

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Hana JONTEZ

**POPULACIJSKA STRUKTURA VIDRE (*Lutra lutra*) V KRAJINSKEM
PARKU GORIČKO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**POPULATION STRUCTURE OF OTTER (*Lutra lutra*) IN LANDSCAPE
PARK GORIČKO**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Po vodni gladini jezerca neslišno drsi nekaj nedoločljivega. Le drobni valovi, ki kodrajo gladino, izdajajo pritajeno gibanje. V luninem sijaju se zableščijo oči. Iz vode se dvigne glava. Z dolgih brkov drsijo vodne kaplje, ko se obrača in kot periskop motri okolico. Povodni mož?

Obris glave izgine v vodi, v naslednjem trenutku se oglasi čofotanje, cviljenje in prekopicevanje po vodi, nato hrup za nekaj časa potihne. Temna, dolga silhueta izplava in se po travnatem bregu vzpne na kopno. Strese se, da vodne kaplje lete na vse strani, nato pa je slišati le še pokanje in mljaskanje. Ko oblaki odstrejo lunin sij, je vse jasno. Vidra si je privoščila gostijo z velikim krapom.



(Lutra, Inštitut za ohranjanje naravne dediščine)

Z diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstva – zootehniko. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Poskus je bil opravljen v genetskem laboratoriju Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Simono Sušnik Bajec.

Recenzent: prof. dr. Jurij Pohar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter DOVČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Simona SUŠNIK BAJEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Jurij POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 28. september 2016

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

Hana JONTEZ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 639.113:575(043.2)=163.6
KG vidra/*Lutra lutra*/struktura populacije/Goričko/neinvazivni monitoring/molekularni označevalci/mikrosateliti
KK AGRIS /
AV JONTEZ, Hana
SA SUŠNIK BAJEC, Simona (mentorica)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2016
IN POPULACIJSKA STRUKTURA VIDRE (*LUTRA LUTRA*) V KRAJINSKEM PARKU GORIČKO
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 54 str., 14 pregl., 13 sl., 3 pril., 115 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Krajinski park Goričko leži v severovzhodnem delu Slovenije, kjer ga naseljuje najbolj sklenjena populacija vidre v Sloveniji. Vidre so aktivne predvsem ponoči in imajo običajno velik teritorij, zato je preučevanje te vrste z metodo opazovanja oteženo. V raziskavi smo za namen genetskih analiz uporabili neinvazivno metodo vzorčenja. Med zimo 2005-2006 in zimo 2008-2009 je bilo nabranih 281 svežih vidrinih iztrebkov, od tega smo jih 158 izbrali kot ustreznih za DNK izolacijo. Zaradi različne kakovosti vzorcev je približno 30 % izolatov vsebovalo dovolj kakovostne genomske DNK za uspešno PCR pomnoževanje. Za analizo smo uporabili 12 za vrsto specifičnih mikrosatelitnih označevalcev. V populaciji smo našli 29 različnih genotipov, ki so bili navzoči na tem območju v času vzorčenja. Spol smo z restriktijsko analizo odseka gena ZFX/ZFY uspešno določili 17 genotipom in sicer v razmerju 7 samcev in 10 samic. Večino genotipov smo zaznali samo enkrat, enega pa celo sedemkrat. Ugotovili smo statistično značilno odstopanje populacije od Hardy-Weinbergovega ravnovesja, kar je značilno za večino preučevanih populacij v Evropi. Genetske podatke smo povezali s podatki vzorčenja in s tem dobili vpogled v geografsko razpršenost genotipov in oris migracije pogostejših genotipov znotraj raziskanega območja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 639.113:575(043.2)=163.6
CX otter/*Lutra lutra*/population structure/Goričko/noninvasive monitoring/molecular markers/microsatellites
CC AGRIS /
AU JONTEZ, Hana
AA SUŠNIK BAJEC, Simona (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2016
TI POPULATION STRUCTURE OF OTTER (*LUTRA LUTRA*) IN LANDSCAPE PARK GORIČKO
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 54 p., 14 tab., 13 fig., 3 ann., 115 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Goričko Landscape Park is located in the northeastern part of Slovenia, where it is inhabited with the largest otter population in Slovenia. Otters are mainly nocturnal animals and have usually a large territory. They are therefore a difficult species for monitoring with method of direct observation. In this study, the non-invasive sampling method was applied with the aim of population genetic analyses. During winter 2005-2006 and winter 2008-2009, 281 fresh spraint samples were collected and 158 samples were selected for DNA extraction. Due to the different quality of samples, about 30 % of extractions contained sufficient quality of genomic DNA for successful PCR amplification. For DNA profiling a set of 12 otter specific microsatellite markers was applied. A total of 29 genotypes present in the investigated population during sampling seasons were determined. We successfully determined sex in 17 genotypes. Restriction analysis of a segment of ZFX/ZFY gene revealed sex ratio of 10 females vs. 7 males. Most of the genotypes were detected only once, with a maximum of seven occurrences. We found a statistically significant deviation of otter population from Hardy-Weinberg equilibrium, which is found in most of the studied otter populations in Europe. Linking genetic data with the time and location of the sampled spraints enabled an insight into the geographic appearance of genotypes within the investigated area and an illustration of migration of more frequent genotypes.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 VIDRA	2
2.1.1 Opis vrste <i>Lutra lutra</i>	2
2.1.2 Prepoznavanje in sledenje vrste	5
2.1.3 Status vidre v Evropi	6
2.1.4 Varstvo vidre	9
2.2 KRAJINSKI PARK GORIČKO	9
2.2.1 Projekt Aqualutra	11
2.3 MOLEKULARNI GENETSKI OZNAČEVALCI	12
2.3.1 Mikrosateliti	12
2.3.2 Spolni kromosomi	14
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 VZORČENJE	15
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA	16
3.3 IZOLACIJA, PRIPRAVA IN ANALIZA DNK	16
3.3.1 Izolacija DNK	16
3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo	17
3.3.3 Elektroforeza na agaroznem gelu	20
3.3.4 Restrikcijska analiza	22
3.3.5 Kapilarna elektroforeza	22
3.3.6 Obdelava podatkov	23
4 REZULTATI	25
4.1 USPEŠNOST IZOLACIJE DNK	25
4.2 ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV	25
4.2.1 Vizualizacija alelov	25

4.2.2	Populacijsko genetski parametri	26
4.3	STRUKTURA POPULACIJE	29
4.3.1	Ocena številčnosti genotipov	29
4.3.2	Povezanost genotipov	31
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	33
5.1	IZOLACIJA DNK IZ IZTREBKOV VIDER	34
5.2	ODSTOPANJE OD HARDY-WEINBERGOVEGA RAVNOVESJA	35
5.3	VELIKOST POPULACIJE	37
5.4	INTERPRETACIJA MOŽNIH SORODSTVENIH RAZMERIJ MED GENOTIPI	37
5.5	PRIMERJAVA PODATKOV S SLIKAMI FOTOPASTI	38
5.6	SKLEPI	39
6	POVZETEK	41
7	VIRI	42

