni vzorec ponavljanja alelov na lokusu, tako da ta ne ustreza več SMM. Ker je ta mutacijski model osnova za



izračun Garza-Williamsonovega indeksa, le tega za omenjena lokusa nismo mogli izračunati.

Najnižji GW indeks ima lokus Cxx20 (0,45). Nižje vrednosti indeksa od 0,6 imajo še lokusi G10P (0,53), Mu09 (0,53), Mu10 (0,50), Mu26 (0,60) in Mu50 (0,54). Najvišji indeks pa imata lokusa G10D in Mu11 (0,88) (Slika 14). Povprečni GW indeks je 0,70 (Preglednica 10).

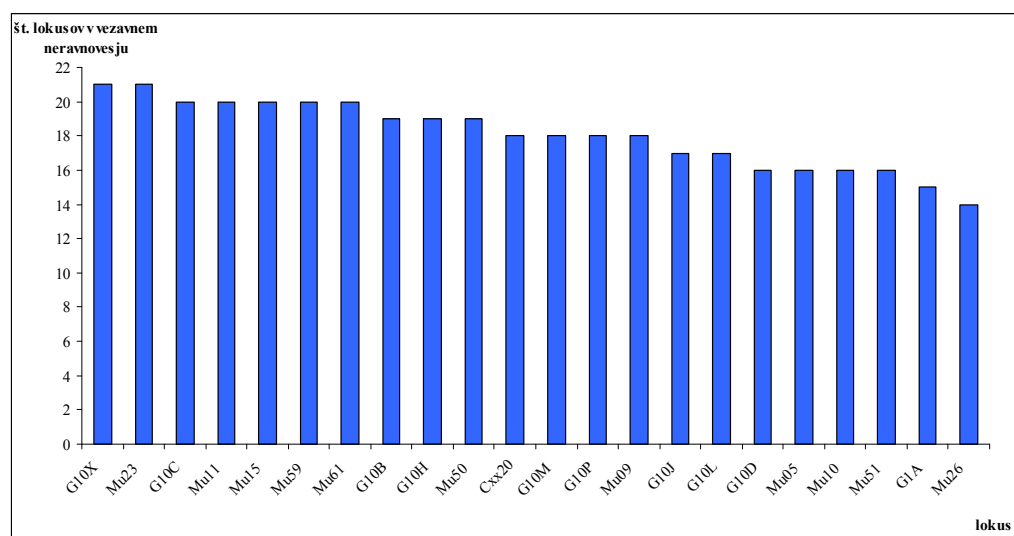


Slika 14: Garza Williamsonovi indeksi za posamezne lokuse

Vezavno neravnovesje lokusov

V populaciji je vezavno neravnovesje med lokusi visoko (Slika 15 in Slika 16), saj je vsak izmed 22 lokusov v vezavnem neravnovesju s 14 ali več lokusi (66,7% vseh lokusov). Tako sta G10X in Mu23 v vezavnem neravnovesju z vsemi preostalimi 21 lokusi. Z najmanj lokusi je v vezavnem neravnovesju lokus Mu26 (14 lokusov). V povprečju je vsak lokus v vezavnem neravnovesju z 18,1 lokusom (86,1% vseh lokusov).





Slika 15: Število lokusov, s katerimi je posamezni lokus v vezavnem neravnovesju



Jelenič M. Genetska pestrost rjavega medveda (*Ursus arctos*) v Sloveniji.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2008

Lokus	Cxx20	G10B	G10C	G10D	G10H	G10J	G10L	G10M	G10P	G10X	G1A	Mu05	Mu09	Mu10	Mu11	Mu15	Mu23	Mu26	Mu50	Mu51	Mu59	Mu61
Cxx20	*	+	+	–	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G10B	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+
G10C	+	+	*	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G10D	–	+	+	*	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	–
G10H	+	+	+	+	*	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G10J	–	+	–	+	+	*	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+
G10L	+	+	+	–	–	+	*	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
G10M	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+
G10P	+	+	+	+	+	+	–	+	*	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+
G10X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G1A	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	*	+	–	+	+	+	+	+	–	–	+	+
Mu05	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	*	+	–	+	+	+	+	–	–	–	+
Mu09	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	*	–	+	+	+	+	+	+	+	+
Mu10	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	–	*	–	+	+	–	+	+	+	+
Mu11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	*	+	+	+	+	+	+	+
Mu15	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+	+
Mu23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+
Mu26	+	–	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	+	+	+	*	+	–	+	+
Mu50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+
Mu51	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	+	*	+	+
Mu59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+
Mu61	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*

Slika 16: Vezavno neravnovesje med pari lokusov v populaciji. + lokusa sta v vezavnem neravnovesju; – lokusa nista v vezavnem neravnovesju.



4.2 GENETSKE RAZLIKE MED ČASOVNIMI SKUPINAMI IN ČASOVNA STRUKTURA POPULACIJE

Pri primerjavi frekvenc alelov na posameznem lokusu med šestimi časovnimi populacijami smo med njimi opazili precejšnje razlike (nekaj primerov je v Prilogi F). Z različnimi metodami (različne mere genetske distance, Mantelov test, AMOVA, test diferenciacije populacije) smo preverili, ali opažene razlike kažejo na neko pomembno dogajanje v slovenski populaciji medvedov oziroma ali so le posledica naključja.

Mere genetske distance in Mantelov test

Kadar so frekvence alelov med populacijami enake, so vse genetske distance enake nič. Najvišja vrednost distanc je enaka 1 (Kalinowski, 2002). V našem primeru so vse mere genetskih distanc med časovnimi populacijami blizu vrednosti 0 (Preglednice od 12 do 15), kar kaže, da so frekvence alelov med časovnimi populacijami zelo podobne.

Preglednica 12: Mere Nei-jeve standardne genetske distance (Nei, 1978) med pari populacij

<i>Nei, 1978</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2006</i>	<i>2007</i>	<i>2008</i>
<i>2003</i>	0,00%	0,25%	0,01%	0,51%	0,67%	0,50%
<i>2004</i>	0,25%	0,00%	0,37%	0,09%	-0,16%	-0,34%
<i>2005</i>	0,01%	0,37%	0,00%	0,25%	0,14%	0,29%
<i>2006</i>	0,51%	0,09%	0,25%	0,00%	0,10%	0,33%
<i>2007</i>	0,67%	-0,16%	0,14%	0,10%	0,00%	-0,16%
<i>2008</i>	0,50%	-0,34%	0,29%	0,33%	-0,16%	0,00%

Preglednica 13: Mera Nei-jeve genetske distance (Nei, 1983) med pari populacij.

<i>Nei, 1983</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2006</i>	<i>2007</i>	<i>2008</i>
<i>2003</i>	0,00%	1,36%	1,14%	1,24%	1,40%	1,78%
<i>2004</i>	1,36%	0,00%	1,13%	0,83%	0,82%	1,27%
<i>2005</i>	1,14%	1,13%	0,00%	0,79%	0,90%	1,52%
<i>2006</i>	1,24%	0,83%	0,79%	0,00%	0,71%	1,31%
<i>2007</i>	1,40%	0,82%	0,90%	0,71%	0,00%	1,28%
<i>2008</i>	1,78%	1,27%	1,52%	1,31%	1,28%	0,00%



Preglednica 14: Najmanjši delež skupnih alelov med pari populacij

<i>POSA</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2006</i>	<i>2007</i>	<i>2008</i>
<i>2003</i>	0,00%	10,83%	9,92%	10,46%	11,13%	12,17%
<i>2004</i>	10,83%	0,00%	9,55%	8,45%	8,30%	9,47%
<i>2005</i>	9,92%	9,55%	0,00%	8,34%	8,79%	10,78%
<i>2006</i>	10,46%	8,45%	8,34%	0,00%	7,71%	10,15%
<i>2007</i>	11,13%	8,30%	8,79%	7,71%	0,00%	9,37%
<i>2008</i>	12,17%	9,47%	10,78%	10,15%	9,37%	0,00%

Preglednica 15: Mere F statistike (F_{ST}) med pari populacij.

<i>Fst</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2006</i>	<i>2007</i>	<i>2008</i>
<i>2003</i>	0,00%	0,08%	-0,02%	0,17%	0,22%	0,16%
<i>2004</i>	0,08%	0,00%	0,13%	0,03%	-0,05%	-0,11%
<i>2005</i>	-0,02%	0,13%	0,00%	0,09%	0,05%	0,10%
<i>2006</i>	0,17%	0,03%	0,09%	0,00%	0,04%	0,13%
<i>2007</i>	0,22%	-0,05%	0,05%	0,04%	0,00%	-0,06%
<i>2008</i>	0,16%	-0,11%	0,10%	0,13%	-0,06%	0,00%

Z Mantelovim testom (Preglednica 16) nismo zaznali nobene statistično značilne korelacije med posamičnimi merami distančnih matrik in časom.

Preglednica 16: Rezultati Mantelovega testa za posamezno mero genetske distance

<i>Mantelov test</i>	<i>Nei-jeva standardna genetska distanca (1978)</i>	<i>Nei-jeva distanca (1983)</i>	<i>Najmanjši delež skupnih alelov</i>	<i>Fst</i>
<i>No. of smaller rand rYI</i>	752	975	972	727
<i>No. of equal rand rYI</i>	3	2	3	3
<i>No. of larger rand rYI</i>	245	23	25	270
<i>P(rYI rand >= rYIobs)</i>	0,248	0,025	0,028	0,273

Diferenciacija populacije

Pri eksaktnem testu diferenciacije populacije smo skupno naredili 330 testov (5×6 korelacij med časovnimi populacijami in $*22$ za vsak lokus/2). Pri verjetnosti $P < 0,05$, smo dobili nekaj rezultatov testov, ki so se zdeli statistično značilni. Več kot izvedemo testov na setu podatkov, večja je verjetnost, da bomo zavrnili ničelno hipotezo, ki je pravilna (Abdi, 2007). Dobljene rezultate lahko pripišemo posledici logičnega testiranja hipoteze, pri



katerem ničelno hipotezo zavrnamo, če bi bili opaženi dogodki po njej malo verjetni. Ampak, večje kot je število testov, večja je verjetnost, da bomo opazili redke dogodke. Če tega ne upoštevamo, lahko zmotno »zaznamo« kot statistično značilen nek učinek, ki ga pravzaprav ni. Ta problem imenujemo inflacija stopnje alfa (vrednosti P). Da se zavarujemo pred to težavo, stopnjo alfa v primerih večjega števila testov na enem setu podatkov nadzorovano zmanjšamo. Tako zmanjšamo možnost napake, hkrati pa moramo pa biti tudi bolj pozorni, saj je hkrati težje odkriti tudi dejanske redke učinke (Abdi, 2007).