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1:	Za vidro, <i>Lutra lutra</i> , specifični mikrosateliti (Dallas in Piertney, 1998)	18
Preglednica 2:	Volumni reagentov za pripravo reakcijske mešanice PCR za en vzorec in en lokus	19
Preglednica 3:	Sestava agaroznega gela	21
Preglednica 4:	Sestava uporabljenih pufrov	21
Preglednica 5:	Volumni reagentov za restrikcijsko analizo gena ZFX/ZFY za en vzorec	22
Preglednica 6:	Volumni reagentov za analizo s kapilarnim sekvenatorjem za en vzorec	23
Preglednica 7:	Pregled uspešnosti izolacije DNK po sezонаh	25
Preglednica 8:	Opis alelov na posameznem lokusu	26
Preglednica 9:	Redki aleli na posameznem lokusu	27
Preglednica 10:	Pogosti aleli na posameznem lokusu	28
Preglednica 11:	Opažena in pričakovana heterozigotnost	28
Preglednica 12:	Pogostost pojavljanja posameznega genotipa	30
Preglednica 13:	Primerjava uspešnosti izolacije DNK z drugimi viri	34
Preglednica 14:	Primerjava populacijskih parametrov z drugimi viri	35

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Vidra s plenom (Mann, 2010)	3
Slika 2: Vidra z mladičem (Thomason, 2014)	4
Slika 3: Razširjenost vidre (<i>Lutra lutra</i>) po Evropi leta 2008 (Sites ... , 2010)	6
Slika 4: Razširjenost vidre (<i>Lutra lutra</i>) po Sloveniji (Kryštufek, 2001: 655)	8
Slika 5: Zemljevid Krajinskega parka Goričko (Goričko ... , 2010)	10
Slika 6: Velika Krka (foto: Hana Jontez)	10
Slika 7: Hodoško jezero na Goričkem (foto: Hana Jontez)	11
Slika 8: Lokacije nabiranja vzorcev	15
Slika 9: Programi, ki smo jih uporabili v tehniki PCR	20
Slika 10: Prikaz alelov na lokusih Lut833, Lut701 in Lut715 za vzorec g16 (ime 8)	26
Slika 11: Geografsko-sezonska porazdelitev najdenih genotipov	31
Slika 12: Korespondenčna analiza	32
Slika 13: Vidrini mladiči iz istega gnezda pod mostom Peskovskega potoka, dne 13. 4. 2006 (Hönigsfeld Adamič in Smole, 2011: 65)	39

KAZALO PRILOG

Priloga A: Seznam vzorcev, ki so bili izbrani za izolacijo DNK

Priloga B: Genotipi osebkov

Priloga C: Izločeni genotipi

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov (ang. amplified fragment length polymorphism)
AR	bogastvo alelov
CITES	konvencija o mednarodni trgovini z ogroženimi prosto živečimi živalskimi in rastlinskimi vrstami (ang. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)
CMR	metoda ulova – označevanja – ponovnega ulova (ang. capture – mark – recapture)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat
EDTA	etilen diamin tetraacetat
FCA	faktoska korespondenčna analiza (ang. factorial correspondence analysis)
F_{IS}	koeficient parjenja v sorodstvu
H_E	pričakovana heterozigotnost
H_O	opažena heterozigotnost
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnovesje (ang. Hardy-Weinberg equilibrium)
IUCN	Mednarodna zveza za ohranjanje narave (ang. The International Union for Conservation of Nature)
KOŠG	konzervativna ocena števila genotipov
$MgCl_2$	magnezijev klorid
NA	število alelov
NGS	neinvazivno genetsko vzorčenje (ang. non-invasive genetic sampling)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
RAPD	naključno pomnoževanje polimorfne DNK (ang. random amplified polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. restriction fragment length polymorphism)
SRY	lokus, ki določa spol (ang. sex determining region)
TBE	Tris borat EDTA pufer
UTM	univerzalni koordinatni sistem (ang. universal transverse mercator)
UV	ultravijolična svetloba
ZFX/ZFY	cinkov prst na lokusu X oziroma Y (ang. zinc finger protein locus)

1 UVOD

V Evropi živi le ena vrsta vidre, evrazijska vidra (*Lutra lutra*). Ta plenilka najvišjega reda je v celoti prilagojena na vodno okolje. Naseljuje sorazmerno čiste sladkovodne ekosisteme, kjer je naravno vodno okolje še ohranljeno in je zato dober kazalec kakovosti vodnih habitatov.

Razširjena je bila po vsej Evropi. V prejšnjem stoletju pa je v razvitih deželah postala žrtev intenzivnega kmetijstva, industrijskih odpak, splošnega onesnaževanja voda, uničevanja naravnega okolja ter pretiranega lova, kar je predvsem v večjem delu srednje Evrope povzročilo izumrtje, preostale populacije so ostale ločene med seboj. Danes je vidra, vključno z njenim naravnim življenjskim prostorom, mednarodno strogo zavarovana vrsta sesalca. Pred začetkom varovanja in ohranjanja redkih, ogroženih vrst so potrebne informacije o velikosti in strukturi populacije. Tako vedno večji pomen dobivajo metode varstvene genetike, s katerimi pridobimo številne informacije o genetskem stanju populacije.

Zaradi vidrinega življenjskega sloga in predvsem nočne aktivnosti, je vidro v naravi težko opaziti in posledično težko preučevati. Vidre so samotarji in zelo teritorialne živali, zato je najpomembnejši način sporazumevanja med osebkami markiranje z iztrebki in izločki analnih žlez. Ogroženost vrste ne dopušča možnosti invazivnega vzorčenja, zato pobiranje iztrebkov predstavlja najbolj pogosto metodo neinvazivnega vzorčenja. Populacijsko genetske analize vidre temeljijo predvsem na genotipizaciji več za vrsto specifičnih mikrosatelitnih lokusih. Z informacijami o genetski raznolikosti in strukturi populacij vider, tako na mitohondrijski kot na jedrni ravni, so danes razmeroma bogate le zahodne države Evrope ter Češka, Slovaška in Madžarska, kjer so populacije opisane kot stabilne.

Krajinski park Goričko, kjer je bila izvedena naša raziskava v okviru projekta Aqualutra, se ponaša z najbolj vitalno, sklenjeno populacijo vider v Sloveniji. Goričko je le del trideželnega krajinskega parka, ki se nadaljuje na madžarsko in avstrijsko stran. Zato predvidevamo, da je vidrina populacija na Goričkem del večje populacije, ki je s sosednjima državama povezana predvsem z rekama Ledavo in Veliko Krko.

Namen diplomske naloge je proučiti osnovne populacijsko genetske parametre populacije vidre v Krajinskem parku Goričko, oceniti številčnost populacije, spolno strukturo, sorodstveno povezavo osebkov ter njihovo geografsko razpršenost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VIDRA

Vidre so zveri, ki spadajo v družino kun (*Mustelidae*). Delijo se na štiri rodove in trinajst vrst. Evrazijska vidra spada med rečne vidre (rod *Lutra*) in je edina predstavnica svojega rodu v Evropi. Njeno znanstveno ime je *Lutra lutra*. Najdeni fosilni ostanki številnih vider so stari od 5 do 23 milijonov let (Otters ... , 2005). Evolucijsko je evrazijska vidra verjetno najmlajša vrsta vider (Hönigsfeld, 1986). Vidre so po svetu zelo razširjene. Najdemo jih na vseh celinah, razen v Avstraliji in na Antarktiki. Evrazijsko vidro najdemo skoraj po vsej Evropi, Aziji in državah Severne Afrike (Maroko, Alžirija in Tunizija) (Foster-Turley in sod., 1990).

2.1.1 Opis vrste *Lutra lutra*

Evrazijska vidra je manjša predstavnica rodu *Lutra*. Ima vitko, dolgo, hidrodinamično telo. Samica meri v dolžino 1 m, samec pa 1,2 m. Rep predstavlja tretjino skupne dolžine telesa. Povprečna teža je 5 do 7 kg za samice in 8 do 11 kg za samca (Hönigsfeld Adamič, 2009a). Je rjave barve s temnejšim hrbtom in svetlejšo trebušno površino (Kruuk, 2006). Rep je debel, mišičast, prožen, obložen s tolščo in klinasto zožen proti konici. Vidra rep uporablja za pogon pri hitrem plavanju, za usmerjanje med počasnim plavanjem ter za ravnotežje pri stoji na zadnjih nogah (Otters ... , 2005).

Štiri razmeroma kratke noge vidri omogočajo kopanje, sprehajanje, negovanje in manipulacijo s plenom. Prsti na tacah so povezani z močno plavalno kožico, kremlji so kratki, široki in niso zložljivi. Stopa s celim stopalom. Vdrine sledi so zelo karakteristične, s stopinjami z vsemi petimi prsti (Kruuk, 2006). Kot večina drugih kun, ima tudi vidra par analnih žlez ob zadnjični odprtini. Žleze sestavljajo lojnice in plašč apokrinih cevastih žlez. Ušesa ima zelo majhna in zaobljena. Nosna blazinica vider je gola, črne barve in v obliki črke W. Tako kot ušesa, vidra zapre tudi nosnice, ko je pod vodo (Hönigsfeld, 1986).

Kožuh, ki ga sestavlja tudi več kot 50 tisoč dlak/cm² (Hönigsfeld Adamič, 2011), mora nenehno negovati, da ohrani svoje lastnosti izolacije. Vidra ima približno 50 % hitrejši metabolizem kot kopenski sesalci podobne velikosti in ustvari več telesne toplotne. Gosti kožuh ji nudi nekaj izolacije, a kljub temu metabolizem zahteva večji vnos kalorij. Na dan pojedo hrano v količini 15 % do 20 % svoje telesne mase (Otters ... , 2005). Glavni vir hrane

so ribe, dvoživke in raki (slika 1). Prehranjuje se tudi s pticami, kačami, občasno tudi z žuželkami in sesalci. Poleti pogosteje pleni žuželke in plazilce, pozimi pa dvoživke (Prigioni in sod., 2006a). Pri iskanju hrane se obnaša oportunistično; ujame, kar je najlažje in v letnem času najbolj dostopno. Vidra je igriva, zvedava žival in odlična plavalka. Plava s premikanjem zadnjih nog in repa, pri čemer na vodi za sabo pušča sled v obliki črke V (Kruuk, 2006).



Slika 1: Vidra s plenom (Mann, 2010)

Vidro najdemo v vseh vrstah celinskih voda (reke, potoki vseh velikosti in mirne vode, kot so kanali, jezera in ribniki), kot tudi estuarijih in morskih zalivih (Chanin, 2003a). Veliko časa preživi na kopnem, a se ne zadržuje dlje kot nekaj sto metrov stran od vode. Njena skeletna struktura in mišičje ji omogoča tudi kopensko gibanje. Prehodi lahko precejšnje razdalje, tudi do 50 km, ko se seli z enega vodnega vira do drugega. Pri teku lahko doseže hitrost do 47 km/h. Če potuje po snegu in ledu, uporabi kombinacijo teka in drsenja (Otters ... , 2005).

Vidra je aktivna predvsem ponoči. Areal aktivnosti (obseg zemljišča in vode, kjer se žival giblje) vidre se razlikuje po lokaciji in razporeditvi virov in je večinoma večji pri samcu, saj samčev razpon areala pogosto prekriva areal ene ali več samic. Samčev areal lahko v ravni dolžini meri 16 do 24 km, samičin pa 8 do 16 km (Hönigsfeld, 1986). Če je gostota populacije zelo majhna, so lahko ta območja velika tudi do 40 km. Ozemlje ali teritorij je drugačno od areala aktivnosti in je na splošno manjši. Ozemlja samcev se ne prekrivajo, enako velja za samice (Otters ... , 2005). Družbeni sistem je zapleten kjub temu, da je vidra po naravi samotar. Kadar vidimo več vider na kupu, je to pogosto samica z mladiči. Večina samcev in samic oblikuje ločeno hierarhijo dominantnosti. Najvišje uvrščeni samec zasede najbolj ugodna območja. Nekaj samic (ponavadi bližnjih sorodnic) lahko živi na skupnem

teritoriju. Izogibanje je zelo pomemben dejavnik v socialnem obnašanju. Samci ignorirajo samice in mladiče skozi večji del leta (Kruuk, 2006). Polovico populacije predstavljajo osebki, starejši od dveh let, samo samci pa do 60 % celotne populacije (Chanin, 2003a).

Vidra je izrazito teritorialna vrsta. Svoje ozemlje redno označuje z urinom in iztrebki (vidreki), ga nadzira in brani. Sporočilni iztrebki (angl. »spraint«) so bolj kašasti in odišavljeni z izločki analnih žlez in glede na velikost živali zelo majhni. Večji samci se iztrebljajo večkrat na dan v majhnih količinah. Sporočilne iztrebke vidra najpogosteje izloča na deblih, skalah, poteh, pod mostom, na kupu postrganega peska ali drugih izpostavljenih mestih (Kruuk, 2006). Za rutinsko, sistematično iztrebljanje uporabljajo območja, imenovana markirne postaje. Te so ponavadi enakomerno razporejene po celotnem območju vidre, 40-70 m narazen, desetkrat pogostejše pa so vzdolž obale. Za raziskovanje lastnih in tujih iztrebkov porabi veliko časa. Vsaka vidra ima svoj značilen vonj, unikaten kot prstni odtis. Iz iztrebka razbere informacije, kot so identiteta, starost, spol in pripravljenost na parjenje ter mejo ozemlja (Otters ... , 2005). Markiranje je sezonsko zelo različno in je v manjši meri odvisno od spola. Samice z mladiči namreč manj markirajo (Kruuk, 1992).

Vidra koti v vseh letnih časih, v Sloveniji jo z mladiči najpogosteje opazimo aprila in maja (slika 2) (Hönigsfeld, 1986). Na kopnem, v zavarovanem brlogu, skoti enega do tri mladiče. Mladiči se skotijo slepi in brezzobi. Z materjo ostanejo do enega leta oziroma do skotitve naslednjega legla (Otters ... , 2005). Po ločitvi od matere potujejo mladiči nekaj časa v skupini. Potrebujejo še pol leta, da postanejo dobri ribiči (Kruuk, 2006).



Slika 2: Vidra z mladičem (Thomason, 2014)

Vidra ima kratko življenje. Živi okoli 4 leta (Kruuk, 2006). Chanin (2003a) navaja največjo starost 12-16 let. Smrtnost mladičev v prvem letu je ocenjena na 32 %, v drugem letu življenja na 54 %. Smrtnost nato s starostjo upada, a le manj kot četrtina samic živi dovolj dolgo, da bi imela svoje potomce (Otters ..., 2005).

2.1.2 Prepoznavanje in sledenje vrste

Vidra živi človeku prikrito življenje in je aktivna predvsem ponoči, zato jo le redko opazujemo neposredno v njenem okolju. Ta metoda zahteva velik vložek časa in osebja ter ni primerna za dolgoročno spremeljanje vrste (Chanin, 2003b). Običajno se rezultati opazovanja dopolnijo s podatki sledenja živali z radijskimi oddajniki, ki so lahko pritrjeni na hrbet (Quaglietta in sod., 2012) ali vstavljeni pod kožo (Soto Azat in sod., 2008). Tako je mogoče zbrati verodostojne podatke o velikosti in izkoriščenosti teritorijev, o razporeditvi in uporabi skrivališč, socialnih interakcijah, ... (Hönigsfeld, 1986). Največjo težavo predstavlja ulov in imobilizacija živali za namestitev oddajnika. Na ta način pridobljene informacije so bolj primerne za raziskavo posameznih osebkov kot populacije (Chanin, 2003b). Na Škotskem so uporabili tehniko intramuskularnega injiciranja radioaktivnega izotopa cinka, ki se ga v iztrebkih sledi še sedem mesecev (Jenkins, 1980).