V našem primeru smo tako pri eksaktnem testu diferenciacije časovnih populacij na posameznem lokusu po Bonferronijevi korekcijski metodi zmanjšali vrednost P na $P < 0,00015$ (izračun: $(1/330) \cdot 0,05$) in pri eksaktnem testu diferenciacije časovnih populacij na vseh lokusih skupaj na vrednost $P < 0,003$ (izračun: $(1/15) \cdot 0,05$). Pri takšnih vrednostih P nismo dobili nobenih statistično značilnih rezultatov. Zaradi možnosti, da bi spregledali dejansko prisoten redek dogodek, smo stroge zahteve Bonferronijeve metode omilili po Holm-Bonferronijevi korekcijski metodi, vendar še vedno noben izmed testov ni kazal statistične značilnosti na stopnji $P=0,05$ za vse teste.

Za posamične lokuse med pari populacij smo izračunali tudi F_{ST} vrednosti. Po enakem postopku določanja statistično značilnih rezultatov tudi med pari populacij po lokusih nismo dobili nobenih statistično značilnih razlik.

AMOVA

Testirali smo skupino šestih časovnih subpopulacij in preverjali genetsko strukturo. Ugotovili smo (Preglednica 17), da je le 0,06% skupne variance posledica variance med subpopulacijami, preostanek je varianca znotraj subpopulacij. Tako lahko sklepamo, da diferenciacije med subpopulacijami ni. Tudi analiza variance po lokusih se ne razlikuje, saj dobimo v končni fazi enake variance, ki pa so izračunane kot tehtano povprečje varianc posameznih lokusov (Preglednica 18).



Preglednica 17: AMOVA

<i>Izvor variance</i>	<i>Stopinje prostosti</i>	<i>Vsota varianc (SSD)</i>	<i>Variance komponent</i>	<i>Delež skupne variance (%)</i>
<i>Med populacijami</i>	5	44,112	0,005 Va	0,06
<i>Znotraj populacij</i>	984	7901,992	8,031 Vb	99,94
<i>Skupaj</i>	989	7946,104	8,036	
<i>Fiksacijski indeks F_{ST}</i>	0,001			

Preglednica 18: AMOVA rezultati, kot tehtano povprečje lokusov

<i>Izvor variance</i>	<i>Stopinje prostosti</i>	<i>Variance komponent</i>	<i>Delež skupne variance (%)</i>
<i>Med populacijami</i>	44,649	0,005	0,066
<i>Znotraj populacij</i>	7923,594	8,075	99,934
<i>Skupaj</i>	7968,244	8,080	



5 RAZPRAVA

Mikrosatelitski markerji, ki smo jih uporabili v raziskavi, so se pri severno-zahodni dinarski populaciji medvedov izkazali kot zelo polimorfni. Število alelov na lokus je podobno številu alelov, ki so jih našli v raziskavah skandinavske (Waits in sod., 2000), severno ameriških (Paetkau in sod., 1998) in cirkumpolarnih (Paetkau in sod., 1999) populacij medvedov.

Na vseh 22 lokusih smo ugotovili razmeroma visoko stopnjo genske variabilnosti ($H_e = 0,73$) in alelske diverzitete ($A = 6,73$). Pri vseh šestih časovnih populacijah (Priloga E) smo dobili podobne vrednosti genske variabilnosti (H_e od 0,728 do 0,739). Tudi vrednosti H_o se gibljejo med 0,724 in 0,740. Izjema je le populacija 2004, pri kateri je H_o nekoliko nižja ($H_o = 0,691$). H_o je v primerjavi z H_e bolj podvržena velikosti vzorca (Frankham in sod., 2002) in lahko sklepamo, da so opažene razlike posledica vzorčenja. Za primerjavo z drugimi populacijami medvedov v svetu smo izračunali povprečno H_e in A za 8 lokusov: G1A, G10B, G10C, G10D, G10L, G10M, G10P in G10X. V Preglednici 19 so podatki za primerjane populacije.



Preglednica 19: Genska in alelska diverziteteta na osmih mikrosatelitskih lokusih nekaterih medvedjih populacij z različnih območij.

Populacija	Št. osebkov v vzorcu	A (SE)	H_e (SE)	Vir
<i>Alaska Range, Alaska</i>	28	-	0,78 (-)	Waits in sod., 2000
<i>Kluane, Yukon</i>	50	7,38 (0,56)	0,76 (0,025)	Paetkau in sod., 1998
<i>Richardson Mountains, NWT</i>	119	7,50 (0,63)	0,76 (0,030)	Paetkau in sod., 1998
<i>Brooks Range, Alaska</i>	148	7,63 (0,50)	0,75 (0,019)	Paetkau in sod., 1998
Slovenija (SZ Dinaridi)	487	7,13 (1,70)	0,74 (0,069)	Naša raziskava, 2008
<i>Skandinavija - NS</i>	108	6,13 (0,84)	0,70 (0,105)	Waits in sod., 2000
<i>Skandinavija - NN</i>	29	5,38 (1,41)	0,69 (0,071)	Waits in sod., 2000
<i>Flathead River, BC/MT</i>	40	6,50 (0,71)	0,69 (0,027)	Paetkau in sod., 1998
<i>Skandinavija - S</i>	156	5,00 (1,07)	0,68 (0,071)	Waits in sod., 2000
<i>Kuskokwim Range, Alaska</i>	55	6,13 (0,44)	0,68 (0,026)	Paetkau in sod., 1998
<i>Skandinavija - M</i>	88	5,50 (1,20)	0,67 (0,052)	Waits in sod., 2000
<i>East Slope, Alberta</i>	45	7,00 (0,82)	0,67 (0,062)	Paetkau in sod., 1998
<i>West Slope, Alberta</i>	41	6,38 (0,56)	0,68 (0,036)	Paetkau in sod., 1998
<i>Admiralty Island, Alaska</i>	30	-	0,63 (-)	Waits in sod., 2000
<i>Paulatuk Alaska</i>	58	5,75 (0,88)	0,65 (0,065)	Paetkau in sod., 1998
<i>Coppermine, NWT</i>	36	5,75 (1,03)	0,61 (0,073)	Paetkau in sod., 1998
<i>Yellowstone, MT/WY</i>	57	4,38 (0,60)	0,55 (0,081)	Paetkau in sod., 1998
<i>Baranof and Chicagof Is, Alaska</i>	35	-	0,49 (-)	Waits in sod., 2000
<i>Kodiak Island, Alaska</i>	34	2,13 (0,35)	0,27 (0,098)	Paetkau in sod., 1998
Črni medvedi				
<i>West Slope</i>	116	9,50 (0,91)	0,81 (0,017)	Paetkau in sod., 1998
<i>Newfoundland I.</i>	33	3,00 (0,33)	0,41 (0,055)	Paetkau in sod., 1998

Opazimo lahko, da je H_e za 8 mikrosatelitskih loksov nekoliko večja kot za vseh 22. Glede na to, da naj bi konec 19. stoletja v Sloveniji živel le okoli 30-40 osebkov rjavega medveda, ima v primerjavi s skandinavsko populacijo in s populacijo iz Yellowstona presenetljivo visoko stopnjo genske diverzitete. Tudi ti dve populaciji sta bili namreč močno zdesetkani. V Skandinaviji je populacija razdeljena na 4 subpopulacije in v vsaki od njih se je okoli leta 1930 v povprečju ohranilo le 35 osebkov. Podatki o morebitnem prehodu ozkega grla bi bili bolj primerljivi, če bi imeli podatke za celotno dinarsko populacijo, katere del je tudi slovenska (Swenson in sod., 2000). Medvedi iz Yellowstona pa so izolirani od leta 1920. Velikost populacije so leta 1972 ocenili na 139 medvedov. Populacija je izgubila od 15 do 20% H_e (Waits in sod., 2000). Tako imajo v primerjavi z



njimi že skandinavski medvedi visoko stopnjo genske diverzitete (Waits in sod., 2000). Waitsova in sod. (2000) razlog za ohranitev visoke genske diverzitete v skandinavski populaciji vidijo v tem, da je šla skandinavska populacija skozi ozko grlo razdeljena v štiri subpopulacije in da je na vsako od njih neodvisno vplival genetski drift, ki je v vsaki naključno ohranil različne kombinacije alelov. Če so neodvisnim učinkom genetskega drifta sledili hitri porasti v številčnosti populacije in genski pretok med subpopulacijami, se je v populaciji ohranila visoka genska diverziteteta. Nasprotno pa je pri populaciji v Yellowstonu pojavil samo en učinek genetskega drifta, ki je bil dolgo zelo izražen (številčnost populacije je bila dolgo časa nizka). Podobno, vendar še bolj ekstremno sliko vidimo pri otoških populacijah Kodiak, Baranof in Chichagof, ki so precej daleč od celine. V takšnih primerih je poleg genetskega drifta tudi močan učinek ustanovitelja (Founder effect), saj je te populacije najverjetneje osnovalo zelo majhno število osebkov (Paetkau in sod., 1998).

Po dosedanjih raziskavah ima dinarska populacija dva haplotipa mtDNA, ki jih ni v drugih evropskih populacijah (Taberlet in sod., 1994). Ne vemo pa, ali v dinarski populaciji obstajajo subpopulacije, tako kot v Skandinaviji. Pričakovali bi lahko določeno stopnjo diferenciacije populacije zaradi geografske razdalje, težko pa bi pričakovali geografsko jasno opredeljeno strukturo. Za tovrstne raziskave bi morali primerjati skupine osebkov iz različnih delov Dinaridov, kar bi bilo v prihodnje smiselno storiti.