Spremljanje s kamerami omogoča snemanje skupin živali, ki potujejo skupaj in posreduje informacijo o velikosti živalske družine. Na nekaterih območjih imajo vidre specifične oznake pod brado, ki lahko služijo za prepoznavanje posameznih osebkov, vendar je dovolj jasno in približano sliko tega dela telesa na živi živali težko dobiti (Chanin, 2003b).

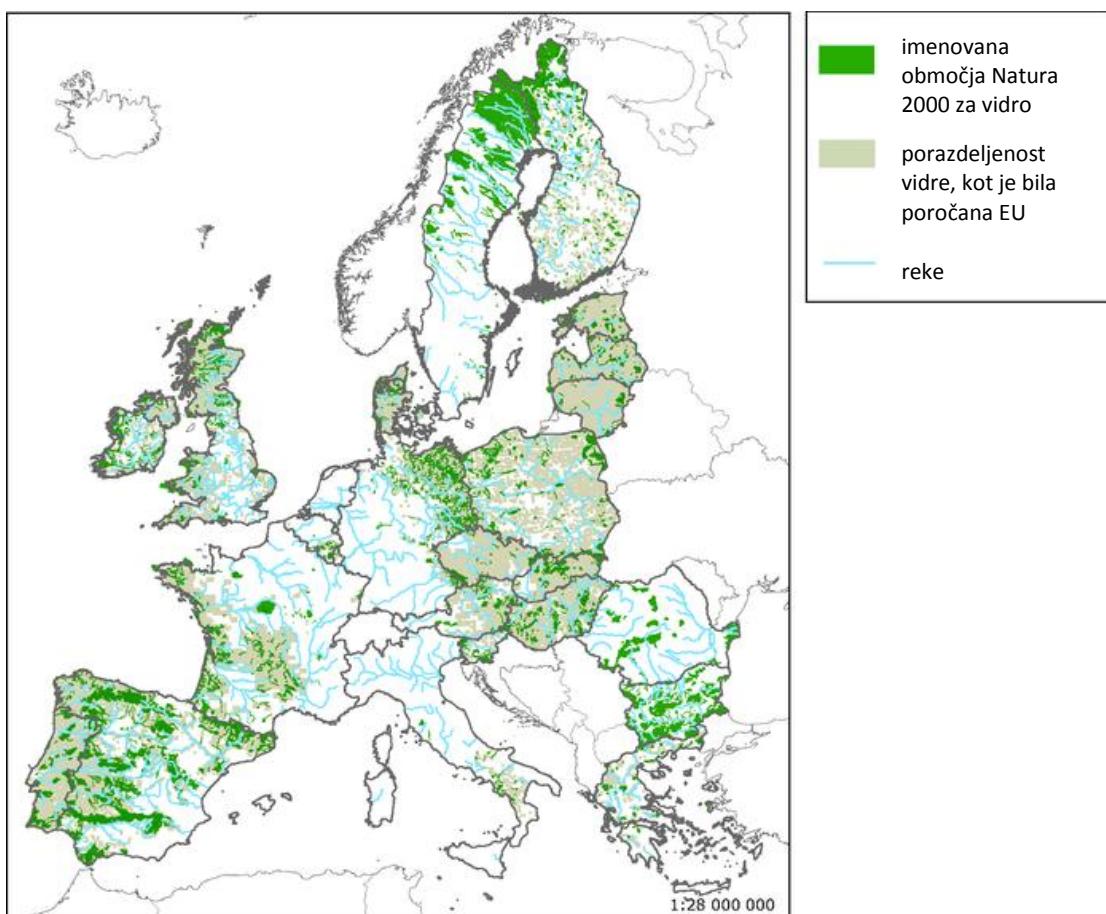
Najzanesljivejši znak vidrine navzočnosti so vidreki. Danes se za območni pregled vrste po vsej Evropi uporablja standardna metoda za inventarizacijo vidre, ki temelji na mreži kvadrantov po 10 km^2 (UTM). Upoštevajo se samo sledi in iztrebki. Pri odkritju zanesljivih znamenj se mesto označi kot pozitivno (Macdonald, 1983). Terenske raziskave se ponovijo v intervalu nekaj let, s čimer se ocenijo spremembe v stanju in porazdelitvi osebkov v daljšem časovnem obdobju (Foster-Turley in sod., 1990).

Prelomnico v raziskovanju vidrinih populacij predstavlja možnost, da lahko z analizo DNK iz iztrebkov dobimo natančno informacijo o posameznem osebku (Chanin in Coxon, 2000). Neinvazivna genetska metoda zazna skoraj dvakrat večje število vider kot metoda sledenja, v primerjavi z ulovom in izpustom živali pa so razlike še večje. Tako daje ta metoda bolj objektivno oceno stanja populacije (Arrendal in sod., 2007; Hájková in sod., 2009). Vzorci

iztrebkov se lahko nabirajo med rutinskim monitoringom, vendar je potrebno upoštevati nekaj omejitvev. Iztrebki morajo biti nabrani in shranjeni pravilno, saj je DNK, pridobljena iz iztrebkov, slabše kvalitete in kvantitete v primerjavi z DNK, pridobljeno iz običajnih virov (dlaka živali s korenino, kri ali tkivo). Iztrebki naj bi se nabirali v roku 12 ur po odlaganju in pred deseto uro zjutraj, drugače se lahko razgradijo in postanejo neuporabni. Shranjujejo se v primerni raztopini in pri -20 °C, kar onemogoča razgradnjo DNK (Jansman in sod., 2001).

2.1.3 Status vidre v Evropi

V zadnjih desetletjih se je vidrin obsežni naravni areal močno skrčil. V Evropi je le nekaj držav, ki jih vidra še v celoti naseljuje (slika 3). Med vzhodno in zahodno Evropo nastaja prazno območje, kar lahko preprečuje stike med populacijami. Tako bodo predvsem populacije v Španiji, Franciji, na Portugalskem in v Italiji povsem izolirane (Foster-Turley in sod., 1990).



Slika 3: Razširjenost vidre (*Lutra lutra*) po Evropi leta 2008 (Sites ... , 2010)

V večini držav natančna razširjenost ni znana. Precej neraziskana je Romunija (Conroy in Chanin, 1998). Na vzhodu Nemčije najdemo le nekaj primerkov vider (Kalz in sod., 2006), v Belgiji (Libois in Hallet, 1995) in Švici (Weber, 1990) je praktično iztrebljena. Povsem iztrebljene so v Liechensteinu, Luksemburgu in na Nizozemskem (Conroy in Chanin, 1998). V zelo omejenem obsegu se pojavlja v Italiji (Prigioni in sod., 2006b). Pred kratkim se je ponovno pojavila v severnem delu Italije na meji s Slovenijo (Pavanello in sod., 2015).

V Franciji se vidra pojavlja le na skrajnem zahodu in manjšem osrednjem delu države (Geboes in sod., 2016). Tudi v Španiji je najbolj razširjena na zahodu, čeprav je prisotna skoraj vsepovod po državi (Elliot, 1983). Na območju bivše Jugoslavije najdemo vidro na celinskem delu Hrvaške (Jelić, 2013) in v osrednjih delih BiH, drugod so prisotne majhne populacije živali, ki so geografsko ločene med seboj (Conroy in Chanin, 1998).