Ne glede na to, da je trenutno večji del dinarske populacije z genetskega vidika še neraziskan, je smiselno iskati razlog za visoko gensko diverziteteto slovenskega dela populacije v povezavi s preostalim, večjim delom dinarske populacije. Medvedi iz Slovenije nenehno prehajajo na Hrvaško in obratno, kar je znano iz podatkov telemetrije že od leta 1986 (Krže, 1988). To nam sicer potrjujejo tudi podatki o velikosti domačih okolišev, ki se gibljejo v rangi velikosti za samce 99-575 km² in samice 58-108 km² (Kaczensky in Knauer, 2000) in pa tudi podatki iz študije 2004, kjer so Skrbinšek in sod. pridobili podatke iz sosednje Hrvaške o smrtih medvedov, katerih iztrebki so bili najdeni v Sloveniji. Slovenska populacija medvedov je torej povezana s hrvaško, ki je ocenjena na okoli 400 medvedov na območju velikem 9 800 km² in so pod podobno upravljalno shemo kot v centralnem območju v Sloveniji (Huber in sod., 2000). Glede na to, da so



Dinaridi eden izmed največjih nefragmentiranih gozdnih kompleksov v Srednji Evropi in glede na to, da je bila večina dinarskih držav združena v Jugoslavijo (podobno upravljanje s populacijo v velikem delu območja), lahko podobne migracije in povezave med populacijami v posameznih državah pričakujemo vzdolž celotnega dinarskega gorstva. Če prihaja do določene stopnje genetske diferenciacije z razdaljo, lahko visoko gensko diverziteto razlagamo tudi z ohranjanjem različnih genotipov v različnih delih populacije - subpopulacijah, zaradi različnih učinkov genetskega drifta v vsakem od njih, ko je bila številčnost populacije nizka in genskim pretokom v obdobju visoke številčnosti.

Visoki povprečni vrednosti H_o in H_e ne nakazujeta prehoda ozkega grla (Cornuet in Luikart, 1996). Drugače pravijo Garza Williamsonovi indeksi. Vrednost razmerja M se zmanjša, v primerih zmanjšanja številčnosti populacije. Da se vrednost indeksa približa vrednosti 1, je potrebnih nekaj 100 generacij (Garza in Williamson, 2001). Glede na to, da indeksi v povprečju kažejo izgubo 30%, na nekaterih lokusih (Cxx20, G10P, Mu09, Mu10, Mu50) pa celo izgubo približno polovice redkih alelov in če upoštevamo podatke o nihanju velikosti populacije za Slovenijo ter za druge države, ki so na območju Dinaridov in so bile v preteklosti pod podobno upravljalno shemo kot Slovenija je bilo ozko grlo najverjetneje konec 19. in v začetku 20. stoletja. Po ocenah je takrat npr. slovenski del populacije štel le okoli 30-40 osebkov (demografsko ozko grlo) (Krže, 1988). Populacija naj bi številčno začela naraščati po koncu 2 svetovne vojne. V tako majhni populaciji se običajno zmanjša tudi efektivna velikost populacije (genetsko ozko grlo). Takrat se ojača genetski drift in posledično prihaja do izgube redkejših alelov (Garza in Williamson, 2001). Pri ozkih grlih je, vsaj toliko kot število živali v populaciji, pomembno tudi trajanje ozkega grla (kako dolgo je številčnost nizka), saj je pri dolgotrajnem ozkem grlu drift dolgo visok in prihaja do izgube alelov (Frankham in sod., 2002).

Glede na podobnost povprečne H_o in H_e lahko rečemo, da se z genetskega vidika osebk v populaciji pari približno naključno (Frankham in sod., 2002). Kljub temu pa imajo trije lokusi v celotni populaciji statistično značilno odstopanje od Hardy Weinbergovega ravnovesja, ki je na lokusu Mu26 še posebej izrazito ($P = 0$). To kaže na možnost vpliva nekaterih za populacijo bolj ali manj neugodnih dejavnikov (nenaključno parjenje, migracija, mutacija, majhnost populacije). Teh odstopanj na drugih lokusih in posledično



povprečni H_o verjetno ne zaznamo, ker so učinki zgoraj naštetih dejavnikov na populacijo majhni (Frankham in sod., 2002). Za razlago lahko postavimo več različnih hipotez. Odstopanje je lahko posledica delovanja genetskega drifta v majhni populaciji. Lahko se pojavi kot posledica spolne selekcije, ki samcem z večjo reprodukcijsko uspešnostjo omogoča večji prenos svojih genov (alelov) v naslednjo generacijo, kar lahko v primeru njegove specifičnosti na določenem lokusu, močno spremeni frekvenco pojavljanja določenega alela. Podobno situacijo lahko pričakujemo v primeru imigracije že manjšega števila prav tako reprodukcijsko uspešnih samcev iz neke druge populacije npr. iz Rodopov, Stara planine ali Karpatov. Vendar pa so takšne migracije v današnjem času malo verjetne. Tudi v primeru, da znotraj dinarske populacije obstaja diferenciacija populacije z geografsko razdaljo, bi lahko zaradi migracij samcev zaznali odstopanje od Hardy Weinbergovega ravnovesja.

Zanimive rezultate smo dobili pri testu vezavnega neravnovesja med pari lokusov. Ugotovili smo, da je dedovanje vsakega lokusa povezano v povprečju z dedovanjem 18 izmed 21 preostalih preučevanih. Vsak lokus je v povprečju v vezavnem neravnovesju z 18,1 lokusom (kar je 86,1%). V velikih populacijah z naključnim parjenjem ne bi smelo biti korelacij med pojavljanjem alelov na dveh nevtralnih lokusih, razen v primeru, kadar sta lokusa fizično skupaj na kromosomu (Leberg, 2005). Skoraj nemogoče je, da bi bilo vseh 22 lokusov na enem kromosomu. Bolj verjetna se zdi možnost, da je kljub trenutno številčni populaciji za vezavno neravnovesje kriv učinek ustanovitelja (Founder effect) ali ozko grlo v prejšnjih generacijah. Če je bila v bližnji preteklosti efektivna velikost populacije (N_e) majhna, je lahko učinek še vedno opazen zaradi močnega povezovanja lokusov, parjenja v sorodstvu ali drugih dejavnikov, ki lahko povzročijo zakasnitev vezavnega neravnovesja (Hedrick, 2005). Na velikost N_e imajo precejšen učinek fragmentacija, izolacija, strategije izkoriščanja in translokacije (premestitev) populacije (Leberg, 2005). Jerina in Adamič (2008) navajata, da kot posledica izredno intenzivnega odstrela in deloma drugih antropogeno pogojenih vektorjev smrtnosti (npr. promet), starost 4 leta doseže le okoli 20%, starost 6 let pa 10% osebkov. Od tega starost 6 let dočaka okoli 10% samcev in 15% samic, kar pomeni, da majhen del populacije doseže reproduktivni razred. Ker vemo, da se njuna ocena velikosti slovenske populacije od leta 1998 do 2003 giblje od 244 do 316 osebki, lahko iz teh podatkov sklepamo na majhno N_e , kar se dobro



sklada z našimi ugotovitvami. Glede na to, da je poznavanje N_e populacije eden pomembnejših parametrov za oblikovanje plana upravljanja z ogroženimi vrstami (Leberg, 2005), bi jo bilo v prihodnje smiselno natančneje oceniti. Glede na ocene Jerine in Adamiča (2008) lahko sklepamo, da je velikost celotne dinarske populacije medveda verjetno precenjena in da ima celotna populacija verjetno nizek N_e , kar bi pojasnilo naše ugotovitve.

Z analizami mer genetskih distanc nismo zaznali razlik v frekvencah alelov med časovnimi skupinami. Razlik v frekvencah nismo zaznali tudi v korelaciji s časom. Populacija je torej ves čas približno enotna. Opažena razmeroma velika nihanja frekvenc alelov na nekaterih lokusih so najverjetneje stohastična posledica vzorčenja. Enako velja za pojavljanje redkih alelov v posamičnih časovnih populacijah, kar potrjuje študija »Analiza medvedov odvzetih iz narave in genetsko-molekularne raziskave populacije medveda v Sloveniji«, v kateri so Skrbinšek in sod. (2008) odkrili nekaj zelo redkih alelov v vzorcu, ki vse skupaj šteje okoli 1590 vzorcev (neinvazivni in tkivni vzorci od leta 2003 dalje) več kot 800 različnih osebkov (raziskava v času pisanja še vedno poteka). Z eksaktnim testom diferenciacije populacije in F_{ST} vrednostmi po lokusih med časovnimi populacijami prav tako nismo zaznali razlik oz. sledi diferenciacije časovnih populacij. Enotnost celotne populacije potrjuje tudi analiza molekularne variance, ki 99,94% variacije pripisuje variaciji znotraj šestih časovnih populacij in le 0,06% varaciji med časovnimi populacijami. V naši raziskavi smo s šestimi časovnimi populacijami sicer imeli za vsako od časovnih populacij razmeroma velik vzorec (vsaj 50 tkivnih vzorcev), a smo z vsemi šestimi časovnimi populacijami skupaj zajeli le časovno obdobje ene generacije. Podobnost časovnih populacij je verjetno tudi posledica strukturiranega odstrela in s tem nenaključnega vzorčenja. Redni letni odstrel je namreč zasnovan tako, da je večina odstreljenih osebkov mlajših od treh let, kar pa pomeni, da imajo ti osebki iste starše in tako tudi iste oz. podobne gene. Mere genetske distance in diferenciacijo populacije bi bilo verjetno bolj smiselno oceniti ali za časovno bolj ločene populacije ali pa za skupine osebkov iz različnih delov Dinarskega gorstva, če bi bili takšni podatki na voljo.



6 SKLEPI

V diplomskem delu smo proučili genetsko raznolikost severno-zahodnega dela dinarske populacije rjavega medveda. V naslednjih točkah so povzete glavne ugotovitve:

Uporabljeni mikrosatelitski markerji so polimorfni. Število alelov na lokus je primerljivo s številom alelov, ki so jih našli tudi v nekaterih drugih populacijah medvedov.

Na vseh 22 lokusih smo ugotovili razmeroma visoko stopnjo genske variabilnosti in alelske diverzitete. Razlog za visoko gensko diverzitetu slovenske populacije je smiselno iskati v povezavi s preostalim večjim delom populacije. Za potrditev tovrstne domnev bi morali primerjati skupine osebkov iz različnih delov Dinaridov, kar bi bilo v prihodnje tudi smiselno storiti.

Garza Williamsonovi indeksi v povprečju kažejo izgubo 30% alelov na lokusih, nakazujejo prehod ozkega grla. Verjetno ga je populacija preživela konec 19. in v začetku 20. stoletja.