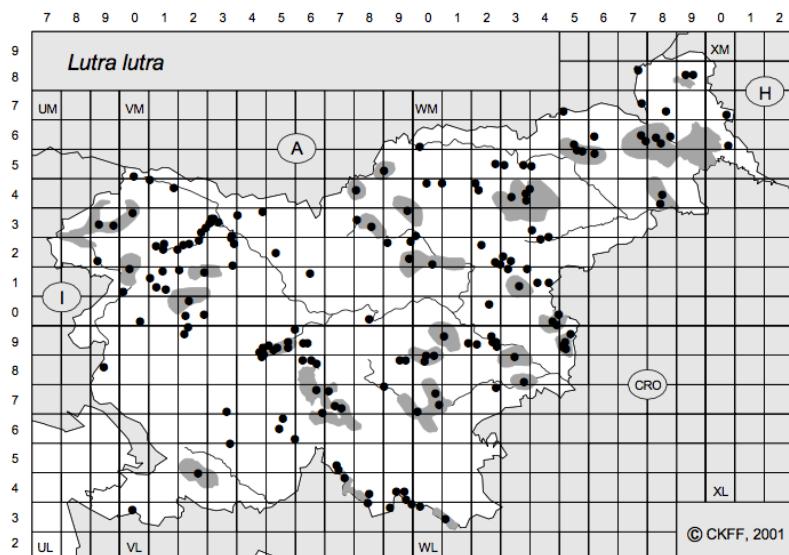
Kljub temu, da več kot tretjino svetovne populacije, nekje med 60 in 80 tisoč osebki, najdemo na ruskem območju (Oleynikov in Saveljev, 2015), se populacija na Portugalskem šteje kot ena najpomembnejših, saj ima najbolj zdravo in razmeroma neogroženo populacijo vidre v Evropi (Trindade, 1994). Vidra je razširjena na Poljskem (Brzeziński in sod., 1996), Slovaškem (Urban, 2010), Madžarskem (Kemenes, 1991), v Baltskih državah (Mickevičius, 1993), na Irskem (NPWS, 2009) in v Veliki Britaniji, kjer so večje populacije predvsem v gorskih in obalnih območjih ter na Škotskem (Macdonald, 1983). Na Finskem (Conroy in Chanin, 1998), Švedskem (Arrendal, 2007), v Avstriji (Jahrl, 1998) in Grčiji (Gaethlich, 1988) je razpršena po vsej državi, nekaj populacij je geografsko izoliranih.

Danes se vidre počasi vračajo v vse več vodotokov po vsej Evropi (Assessing ... , 2010). Primer države, kjer je vidra v zadnjih 20 letih sama ponovno naselila skoraj celotno območje, je Češka (Šimek in Kadlecíková, 2010). Kjer naravna naselitev zaradi izkoreninjenja ali izolacije preostalih populacij ni več možna, so načrtovani projekti za ponovno naseljevanje vidre v okolje (Arrendal, 2007).

Evropski živalski vrti so začeli z rejskim programom za to vrsto leta 1990. Predpogoj za ohranitev vitalne populacije je gensko upravljanje, ki preprečuje parjenje med sorodnimi osebki in ohranja genetsko variabilnost. Ti programi vključujejo tako premestitve vider iz enega na drugo območje kot tudi izpustitev v ujetništvu rojenih živali (Melissen in Princée, 2001). Med drugim so bili uspešno izvedeni na Švedskem (Arrendal in sod., 2004), v Španiji (Fernández Morán in sod., 2002; Ferrando in sod., 2008) in na Nizozemskem (Koelewijn in sod., 2010), neuspešno pa v Švici (Weber, 1990) in Franciji (Geboes and sod., 2016).

Nekateri projekti so bili izpeljani še preden so bile na voljo kakršnekoli informacije o genetski strukturi populacije. Danes pa IUCN smernice za ponovno naselitev živali v okolje narekujejo, da mora biti osnovna populacija ponovno naseljenih živali genetsko čim bolj podobna prej živečim genotipom na tem območju (IUCN, 1998). Z namenom, da bi odkrili strukturo populacije, opredelili genski tok med populacijami in sledili postopkom procesa ponovnega naseljevanja te vrste, so bile v številnih evropskih državah izvedene genetske študije (Ferrando in sod., 2008; Mucci and sod., 2010; Koelewijn in sod., 2010; Geboes in sod., 2016).

Natančnih podatkov o razširjenosti vidre v Sloveniji ni, saj območni državni pregled vidre še ni bil izveden. Zgodovinski podatki kažejo, da je poleg območja Goričko, vidra opažena praktično po vsej Sloveniji (slika 4). Srečamo jo na Dravinji, Savi, Reki, Kolpi, Sotli, redno se pojavlja na Krki in določenih odsekih Drave. Pogosta je na Ljubljanskem barju (Hönigsfeld Adamič in sod., 2009), območju Pesnice z jezeri, ob Soči in Jadranskem povodju pa je precej redka (Hönigsfeld Adamič, 2003). Vrnila se je na Cerkniško jezero (Hönigsfeld Adamič, 2010), prisotnost je potrjena tudi v Loški dolini (Draškovič in Krofel, 2012).



Slika 4: Razširjenost vidre (*Lutra lutra*) po Sloveniji¹ (Kryštufek, 2001: 655)

¹ Prikaz lokalitet taksona (*Lutra lutra*) z natančnostjo 3-8, kjer pomeni:

3 – večji kraj; območje med 6 in 130 km²

8 – 1:5.000; GIS

2.1.4 Varstvo vidre

Na začetku 20. stoletja je bila vidra razširjena po vsej Evropi, v drugi polovici 20. stoletja pa je iz nekaterih evropskih držav že skoraj povsem izginila. Množičen in načrten lov zaradi njenega krvna in zmotnega mišljenja o vidri kot gospodarski nadlogi oziroma ribjemu škodljivcu, je bil hud udarec za populacijo; njihovo število je hitro upadalo (Hönigsfeld, 1986).

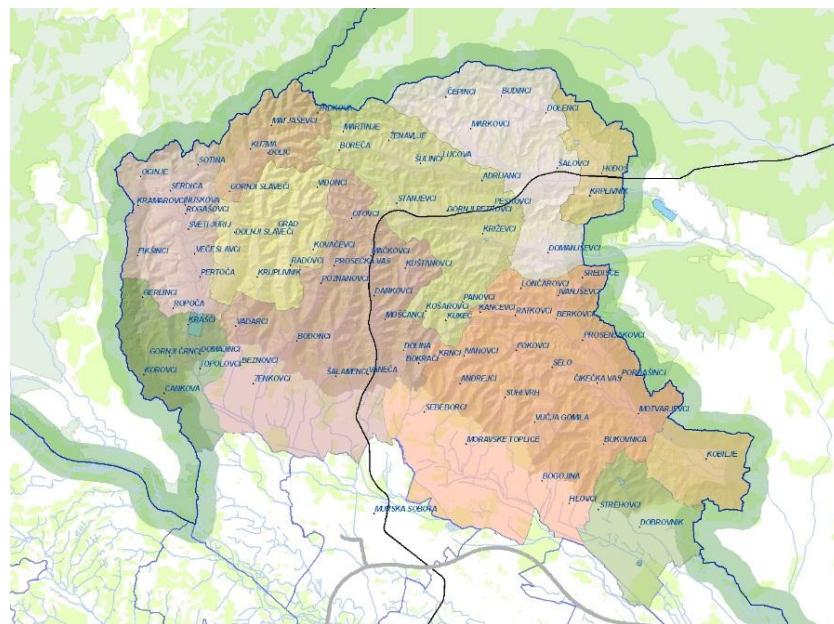
Danes je vidra zaščitena z Bernsko konvencijo, ki je bila sprejeta leta 1979. Navedena je v Prilogi II. Ta zakon strogo prepoveduje lov, ulov in trgovino z vidrami na evropskem območju (Convention on the ... , 1979). Kljub temu se vidre še vedno soočajo s številnimi grožnjami. Vzroki za zmanjševanje števila osebkov populacije so glede na državo ali regijo različni. Glavni razlogi so izguba primerrega habitata, podvodne pasti, namenjene ribam, promet, premajhna ozaveščenost ljudi o ohranjanju vider ter bioakumulacija toksičnih snovi v prehranski verigi, kar zmanjša plodnost oziroma poveča dovzetnost za bolezni (Foster-Turley in sod., 1990).