Glede na podobnost povprečne H_o in H_e lahko rečemo, da se osebki v populaciji z genetskega vidika parijo približno naključno

Ugotovili smo, da je dedovanje lokusov medsebojno izjemno povezano. Glede na ocene številčnosti populacije Jerine in Adamiča (2008) in naših rezultatov sklepamo, da je velikost dinarske populacije medveda verjetno precenjena in da ima celotna populacija nizko efektivno velikost.

Z analizami mer genetskih distanc nismo zaznali razlik v frekvencah alelov med časovnimi skupinami. Razlik v frekvencah nismo zaznali tudi v korelaciji s časom. Populacija je torej ves čas približno enotna. Enotnost celotne populacije potrjuje tudi analiza molekularne variance, ki veliko večino variabilnosti pripisuje variabilnosti znotraj šestih časovnih skupin in le minimalen del variabilnosti med časovnimi skupinami.



Za nadaljnje analize dinarske populacije medvedov bi bilo smiselno pridobiti informacije o genetski pestrosti medvedov z drugih delov dinarskega gorstva. Tako bi lahko ugotavljali ali prihaja do diferenciacije populacije z razdaljo. S pridobitvijo starosti iz narave odvzetih osebkov bo mogoče oceniti efektivno velikost populacije in preučiti sorodnost med osebki ter disperzijo mladih osebkov.



7 POVZETEK

Slovenija se nahaja na severozahodnem robu strnjene območja dinarske populacije medveda in tako predstavlja najbolj zahodni del areala sklenjene razširjenosti rjavega medveda v Srednji Evropi. Osrednje območje razširjenosti v Sloveniji zajema Visoki kras. Hkrati je to območje na katerem medved ni nikoli povsem izginil.

Ohranitev slovenske populacije medveda je pomembna na ravni Slovenije in tudi na mednarodni ravni, saj populacija predstavlja vir osebkov za naravno rekolonizacijo Alp. Strategija upravljanja z rjavim medvedom v Sloveniji je tako pomembna tudi za sosednje države.

Metode varstvene genetike nam omogočajo pravočasno zaznavanje problemov varstva populacij ter pravočasno ukrepanje pri redkih in ogroženih vrstah.

V raziskavi smo preučili genetsko pestrost rjavega medveda v Sloveniji in raziskali informativnost mikrosatelitskih markerjev za to populacijo. Za analize smo uporabili DNA izolirano iz tkiv medvedov, ki so bili odvzeti iz populacije v rednem letnem odstrelu, zaradi povoza, pogina ali izrednega odstrela od leta 2003 do pomladi 2008. Po izolaciji smo iskane odseke DNA (mikrosatelitske lokuse in SRY lokus vezan na Y spolni kromosom) namnožili v PCR. Dolžine alelov smo določali na 16 kapilarnem sekvenatorju in tako pridobili genotipe na 22 mikrosatelitskih lokusih za 487 osebkov.

S pomočjo programskega orodja MSA (Microsatellite analyser; (Dieringer in Schlotterer, 2003)) in Arlequin (Excoffier in sod., 2005) smo ocenili standardne diverzitetne indekse (število alelov na posameznem lokusu (A), efektivno število alelov (A_e) ter opaženo (H_o) in pričakovano (H_e) heterozigotnost). Izračunali smo tudi Garza Williamsonove indekse (po lokusih in povprečnega), preverili ali so lokusi v Hardy Weinbergovem ravnovesju in ali se lokusi dedujejo neodvisno.

Na 22 polimorfni mikrosatelitskih lokusih smo dobili 148 različnih alelov. Povprečno število alelov na lokus je 6,7, povprečno število efektivnih alelov na lokus pa je 4,0.



Najbolj informativen je lokus Mu59, najmanj pa lokus Mu51. V povprečju ima vsak lokus 2,05 redkih alelov in 0,64 pogostih alelov. Povprečna vrednost opažene heterozigotnosti (H_o) je 0,72, pričakovane (H_e) pa 0,73. Statistično značilna odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnovesja smo ugotovili na treh lokusih: G10B, G10X in Mu26. V povprečju je vsak lokus v vezavnem neravnovesju z 86,1% lokusov. Garza Williamsonovi indeksi v povprečju kažejo izgubo 30% alelov na lokusih.

Uporabljeni mikrosatelitski markerji so polimorfni. Število alelov na lokus je primerljivo s številom alelov, ki so jih našli tudi v nekaterih drugih populacijah medvedov. Razmeroma visoko stopnjo genske variabilnosti in alelske diverzitete lahko iščemo v povezavi s preostalim delom dinarske populacije. Če vzdolž celotnega Dinarskega gorstva prihaja do določene stopnje genetske diferenciacije z razdaljo, lahko visoko gensko diverzitetu razlagamo z ohranjanjem različnih genotipov v različnih subpopulacijah in genskim pretokom med njimi. Razmeroma nizke vrednosti Garza Williamsonovih indeksov nakazujejo prehod ozkega grla, skozi katerega je šla populacija verjetno konec 19. in v začetku 20. stoletja. Glede na podobnost povprečne H_o in H_e lahko rečemo, da se osebki v populaciji z genetskega vidika pariyo približno naključno. Na treh lokusih pa se v testu HW ravnovesja kaže možnost vpliva nekaterih za populacijo bolj ali manj neugodnih dejavnikov. Za razloge lahko postavimo več različnih hipotez. Pri drugih parametrih teh učinkov ne zaznamo, ker so verjetno premajhni. Delež lokusov, ki se dedujejo vezano, je zelo visok. Na podlagi naših rezultatov, ki jih podpirajo tudi ocene številčnosti populacije Jerine in Adamiča (2008) lahko sklepamo, da je velikost dinarske populacije medveda verjetno precenjena in da ima celotna populacija verjetno nizko efektivno velikost. Za dodatno potrditev naših ugotovitev bi morali raziskati in primerjati še skupine osebkov iz drugih delov Dinaridov, kar bi bilo v prihodnje tudi smiselno storiti.

Populacijo smo glede na leto odstrela razdelili na šest časovnih populacij in na osnovi standardnih diverzitetnih indeksov raziskali, ali je morda v populaciji zaznati genetsko strukturo. Izračunali smo štiri različne mere genetske distance, naredili Mantelov test in eksaktni test diferenciacije populacije ter analizo molekularne variance. Nobeden od testov ni pokazal statistično značilnih razlik med časovnimi populacijami. Iz tega sklepamo, da je populacija v teh šestih letih večinoma enotna.



8 VIRI

8.1 CITIRANI VIRI

Abdi H. 2007. Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons. V: Encyclopedia of Measurement and Statistics. N.J. Salkind (ed.). Thousand Oaks, CA: Sage.

<http://www.utdallas.edu/~herve/Abdi-Bonferroni2007-pretty.pdf>

Baloloux F., Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155-165

Bellemain E., 2004. PhD thesis: 111 str.

Bellemain E., Taberlet P. 2004. Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) feces. *Molecular Ecology Notes*, 4, 3: 519-522

Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P., Pompanon P., Brochmann C. in Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Molecular Ecology*, 13: 3261-3273

Cornuet J.M., Luicart G. 1996. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics*, 144: 2001-2014

Dierninger D., Schlotterer C. 2003. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3: 167-169

Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver 3.1. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. User manual.
<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>



Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, New York, 617 str.

Garza J.C., Williamson E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305-318

Hancock J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. V: Microsatellites. Evolution and applications. Goldstein D. B., Schlöttere C. (eds.). New York, Oxford University Press, Inc.: 1-9

Hartl D.L., Clark A.G. 1997. Principles of Population Genetics. 3rd ed. Sunderland, MA, Sinauer Associates Inc.: 542 str.

Hedrick P.W. 2005. Genetic of populations. 3rd ed. Sudbury, MA, Jones and Bartlett Publishers: 737 str.

Huber Đ., Frković A., Štahan Ž., Kusak J., Majić A. 2000. Present status and management of large carnivores in Croatia. . V: Living with Bears. A large European Carnivore in a Shrinking World. Kryštufek B., Flajšman B., Griffiths H. I. (eds.). Ljubljana, Ecological Forum of the Liberal Democracy of Slovenia in cooperation with the Liberal Academy, 207-227

Jarne, P. Lagoda P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree*, 11, 10: 424-429.

Jerina K., Adamič M. 2008. Analiza odvzetih rjavih medvedov iz narave v Sloveniji v obdobju 2003-2006, na podlagi starosti določene s pomočjo brušenja zob. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 27 str.



- Jerina K., Debeljak M., Džeroski S., Kobler A., Adamič M. 2003. Modeling the brown bear population in Slovenia. A tool in the conservation management of treated species. Elsevier. Ecological modelling., 170: 453-469
- Jonozovič M., 2003. Strokovno izhodišče za vzpostavljanje omrežja NATURA 2000. Medved (*Ursus arctos*). 65 str.
http://www.natura2000.gov.si/uploads/tx_library/medved.pdf (15. avg. 2008)
- Kaczensky P. 2000. Project medved. Study area. V: Co-existence of brown bears and men in the cultural landscape of Slovenia. Kaczensky P. (ed.). Final report of the FWF project P 11529-BIO: 10 str.
- Kaczensky P. in Gossow H. 2000. Project medved. Introduction. V: Co-existence of brown bears and men in the cultural landscape of Slovenia. Kaczensky P. (ed.). Final report of the FWF project P 11529-BIO: 10 str.
- Kaczensky P., Knauer F. 2000. Habitat use of bears in a multi-use landscape in Slovenia. V: Co-existence of brown bears and men in the cultural landscape of Slovenia. Kaczensky P. (ed.). Final report of the FWF project P 11529-BIO: 41 str.
- Kalinowski ST. 2002. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? Heredity, 88: 62-65
- Kryštufek B. 2003. Sesalci - Mammalia. V: Živalstvo Slovenije. Sket B., Gogala M., Kuštor V. (ur). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 595 str.
- Krže B. 1988. V: Zveri II. Medvedi – *Ursidae*, psi - *Canidae*, mačke – *Felidae*. Kryštufek B., Brancelj A., Krže B., Čop J. (ur). Lovska zveza Slovenije, Ljubljana: 23-62
- Leberg P. 2005. Genetic approaches for estimating the effective size of populations. Journal of wildlife management 69, 4: 1385-1399