Evropska habitatna direktiva navaja vidro v Dodatku II kot živalsko vrsto, za ohranjanje katere je treba določiti posebna ohranitvena območja, ter Dodatku IV kot živalsko vrsto, ki jo je treba strogo varovati (Direktiva ... , 1992). Navajata jo tudi Konvencija o mednarodni trgovini z ogroženimi prostoživečimi živalskimi in rastlinskimi vrstami (CITES) v Prilogi I (Convention on International ... , 1973) in rdeči seznam ogroženih sesalcev Slovenije (Pravilnik ... , 2002). V svetovnem merilu se je leta 2000 uvrščala med ranljive vrste, od leta 2004 naprej se uvršča med skoraj ogrožene vrste (Roos in sod., 2015).

Ohranitev vidre ni usmerjena le v varstvo živalske vrste. Zaradi njenih ekoloških zahtev, kot so čista voda, dovolj razpoložljivih plenskih vrst, ohranjena vodna struga ..., je vidra dober kazalec kakovostnega in ohranjenega vodnega ekosistema (Ruiz in sod., 1998).

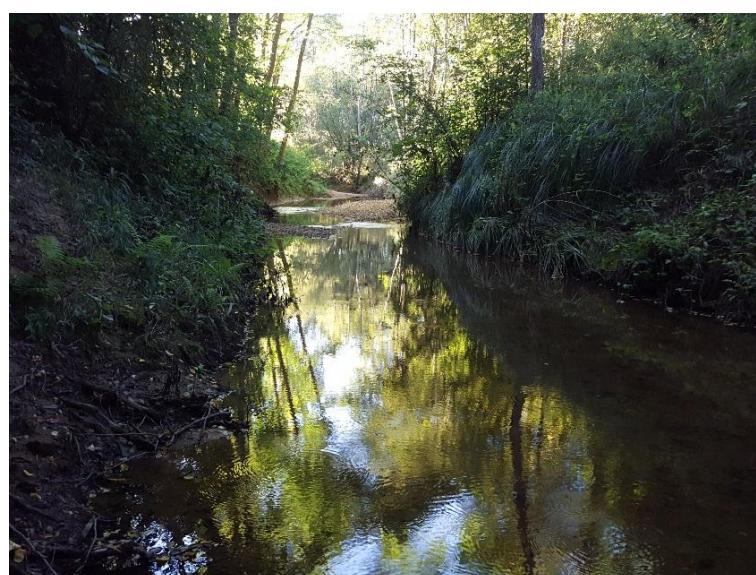
2.2 KRAJINSKI PARK GORIČKO

Krajinski park Goričko je del Trideželnega krajinskega parka Goričko – Örseg – Raab. Ustanovljen je bil 9. oktobra 2003 v Ljubljani (Uredba o Krajinskem ... , 2003). To je edini naravni park treh držav, s površino 46.200 ha pa hkrati drugi največji naravni park v Sloveniji (slika 5). Meja parka poteka po ločnici med prekmursko ravnico in gričevjem ter po državni meji z Avstrijo in Madžarsko (Parki ... , 2006).



Slika 5: Zemljevid Krajinskega parka Goričko (Goričko ... , 2010)

Goričko je, z letno količino padavin okrog 800 l/m², območje z najmanj padavinami v Sloveniji in malo oblačnimi dnevi. Čeprav najbolj sušnata slovenska pokrajina, ima prenenetljivo veliko voda, močvirij in mokrotnih travnikov. Vodno omrežje je razvejano in povezano. Sestavlja ga potoki in stoječe vode, kot so jezera, ribniki ter različna mokrišča. Veliko potokov je ostalo nereguliranih, struge so globoke in zasenčene z bujno lesno zarastjo (slika 6). Jezera so bila zgrajena z zajezitvijo potokov (slika 7) (Mencinger, 2004).



Slika 6: Velika Krka (foto: Hana Jontez)



Slika 7: Hodoško jezero na Goričkem (foto: Hana Jontez)

V vodi kot tudi v obvodnem prostoru se nahaja širok spekter živali. Rastline in živali, ki so drugod po Sloveniji redke, se tu zaradi zdrave narave pojavljajo v večjem številu. Kar nekaj rastlinskih in živalskih vrst je tudi mednarodno pomembnih (Goričko ... , 2010). S pristopom Slovenije k Evropski uniji, 1. maja 2004, je Goričko postalo del evropskega ekološkega omrežja Natura 2000. Namen tega omrežja je ohranjanje biotske raznovrstnosti. Varovanje in ohranjanje življenjskih okolij je tako osnovna naloga Krajinskega parka Goričko, saj bi uničenje le-teh pomenilo izginotje vrst na tem območju (Uredba o posebnih ... , 2004).

Eden od dokazov ohranjene narave na Goričkem je najbolj strnjena in vitalna populacija vidre v Sloveniji (Hönigsfeld Adamič, 2003). Vidra najde v potokih dovolj hrane in ob njih primerna zatočišča. Populacijo vider na tem območju je zato potrebno zavarovati, prav tako njeno življenjsko okolje, zagotoviti prehajanje vider v Avstrijo in na Madžarsko, izboljšati sobivanje prebivalstva z vidro in razvijati naravi prijazen turizem (Hönigsfeld Adamič, 2007).

2.2.1 Projekt Aqualutra

Evropska komisija je v okviru programa LIFE – Narava v Sloveniji, sofinancirala projekt Aqualutra (Ohranjanje populacije vidre (*Lutra lutra*) na Goričkem – 1. faza). Namen projekta je bil podrobni pregled vidrine razširjenosti ter ohraniti vitalno populacijo vrste *Lutra lutra* na območju Krajinskega parka Goričko. Poleg vzdrževanja vodnih ekosistemov v ugodnem stanju, so se habitati na najbolj kritičnih mestih obnovili. V okviru projekta se je

izvajala neinvazivna molekularna genetska metoda prstnega odtisa DNK, s katero smo določili lastnosti preučevane populacije kot je npr. velikost populacije, sorodnost med osebki, velikost teritorija in pogostost uporabe določenih lokacij (Hönigsfeld Adamič, 2007). Projekt je trajal od 1. novembra 2004 do 30. aprila 2009 (Hönigsfeld Adamič, 2009b).

2.3 MOLEKULARNI GENETSKI OZNAČEVALCI

Ključna informacija, ki se potrebuje pred začetkom izvajanja projektov za ohranjanje vrste, je velikost populacije in struktura populacije (raznolikost, sorodnost, razmerje med spoloma). Neinvazivno genetsko vzorčenje (NGS) postaja vse bolj priljubljena metoda za pridobitev teh parametrov (Hájková in sod., 2007).

Molekularni genetski označevalci je gen ali zaporedje DNK z znano lokacijo na kromosomu. To lahko opišemo tudi kot spremembo v zaporedju DNK, ki jo lahko opazujemo (Al-Samarai in Al-Kazaz, 2015). Prisotnost dveh ali več različnih alelov enega gena ozziroma razlike v zaporedju DNK med osebki, skupinami ali populacijami, imenujemo polimorfizem. Molekularne variacije vključujejo spremembe v nukleotidih, kot so tranzicija ali transverzija, insercija ali delecija posameznega nukleotida in variacije v številu tandemskih ponovitev zaporedja (Smith, 2002). Označevalci je lahko kratko ali dolgo zaporedje DNK, vendar mora biti lahko prepoznaven, povezan z določenim lokusom in zelo polimorfen, saj homozigoti ne zagotavljajo nobenih informacij (Lewontin, 1999). Ker molekularni genetski označevalci temeljijo na razlikah v DNK zaporedjih, okolje na njih nima vpliva, kar pomeni vedno enak rezultat za isti genotip (Spooner in sod., 2005).

Nekateri označevalci, ki se uporabljajo za preučevanje genoma so RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov), AFLP (dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov), RAPD (naključno pomnoževanje polimorfne DNK) in mikrosateliti (Spooner in sod., 2005).

2.3.1 Mikrosateliti

Genetska analiza populacije vider temelji predvsem na genotipizaciji več lokusno specifičnih mikrosatelitov (Huang in sod., 2005), ki omogočajo oceno osnovnih parametrov populacije (Frankham, 1995; Beaumont, 1999; Hung in sod., 2004).

Mikrosateliti so enostavne tandemske ponovitve kratkih odsekov DNK, ki obsegajo 1-6 baznih parov. Locirani so tako v kodirajočih kot nekodirajočih regijah in dokaj enakomerno porazdeljeni po celotnem genomu (Arif in Khan, 2009). Na vsaki strani mikrosatelita so spremljevalne regije, ki nam omogočajo razviti lokusno specifične oligonukleotidne začetnike (ponavadi 20-25 bp) za pomnoževanje mikrosatelita s PCR (verižna reakcija s polimerazo). Verjetnost najdbe takšnega odseka DNK več kot enkrat v genomu postane zanemarljivo majhna (Brooker, 2012). Lahko se uporabijo začetni oligonukleotidi, ki so bili izdelani za sorodne vrste. Rezultat pomnoževanja so fragmenti različne dolžine glede na število ponavljajočih motivov, ki jih vsebuje lokus pri posameznem osebku. Ta dolžinski polimorfizem lahko zaznamo z gelsko elektroforezo (Spooner in sod., 2005).

Visoka stopnja polimorfizma in lokusna specifičnost sta dve izmed najpomembnejših prednosti zaradi katerih so mikrosateliti zelo uporabni označevalci pri številnih analizah (Arif in Khan, 2009). Al-Samarai in Al-Kazaz (2015) navajata mikrosatelite kot robustne ter bolj variabilne in informativne označevalce v primerjavi z RFLP, RAPD in AFLP. Prav tako so uporabni za starševsko analizo in za ocenjevanje stopnje sorodnosti.

Ostale prednosti vključujejo kodominantnost alelov, njihovo številčnost v genomu evkariontov in naključno porazdelitev po genomu. Tehnika temelji na pomnoževanju s PCR, zato so potrebne le majhne količine DNK (10-100 ng/reakcijo). Ponovljivost mikrosatelitov je velika; zaradi uporabe dolgih začetnih oligonukleotidov pa ni potrebna visoko kvalitetna DNK (Mburu in Hanotte, 2005). Čeprav je mikrosatelitna analiza v bistvu tehnika enega lokusa, lahko med PCR pomnožujemo več mikrosatelitnih lokusov hkrati (ang. multiplex PCR) ali pa PCR produkte združimo in več lokusov hkrati detektiramo na gelski elektroforezi, pod pogojem, da se območje in velikost alelov različnih lokusov ne prekrivajo. To znantno zmanjša analitične stroške (Spooner in sod., 2005).

Glavna pomankljivost mikrosatelitov so visoki razvojni stroški, kadar ustreza zaporedja začetnih oligonukleotidov za željeno vrsto niso na voljo (Al-Samarai in Al-Kazaz, 2015). Čeprav so kodominantni markerji, lahko pride do napak pri določanju genotipa, če se pojavijo ničti aleli, ki so posledica mutacije na prilegajočih mestih (ni pomnoževanja želenega PCR produkta) (Mburu in Hanotte, 2005). Prisotnost ničtih alelov se poveča z uporabo mikrosatelitnih začetnih oligonukleotidov, ki so bili pridobljeni iz vrst, ki niso sorodne testirani vrsti (slabo navzkrižno pomnoževanje med vrstami). Ničti aleli pristransko ocenijo frekvenco alel in genotipov in podcenjujejo heterozigotnost (Spooner in sod., 2005).

Heterozigoti se lahko zamenjajo s homozigoti tudi v primeru, ko pride do zdrsa polimeraze med DNK replikacijo (Spooner in sod., 2005). Ker variabilnost mikrosatelitov vrednotimo na osnovi dolžine namnoženega produkta in ne nukleotidnega zaporedja, privede do napačne interpretacije rezultatov tudi pojav homoplazije, ko sta dva alela enake dolžine evolucijsko različnega izvora (Štajner, 2010).

2.3.2 Spolni kromosomi

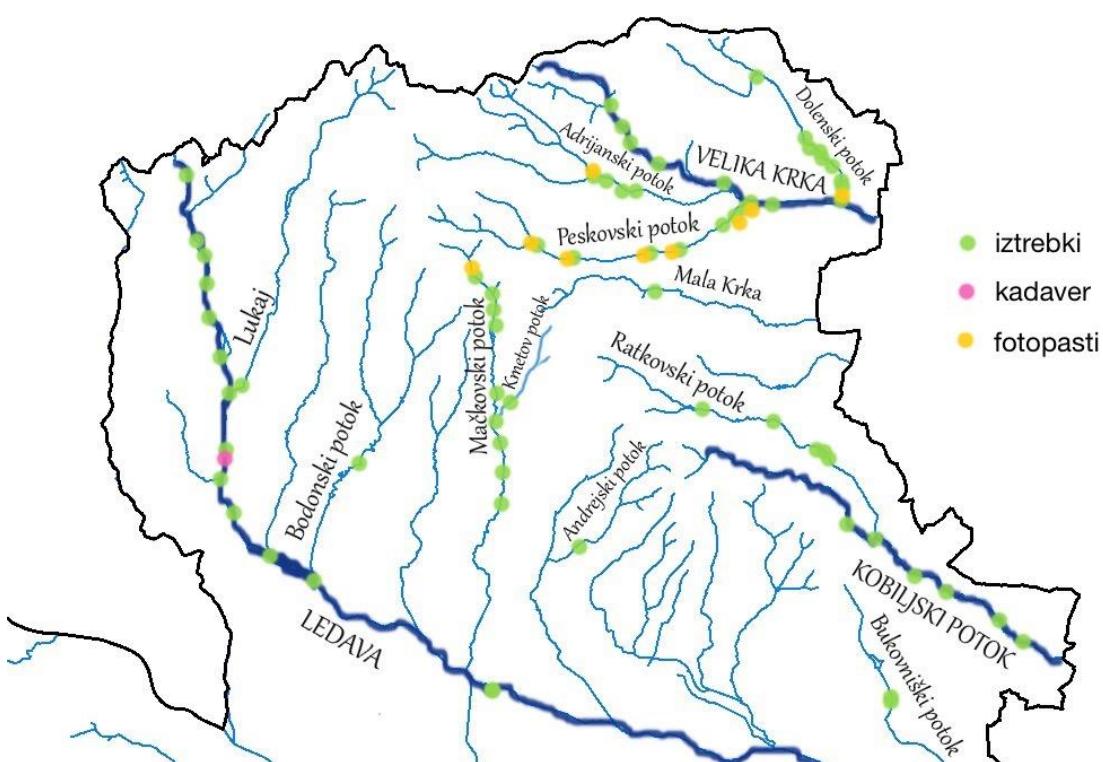
Kariotip vsakega posameznika vključuje določeno število parnih kromosomov, ki so si med seboj podobni, imenovanih avtosomni kromosomi, in en par spolnih kromosomov, ki vsebujejo zaporedje DNK, ki določajo spol posameznika. Pri sesalcih imajo samci en X in en Y kromosom, medtem ko imajo samice dva X kromosoma (Brooker, 2012).