- Paetkau D., Amstrup S.C., Born E.W., Calvert W., Derocher A.E., Garner G.W., Messier F., Stirling I., Taylor M.K., Wiig Ø., Strobeck C. 1999. Genetic structure of the world's polar bear populations. *Molecular Ecology*, 8: 1571-1584
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure of Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354
- Paetkau D., Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3: 489-495
- Paetkau D., Waits L.P., Clarkson P.L., Craighead L., Vyse E., Ward R., Strobeck C. 1998. Variation in Genetic Diversity across the Range of North American Brown Bears. *Conservation Biology*, 12, 2: 418-429
- Pages M., Calvignac S., Klein C., Paris M., Hughes S., Hänni C. 2008. Combined analysis of fourteen nuclear genes refines the Ursidae phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 73-83
- Pearse D. E., Crendall K. A. 2004. Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, 5: 585-602.
- Raymond M., Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49, 6: 1280-1283
- Schreve D.C., Currant A.P. 2003. The Pleistocene history of the brown bear with particular reference to the western palaeartic. V: *Living with Bears. A large European Carnivore in a Shrinking World*. Kryštufek B., Flajšman B., Griffiths H. I. (eds.). Ljubljana, Ecological Forum of the Liberal Democracy of Slovenia in cooperation with the Liberal Academy, 27-39



- Simonič A. 2003. Conservation strategy for the brown bear in Slovenia. V: Living with Bears. A large European Carnivore in a Shrinking World. Kryštufek B., Flajšman B., Griffiths H. I. (eds.). Ljubljana, Ecological Forum of the Liberal Democracy of Slovenia in cooperation with the Liberal Academy, 295-321
- Skrbinšek T., Potočnik H., Kos I., Trontelj P., 2007. Varstvena genetika medveda. Končno poročilo projekta »Varstvena genetika medveda, risa in jelenjadi v Sloveniji«, Ljubljana, 49 str.
- Strategija upravljanja z rjavim medvedom (*Ursus arctos*) v Sloveniji. 2002.
www.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/podrocja/okolje/pdf/strategija_rjavi_medved_2002.pdf (7. mar. 2008)
- Sweson J.E., Gerstl N., Dahle B., Zedrosser A. 2000. Action plan for the conservation of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. Council of Europe, Strassburg, France.
- Taberlet P., Bouvet J. 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. Biological sciences, 255, 1344: 195-200
- Taberlet P., Camarra J.J., Griffin S., Uhres E., Hanotte O., Waits L.P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J. 1997. Noninvasive genetic tracking of endangered Pyrenean brown bear population. Molecular Ecology, 6, 9: 869-876
- Turk I. 2003. Humans and carnivores in Slovenia during the upper pleistocene. Interactions between neanderthals and the cave bear. V: Living with Bears. A large European Carnivore in a Shrinking World. Kryštufek B., Flajšman B., Griffiths H. I. (eds.). Ljubljana, Ecological Forum of the Liberal Democracy of Slovenia in cooperation with the Liberal Academy, 43-57



Waits L., Taberlet P., Swenson J.E., Sandegren F., Franzén R. 2000. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology*, 9:421-431

Zedrosser A., Dahle B., Swenson J.E., Gerstel N. 2001. Status and management of the brown bear in Europe. *Ursus* 12: 9-20
www.lcie.org/Docs/LCIE%20IUCN/Zedroser%20URSUS%20Europe%20bear%20status.pdf (7. mar. 2008)

8.2 DRUGI VIRI

http://ec.europa.eu/environment/nature/info/pubs/docs/brochures/large_carnivores_know_no_boundaries.pdf (2.10.2008)

http://www.mop.gov.si/si/delovna_podrocja/direktorat_za_okolje/sektor_za_politiko_ohranjanja_narave/velike_zveri/ (2.10.2008)

http://www.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/podrocja/okolje/pdf/zveri/porocilo_o_izlocenih_medvedih (3.10.2008)

http://www.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/podrocja/okolje/pdf/zveri/strokovno_mnenje_odstrel_zveri_stalisce_08.pdf (7.10.2008)



ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Petru Trontlju se zahvaljujem za nasvete in diskusije pri izdelavi diplomske naloge in na koncu za hiter in temeljit pregled. Prav tako se za hiter in temeljit pregled dela ter komentarje zahvaljujem recenzentu doc. dr. Rudiju Verovniku in predsedniku komisije prof. dr. Ivanu Kosu.

Agenciji RS za okolje, Ministrstvo za okolje in prostor, ki finančno podpira projekt »Analiza medvedov odvzetih iz narave in genetsko-molekularne raziskave populacije medveda v Sloveniji« v sklopu katerega je bila narejna naloga.

Največja in najlepša hvala Tomažu Skrbinšku, ki me je v preteklih treh letih naučil veliko novega in mi pomagal, delil nasvete ter z mano razpravljal o medvedih vse do konca nastanka diplome.

Andreju in Martinu za pomoč na začetku računalniške analize podatkov.

Barbari za vse matematične urice, ki sva jih v študijskih letih preživeli skupaj (še posebej hvala za zadnjih nekaj☺).

Skupini za ekologijo živali: Aleksandri, Frenku, Hubertu Mihi in Blanki pa »sosedoma« Maji in Draganu za prijetne urice in debatke ob kavicah.

Valeriji, ki mi je bila vedno na voljo za moja vprašanja.

Mojci H., Vesni, Anamariji, Tini, Marjetki, Meliti, Matjažu, Renati, Barbari P., Maji S., Mojci V., Barbari B. in Lukatu za vse prijetne trenutke, ki smo jih tekom študija doživeli skupaj.

Romanu za prvo in zadnjo plat moje diplome☺



Jelenčič M. Genetska pestrost rjavega medveda (*Ursus arctos*) v Sloveniji.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2008

Mojemu Markotu za vzpodbudo in potrpežljivost v času nastajanja diplome. Hvala tudi za pomoč pri zaključnih delih☺

Mojim domačim za vzpodbudo in podporo tekom celotnega študija.



Priloga A

Protokol za PCR (uporabljeni volumni, razporeditev vzorcev za pipetiranje)

MultiA						
Number samples	106	tubes (+10%)	Date : 8.5.2008 Person: Maja			
DNA	1	µl				
Volume PCR	10	µl				
			UHQ water	284,9	µl	☐
Qiagen Mastermix	2	x	Quaigen Mastermix	530	µl	☐
Q solution 5x	0,5	x	Q solution	106	µl	☐
Multi A MM (32x)	1,00	x	Multi A MM	33,13	µl	☐
PCR :			Volume Mastermix Total		954 µl	
Initial denaturation	95°C	15 min	Volume of PCR mix/tube		9 µl	
Number of cycles :	29		V / multichanel dist. 110,7 µl			
Denaturation :	94°C	30 sec				
Annealing:	58°C	90 sec				
Elongation :	72°C	1 min				
Final Elongation	60°C	30 min				
Opombe:						



Date : 8.5.2008												
MultiA												
Plate 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1	425y	445y	455y	463y	472y	480y	490y	498y	508y	516y	524y
B	418y	426y	446y	456y	464y	473y	481y	491y	499y	509y	517y	525y
C	419y	427y	447y	457y	466y	474y	484y	492y	500y	510y	518y	526y
D	420y	428y	450y	458y	467y	475y	485y	493y	501y	511y	519y	527y
E	421y	432y	451y	459y	468y	476y	486y	494y	504y	512y	520y	529y
F	422y	440y	452y	460y	469y	477y	487y	495y	505y	513y	521y	533y
G	423y	442y	453y	461y	470y	478y	488y	496y	506y	514y	522y	535y
H	424y	444y	454y	462y	471y	479y	489y	497y	507y	515y	523y	K2



Priloga B

Ocena napake pri genotipizaciji

Marker	N Amp OK	Freq	Marker	P(Err)	Pričakovanih Narobe Genotipov / lokus	Delež napake / lokus
Cxx20	1	349	Cxx20	0	0	0,00%
G10B	1	246	G10B	0	0	0,00%
G10C	1	251	G10C	0,001193	0,089356406	0,02%
G10D	1	252	G10D	0,002395	0,603592814	0,12%
G10H	1	255	G10H	0,015404	3,928112965	0,81%
G10J	1	171	G10J	0	0	0,00%
G10L	1	172	G10L	0,000859	0,147766323	0,03%
G10M	1	176	G10M	0	0	0,00%
G10P	1	254	G10P	0,001193	0,303102625	0,06%
G10X	1	254	G10X	0,001203	0,305655836	0,06%
G1A	1	248	G1A	0	0	0,00%
Mu05	1	246	Mu05	0,001256	0,309045226	0,06%
Mu09	1	353	Mu09	0,003026	1,068078669	0,22%
Mu10	1	169	Mu10	0	0	0,00%
Mu11	1	245	Mu11	0	0	0,00%
Mu15	1	360	Mu15	0,00152	0,547112462	0,11%
Mu23	1	171	Mu23	0,000994	0,169980119	0,03%
Mu26	1	247	Mu26	0,001294	0,319534282	0,07%
Mu50	1	169	Mu50	0	0	0,00%
Mu51	1	168	Mu51	0	0	0,00%
Mu59	1	170	Mu59	0,002979	0,506454816	0,10%
Mu61	1	349	Mu61	0	0	0,00%
Št. vzorcev z eno napako					8,297792545	
Delež napake v vseh vzorcih na vseh lokusih					1,70%	



Priloga C

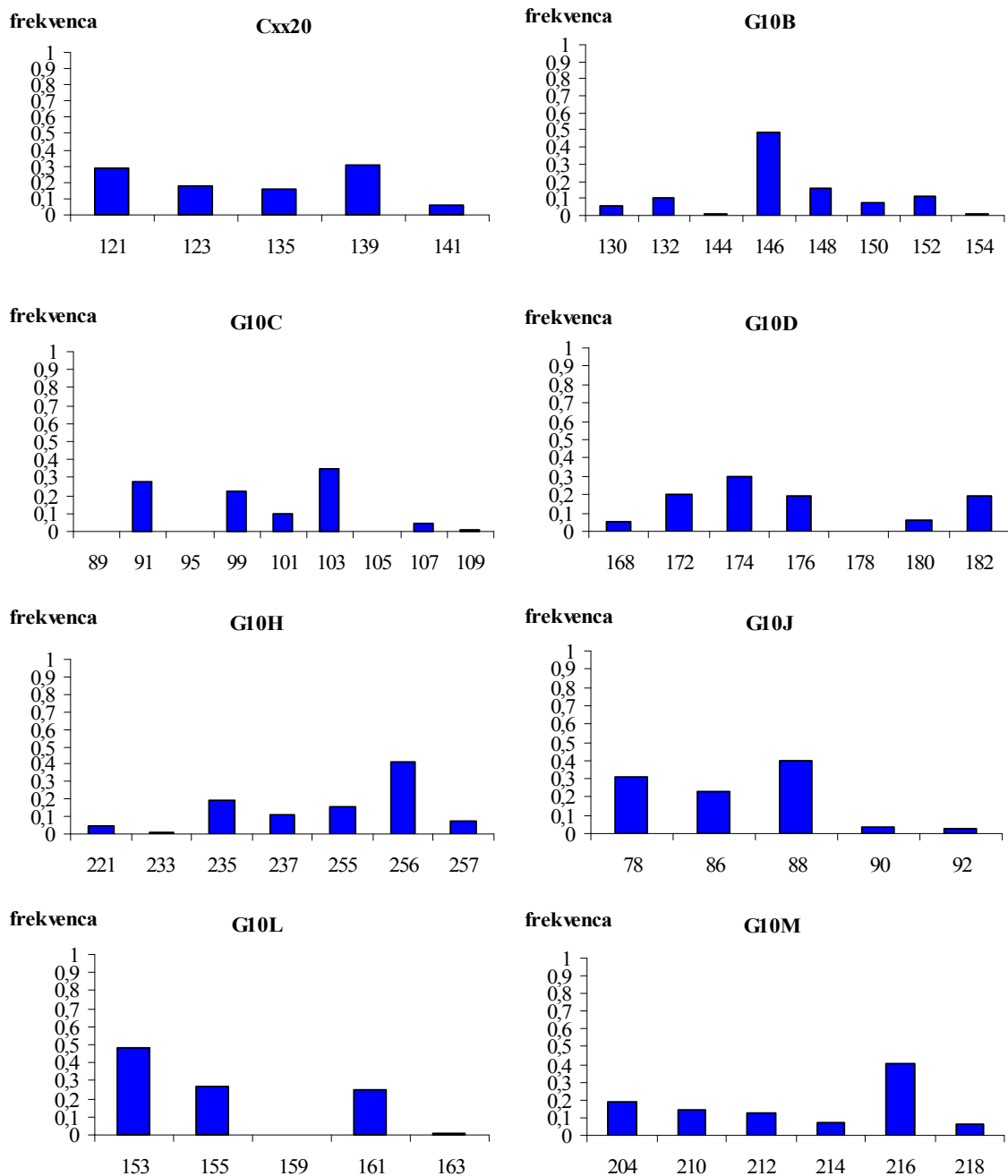
Število amplifikacij po lokusih

Št. amp.OK	Cxx20	G10B	G10C	G10D	G10H	G10J	G10L	G10M	G10P	G10X	G1A	Mu05	Mu09	Mu10	Mu11	Mu15	Mu23	Mu26	Mu50	Mu51	Mu59	Mu61
0	3	4	3	4	5	3	2	6	2	5	4	3	3	5	2	2	2	11	3	2	2	3
1	349	246	251	252	255	171	172	176	254	254	248	246	353	169	245	360	171	247	169	168	170	349
2	129	178	173	170	201	208	125	201	170	167	206	209	126	184	211	119	185	206	187	186	186	129
3	14	51	52	54	33	87	97	89	53	54	36	35	15	111	35	16	111	29	110	113	111	14
4	4	14	16	15	5	25	72	24	16	15	5	6	2	18	6	1	18	6	18	18	18	4
5	1	4	1	1	1	4	27	2	1	1	1	1	1	10	1	2	10	1	10	9	10	1
6	0	2	3	3	0	2	5	2	3	3	0	0	0	2	0	0	2	0	2	3	2	0
Vzorcev	500	499	499	499	500	500	500	500	499	499	500	500	500	499	500	500	499	500	499	499	499	500
Vzorcev OK	497	495	496	495	495	497	498	494	497	494	496	497	497	494	498	498	497	489	496	497	497	497

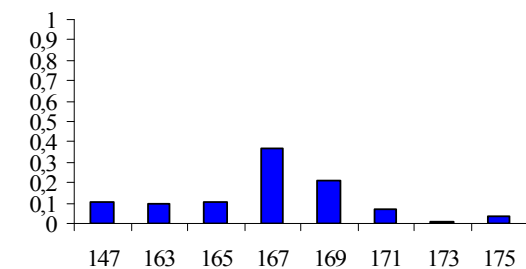


Priloga D

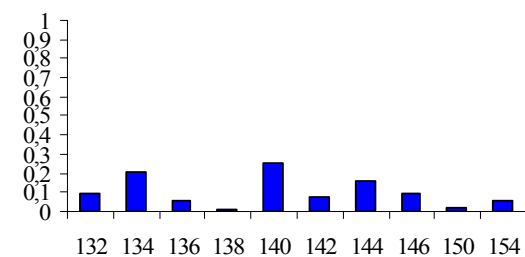
Frekvence alelov na lokusih



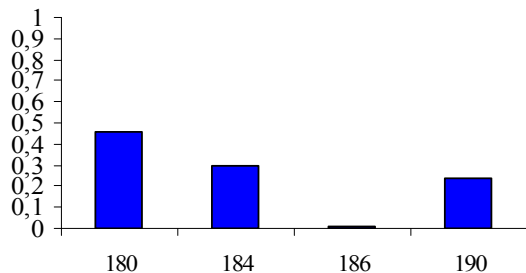
frekvenca **G10P**



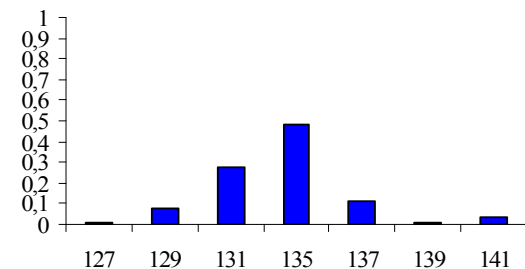
frekvenca **G10X**



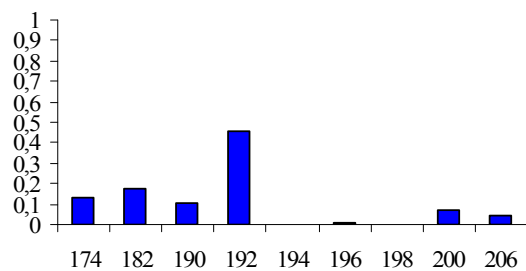
frekvenca **G1A**



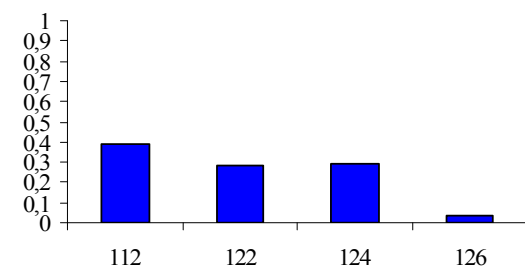
frekvenca **Mu05**



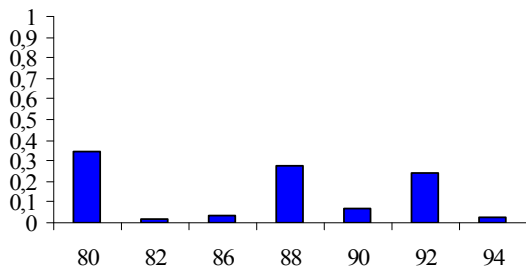
frekvenca **Mu09**



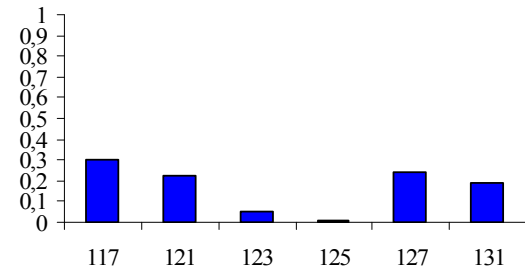
frekvenca **Mu10**



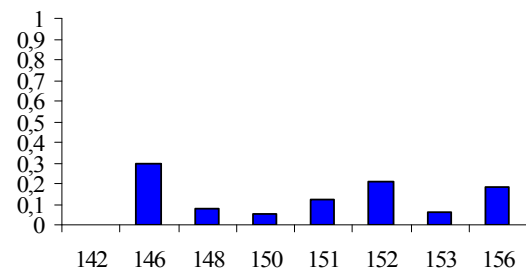
frekvenca **Mu11**



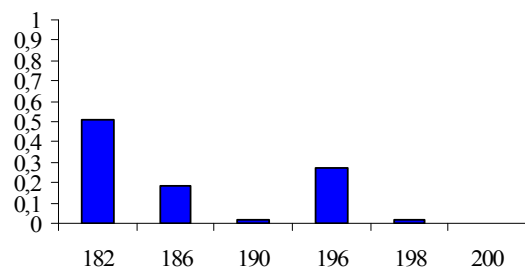
frekvenca **Mu15**



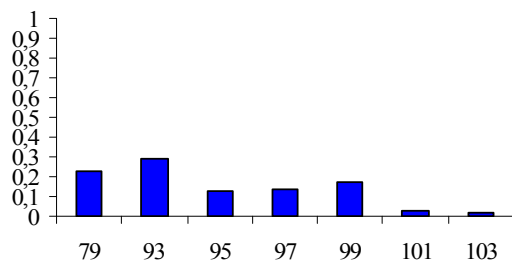
frekvenca **Mu23**



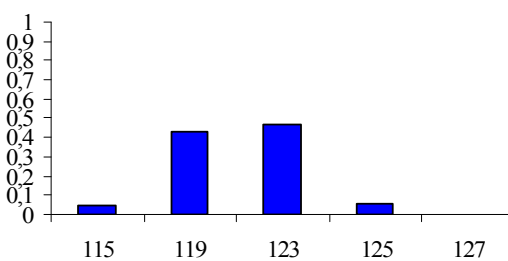
frekvenca **Mu26**



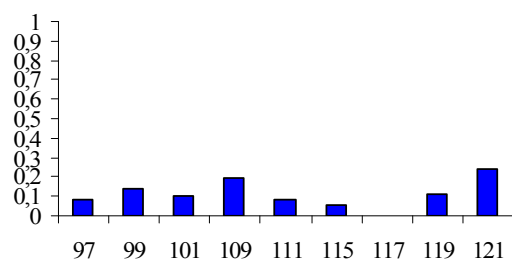
frekvenca **Mu50**



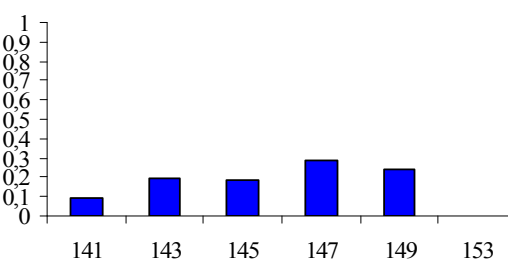
frekvenca **Mu51**



frekvenca **Mu59**



frekvenca **Mu61**



Priloga E

Preglednice populacijsko genetskih parametrov za posamezne časovne populacije

Populacija 2003

<i>Lokus</i>	<i>št. alelov</i>	<i>efektivno št.alelov</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>min. alel</i>	<i>maks. alel</i>	<i>razpon alelov [(GT)_n]</i>	<i>GW indeksi</i>
<i>Cxx20</i>	5	4,14	0,922	0,766	121	141	10	0,455
<i>G10B</i>	8	3,86	0,776	0,749	130	154	12	0,615
<i>G10C</i>	7	3,82	0,720	0,746	91	107	8	0,778
<i>G10D</i>	6	4,77	0,898	0,798	168	182	7	0,750
<i>G10H</i>	7	3,78	0,784	0,742	221	257	-	-
<i>G10J</i>	5	3,30	0,608	0,704	78	92	7	0,625
<i>G10L</i>	3	2,65	0,569	0,629	153	161	4	0,600
<i>G10M</i>	6	3,15	0,700	0,689	204	218	7	0,750
<i>G10P</i>	8	5,71	0,860	0,833	147	175	14	0,533
<i>G10X</i>	9	5,49	0,898	0,826	132	154	11	0,750
<i>G1A</i>	4	2,88	0,726	0,660	180	190	5	0,667
<i>Mu05</i>	4	2,91	0,608	0,663	129	137	4	0,800
<i>Mu09</i>	6	4,28	0,745	0,774	174	206	16	0,353
<i>Mu10</i>	4	2,79	0,531	0,648	112	126	7	0,500
<i>Mu11</i>	7	4,08	0,608	0,763	80	94	7	0,875
<i>Mu15</i>	5	4,05	0,804	0,760	117	131	7	0,625
<i>Mu23</i>	7	4,64	0,820	0,792	146	156	-	-
<i>Mu26</i>	5	2,90	0,420	0,662	182	198	8	0,556
<i>Mu50</i>	7	4,84	0,840	0,802	79	103	12	0,539
<i>Mu51</i>	4	2,51	0,620	0,608	115	125	5	0,667
<i>Mu59</i>	8	6,54	0,880	0,856	97	121	12	0,616
<i>Mu61</i>	5	4,19	0,765	0,769	141	149	4	1,000
<i>povprečj</i>	5,909	3,97	0,732	0,738	-	-	9,682	0,653
<i>s.d.</i>	1,630	1,067	0,135	0,070	-	-	6,602	0,169



Populacija 2004

<i>Lokus</i>	<i>št. alelov</i>	<i>efektivno št. alelov</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>min. alel</i>	<i>maks. alel</i>	<i>razpon alelov [(GT)_n]</i>	<i>GW indeksi</i>
<i>Cxx20</i>	5	4,18	0,779	0,766	121	141	10	0,455
<i>G10B</i>	7	2,99	0,610	0,670	130	152	11	0,583
<i>G10C</i>	6	3,94	0,779	0,751	91	109	9	0,600
<i>G10D</i>	6	4,03	0,714	0,757	168	182	7	0,750
<i>G10H</i>	7	3,94	0,714	0,751	221	257	-	-
<i>G10J</i>	5	3,21	0,662	0,693	78	92	7	0,625
<i>G10L</i>	4	2,62	0,610	0,622	153	163	5	0,667
<i>G10M</i>	6	4,59	0,779	0,787	204	218	7	0,750
<i>G10P</i>	8	4,59	0,792	0,787	147	175	14	0,533
<i>G10X</i>	10	6,58	0,844	0,854	132	154	11	0,833
<i>G1A</i>	4	2,65	0,571	0,626	180	190	5	0,667
<i>Mu05</i>	7	2,86	0,571	0,655	129	141	7	0,875
<i>Mu09</i>	7	3,36	0,688	0,707	174	206	16	0,412
<i>Mu10</i>	4	3,15	0,727	0,687	112	126	7	0,500
<i>Mu11</i>	7	3,50	0,727	0,719	80	94	7	0,875
<i>Mu15</i>	6	4,18	0,766	0,766	117	131	7	0,750
<i>Mu23</i>	7	4,65	0,714	0,790	146	156	-	-
<i>Mu26</i>	5	2,65	0,400	0,627	182	198	8	0,556
<i>Mu50</i>	7	4,76	0,727	0,795	79	103	12	0,539
<i>Mu51</i>	4	2,39	0,455	0,585	115	125	5	0,667
<i>Mu59</i>	8	6,99	0,909	0,863	97	121	12	0,615
<i>Mu61</i>	5	4,18	0,662	0,766	141	149	4	1,000
<i>povprečje</i>	6,136	3,91	0,691	0,728	-	-	9,860	0,663
<i>s.d.</i>	1,552	1,189	0,120	0,076	-	-	6,455	0,153



Populacija 2005

<i>Lokus</i>	<i>št. alelov</i>	<i>efektivno št. alelov</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>min. alel</i>	<i>maks. alel</i>	<i>razpon alelov [(GT)_n]</i>	<i>GW indeksi</i>
<i>Cxx20</i>	5	3,98	0,774	0,753	121	141	10	0,455
<i>G10B</i>	7	3,97	0,774	0,753	130	154	12	0,539
<i>G10C</i>	6	3,71	0,679	0,735	91	109	9	0,600
<i>G10D</i>	6	4,52	0,774	0,783	168	182	7	0,750
<i>G10H</i>	7	3,71	0,783	0,735	221	257	-	-
<i>G10J</i>	5	2,89	0,619	0,658	78	92	7	0,625
<i>G10L</i>	3	2,64	0,726	0,625	153	161	4	0,600
<i>G10M</i>	6	3,29	0,663	0,701	204	218	7	0,750
<i>G10P</i>	8	4,79	0,750	0,796	147	175	14	0,533
<i>G10X</i>	10	6,35	0,821	0,848	132	154	11	0,833
<i>G1A</i>	4	2,98	0,714	0,668	180	190	5	0,667
<i>Mu05</i>	5	2,71	0,595	0,635	129	137	5	0,833
<i>Mu09</i>	8	3,28	0,691	0,699	174	206	16	0,471
<i>Mu10</i>	4	3,17	0,726	0,688	112	126	7	0,500
<i>Mu11</i>	7	4,11	0,786	0,761	80	94	7	0,875
<i>Mu15</i>	6	4,27	0,845	0,771	117	131	7	0,750
<i>Mu23</i>	8	5,15	0,821	0,812	146	156	-	-
<i>Mu26</i>	6	2,72	0,524	0,637	182	200	9	0,600
<i>Mu50</i>	7	5,28	0,774	0,815	79	103	12	0,539
<i>Mu51</i>	4	2,61	0,583	0,621	115	125	5	0,667
<i>Mu59</i>	8	6,02	0,893	0,839	97	121	12	0,615
<i>Mu61</i>	6	4,76	0,762	0,795	141	153	6	0,857
<i>povprečje</i>	6,182	3,95	0,731	0,733	-	-	10,09	0,653
<i>s.d.</i>	1,680	1,097	0,091	0,072	-	-	6,54	0,132



Populacija 2006

<i>Lokus</i>	<i>št. alelov</i>	<i>efektivno št. alelov</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>min. alel</i>	<i>maks. alel</i>	<i>razpon alelov [(GT)_n]</i>	<i>GW indeksi</i>
<i>Cxx20</i>	5	4,37	0,760	0,774	121	141	10	0,455
<i>G10B</i>	7	3,23	0,744	0,693	130	154	12	0,539
<i>G10C</i>	6	3,82	0,768	0,741	91	109	9	0,600
<i>G10D</i>	6	4,78	0,792	0,794	168	182	7	0,750
<i>G10H</i>	7	3,90	0,653	0,748	221	257	-	-
<i>G10J</i>	5	3,12	0,696	0,682	78	92	7	0,625
<i>G10L</i>	4	2,85	0,632	0,652	153	163	5	0,667
<i>G10M</i>	6	4,30	0,752	0,770	204	218	7	0,750
<i>G10P</i>	8	3,83	0,760	0,742	147	175	14	0,533
<i>G10X</i>	9	5,89	0,784	0,834	132	154	11	0,750
<i>G1A</i>	4	2,79	0,704	0,644	180	190	5	0,667
<i>Mu05</i>	7	3,12	0,661	0,683	129	141	7	0,875
<i>Mu09</i>	7	3,66	0,680	0,730	174	206	16	0,412
<i>Mu10</i>	4	3,13	0,680	0,683	112	126	7	0,500
<i>Mu11</i>	7	3,78	0,656	0,739	80	94	7	0,875
<i>Mu15</i>	6	4,29	0,744	0,770	117	131	7	0,750
<i>Mu23</i>	7	4,96	0,792	0,802	146	156	-	-
<i>Mu26</i>	5	2,64	0,610	0,624	182	198	8	0,556
<i>Mu50</i>	7	4,89	0,800	0,799	79	103	12	0,539
<i>Mu51</i>	4	2,26	0,584	0,561	115	125	5	0,667
<i>Mu59</i>	8	6,32	0,856	0,845	97	121	12	0,615
<i>Mu61</i>	6	4,46	0,808	0,779	141	153	6	0,857
<i>povprečje</i>	6,136	3,93	0,724	0,731	-	-	10,0	0,650
<i>s.d.</i>	1,424	1,035	0,072	0,072	-	-	6,4	0,137



Populacija 2007

<i>Lokus</i>	<i>št. alelov</i>	<i>efektivno št.alelov</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>min. alel</i>	<i>maks. alel</i>	<i>razpon alelov [(GT)_n]</i>	<i>GW indeksi</i>
<i>Cxx20</i>	5	4,01	0,722	0,754	121	141	10	0,455
<i>G10B</i>	8	3,51	0,778	0,718	130	154	12	0,615
<i>G10C</i>	8	3,65	0,732	0,729	91	109	10	0,727
<i>G10D</i>	6	4,81	0,833	0,796	168	182	7	0,750
<i>G10H</i>	7	4,04	0,713	0,756	221	257	-	-
<i>G10J</i>	5	3,20	0,759	0,691	78	92	7	0,625
<i>G10L</i>	5	2,92	0,602	0,660	153	163	5	0,833
<i>G10M</i>	6	4,24	0,804	0,768	204	218	7	0,750
<i>G10P</i>	7	4,53	0,778	0,783	147	175	14	0,467
<i>G10X</i>	10	6,42	0,860	0,848	132	154	11	0,833
<i>G1A</i>	4	2,91	0,645	0,659	180	190	5	0,667
<i>Mu05</i>	7	3,10	0,639	0,681	129	141	7	0,875
<i>Mu09</i>	8	3,60	0,694	0,725	174	206	16	0,471
<i>Mu10</i>	4	3,04	0,720	0,674	112	126	7	0,500
<i>Mu11</i>	7	3,83	0,787	0,742	80	94	7	0,875
<i>Mu15</i>	6	4,41	0,796	0,777	117	131	7	0,750
<i>Mu23</i>	7	5,67	0,843	0,828	146	156	-	-
<i>Mu26</i>	5	2,75	0,593	0,639	182	198	8	0,556
<i>Mu50</i>	7	4,94	0,843	0,802	79	103	12	0,539
<i>Mu51</i>	5	2,39	0,556	0,585	115	127	6	0,714
<i>Mu59</i>	9	6,39	0,833	0,848	97	121	12	0,692
<i>Mu61</i>	5	4,48	0,769	0,780	141	149	4	1,000
<i>povprečje</i>	6,409	4,04	0,741	0,738	-	-	10,0	0,685
<i>s.d.</i>	1,593	1,114	0,088	0,070	-	-	6,43	0,155



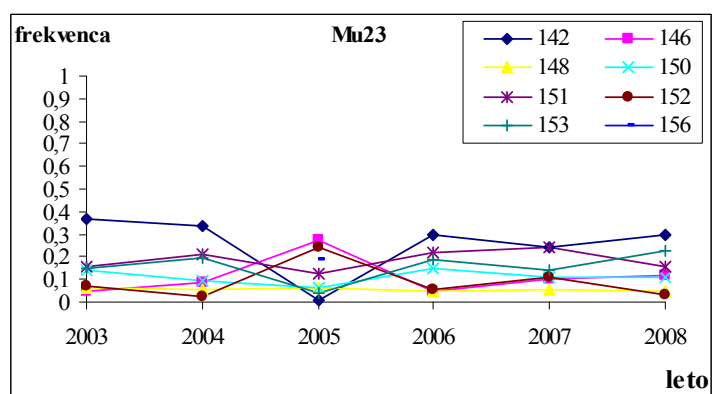
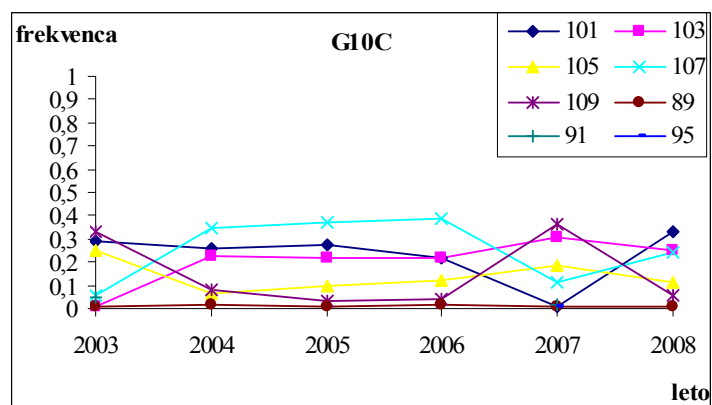
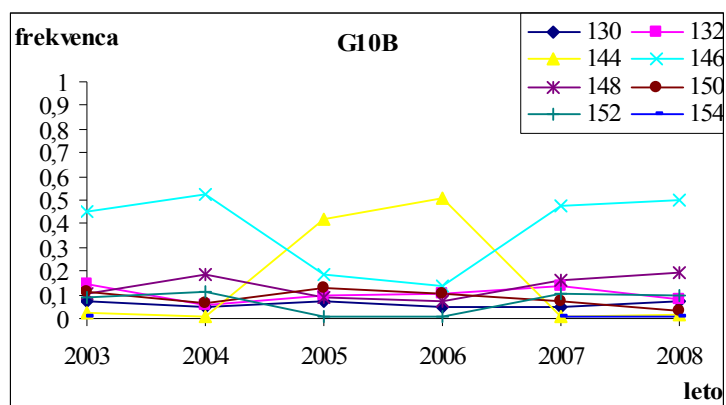
Populacija 2008

<i>Lokus</i>	<i>št. alelov</i>	<i>efektivno št.alelov</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>min. alel</i>	<i>maks. alel</i>	<i>razpon alelov [(GT)_n]</i>	<i>GW indeksi</i>
<i>Cxx20</i>	5	3,82	0,760	0,746	121	141	10	0,455
<i>G10B</i>	8	3,24	0,700	0,698	130	154	12	0,615
<i>G10C</i>	6	4,08	0,940	0,763	91	109	9	0,600
<i>G10D</i>	7	4,71	0,780	0,796	168	182	7	0,875
<i>G10H</i>	7	4,54	0,720	0,788	221	257	-	-
<i>G10J</i>	5	3,27	0,620	0,701	78	92	7	0,625
<i>G10L</i>	3	2,63	0,700	0,626	153	161	4	0,600
<i>G10M</i>	6	4,31	0,760	0,776	204	218	7	0,750
<i>G10P</i>	7	4,43	0,760	0,782	147	173	13	0,500
<i>G10X</i>	10	5,84	0,680	0,837	132	154	11	0,833
<i>G1A</i>	4	2,90	0,700	0,662	180	190	5	0,667
<i>Mu05</i>	6	2,94	0,620	0,667	129	141	6	0,857
<i>Mu09</i>	6	3,44	0,700	0,716	174	206	16	0,353
<i>Mu10</i>	4	3,05	0,580	0,679	112	126	7	0,500
<i>Mu11</i>	5	3,38	0,780	0,711	80	92	6	0,714
<i>Mu15</i>	5	4,12	0,800	0,765	117	131	7	0,625
<i>Mu23</i>	7	5,04	0,740	0,810	146	156	-	-
<i>Mu26</i>	6	2,90	0,612	0,662	182	200	9	0,600
<i>Mu50</i>	6	4,68	0,820	0,794	79	101	11	0,500
<i>Mu51</i>	4	2,66	0,600	0,631	115	125	5	0,667
<i>Mu59</i>	8	6,35	0,840	0,851	97	121	12	0,615
<i>Mu61</i>	5	4,73	0,800	0,797	141	149	4	1,000
<i>povprečje</i>	5,909	3,96	0,728	0,739	-	-	9,727	0,648
<i>s.d.</i>	1,601	1,02	0,089	0,066	-	-	6,503	0,157



Priloga F

Primeri spreminjanja frekvenc alelov na nekaterih lokusih



Priloga G

P-vrednosti Hardy Weinbergovega testa

<i>Lokus/časovna populacija</i>	2003	2004	2005	2006	2007	2008	<i>Celotna populacija</i>
<i>Cxx20</i>	0,11035	0,75023	0,73874	0,45479	0,34147	0,99984	0,91186
<i>G10B</i>	0,19605	0,15641	0,56543	0,57292	0,60286	0,05723	0,00531
<i>G10C</i>	0,06076	0,06749	0,40915	0,09545	0,24765	0,02637	0,14234
<i>G10D</i>	0,72493	0,48034	0,7011	0,46557	0,71213	0,94961	0,79782
<i>G10H</i>	0,19423	0,39499	0,94285	0,11099	0,34726	0,1525	0,12411
<i>G10J</i>	0,4716	0,27159	0,17956	0,30563	0,1169	0,11379	0,44305
<i>G10L</i>	0,18568	0,86316	0,15784	0,8598	0,13967	0,01639	0,09094
<i>G10M</i>	0,15237	0,05939	0,4613	0,7822	0,1448	0,16756	0,24941
<i>G10P</i>	0,95195	0,16648	0,79768	0,88226	0,30557	0,6689	0,20403
<i>G10X</i>	0,41831	0,12199	0,25005	0,12922	0,0345	0,01289	0,04951
<i>G1A</i>	0,14294	0,51743	0,23378	0,30903	0,69069	0,91933	0,14879
<i>Mu05</i>	0,49904	0,08483	0,45217	0,72051	0,31766	0,11961	0,1113
<i>Mu09</i>	0,52968	0,66626	0,31124	0,10285	0,84898	0,16997	0,26803
<i>Mu10</i>	0,34835	0,70002	0,21677	0,90741	0,66917	0,22488	0,93879
<i>Mu11</i>	0,11059	0,71045	0,89573	0,00467	0,1839	0,53491	0,17968
<i>Mu15</i>	0,81048	0,52428	0,54001	0,83135	0,06241	0,52526	0,24263
<i>Mu23</i>	0,25017	0,55885	0,40813	0,66916	0,92951	0,00149	0,69308
<i>Mu26</i>	0,00098	0,00011	0,00124	0,26988	0,04907	0,74217	0,00000
<i>Mu50</i>	0,17738	0,88461	0,68123	0,40442	0,49639	0,46742	0,72565
<i>Mu51</i>	1,0	0,02139	0,2829	0,21094	0,89246	0,07414	0,053
<i>Mu59</i>	0,62861	0,29181	0,1389	0,84255	0,9753	0,85527	0,94706
<i>Mu61</i>	0,86772	0,15685	0,89307	0,79507	0,96594	0,98014	0,70872

* Obarvana so signifikantna odstopanja H_o od H_e ($P < 0,05$).