V primerjavi s kromosomom X, se na kromosому Y nahaja relativno malo genov, vendar je za pravilen razvoj moškega osebka njihovo izražanje nujno potrebno (Brooker, 2012). Eden izmed takih je SRY gen, na podlagi katerega lahko z genotipizacijo določimo spol osebka (Dallas in sod., 2000). Za ugotavljanje spola se uporabljajo tudi homologni geni v spolnih kromosomih, kot sta npr. ZFX in ZFY, kjer genotipizacija temelji na prisotnosti enega spolno specifičnega fragmenta pri ženskah in dveh pri moških osebkih. Posledično je ta način genotipiziranja zanesljivejši od alternativnih metod, ki temeljijo na pomnoževanju le enega, za kromosom Y specifičnega, fragmenta (Mucci & Randi, 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORČENJE

Na območju Krajinskega parka Goričko so v okviru projekta LIFE opravili vzorčenje vidre in sicer tako, da so nabirali vidrine iztrebke z markacijami (sporočilnimi izločki). Med jesenjo 2005 in spomladjo 2009 so ob vodah, pod mostovi in na drugih izpostavljenih mestih nabrali 281 vzorcev (slika 8). Na določenih lokacijah se je prisotnost vidre istočasno spremjalala s kamerami, povezanimi z infrardečim senzorjem (Hönigsfeld Adamič in Smole, 2011).



Slika 8: Lokacije nabiranja vzorcev

Pobrani so bili samo sveže odloženi iztrebki, torej ne starejši od 24 ur. Vzorci so bili shranjeni v epruvetah s 95 % etanolno raztopino pri -20 °C. Za izolacijo DNK so bili izbrani sporočilni iztrebki in vzorci, ki so poleg ostankov hrane (zlasti rib, rakov in školjčnih lupin) vidno vsebovali sluzne celice. Za takšne vzorce smo predvidevali, da imajo večjo količino celic vidre in s tem tudi večjo možnost za uspešno izolacijo DNK (Hájková in sod., 2006). Pri izbiri vzorcev smo upoštevali različne lokacije v različnih časovnih obdobjih. Poleg 158 izbranih vzorcev, ki predstavljajo 56 % vseh nabranih vzorcev, smo analizirali tudi tkivo treh kadavrov in ene preparirane vidre (priloga A).

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

Za delo v laboratoriju smo potrebovali:

- reagenčne posodice	Eppendorf, Nemčija
- pipetne nastavke	Brand, Nemčija
- avtomatske pipete (10-1.000 µl)	Gilson, Francija
- vibracijski mešalnik (ang. vortex)	Assistent, Nemčija
- centrifugo 5417C	Eppendorf, Nemčija
- GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, ZDA
- kadičke za elektroforezo	Pharmacia, Švedska
- elektroforezo	Pharmacia, Švedska
- UV transiluminator Gel Doc 1000	Biorad, Nemčija
- kapilarni sekvenator ABI 3130xl	Applied Biosystems, ZDA
- digestorij	
- ledomat	
- aluminijevo folijo	
- zamrzovalno omaro	

3.3 IZOLACIJA, PRIPRAVA IN ANALIZA DNK

3.3.1 Izolacija DNK

DNK smo izolirali iz iztrebkov.

Preden smo začeli s postopkom izolacije, smo vzorce vzeli iz alkoholne raztopine in jih 15 min sušili v digestoriju. Postopek smo nadaljevali po protokolu izolacijskega paketa QIAGEN QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Protocol ... , 2001), s katerim smo iz večine vzorcev izolirali DNK. Metoda je bila opisana kot najbolj učinkovita pri pridobivanju DNK iz vidrinih iztrebkov (Lampa in sod., 2008).

Nekaj vzorca smo prenesli v mikrocentrifugirko, ki smo jo predhodno označili, preostanek pa shranili nazaj v zamrzovalnik. V mikrocentrifugirko smo dodali 1,6 mL pufra ASL. Vsebino smo temeljito pretresli in centrifugirali 1 minuto pri 20.200 rcf. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko ter ji dodali tableto InhibitEx. Sledilo je takojšnje in neprekinjeno mešanje z vortexom, dokler se tableta ni popolnoma raztoplila. Vzorec smo inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi in centrifugirali za 3 minute. Takoj po končanem

centrifugiraju smo prenesli supernatant v novo mikrocentrifugirko in vzorec ponovno centrifugirali 3 minute. Nato smo odpipetirali 25 µL proteinaze K, 600 µL supernatanta in 600 µL pufra AL v novo mikrocentrifugirko ter 10 minut inkubirali pri 70 °C. Suspenziji smo dodali 600 µL etanola in premešali. V kolono z membrano iz silikagela smo prenesli 600 µL suspenzije, centrifugirali 1 minuto, kolono prenesli v novo zbirno epruveto ter postopek ponovili trikrat. Sledili sta stopnji vezave (500 µL pufra AW1, centrifugiranje 1 minuto) in spiranja kontaminantov DNK (500 µL pufra AW2, centrifugiranje 3 minute). Po vsakem centrifugiraju smo kolono prenesli v novo mikrocentrifugirko. Postopek izolacije DNK smo zaključili z elucijo DNK. Neposredno na membrano smo dodali 100 µL pufra AE, inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 minuto. Zadnji korak smo ponovili dvakrat. Eluat smo shranjevali pri -20 °C.

3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo

PCR je v molekularni biologiji široko uporabna tehnika. PCR omogoča podvojevanje želenih odsekov DNK s pomočjo encima DNK polimeraze in je zelo podobna naravnemu procesu podvojevanja DNK. Vsak cikel sinteze poteka v treh korakih: razklenitev dvojne vijačnice, prileganje začetnih oligonukleotidov in izgrajevanje komplementarne verige DNK (PCR ... , 2006).

Tipizirali smo 13 mikrosatelitnih lokusov. Za začetek sinteze vsakega želenega odseka DNK (mikrosatelite) smo potrebovali dva začetna oligonukleotida, od katerih je bil eden fluoroscenčno obarvan z eno od barv FAM, JOE ali TAMRA (preglednica 1). Za določevanje spola smo uporabili z barvo FAM označena začetna nukleotida P1-5EZ in ZFXYRb, ki sta omogočila pomnoževanje gena ZFX/ZFY (Mucci in Randi, 2007).

Preglednica 1: Za vidro, *Lutra lutra*, specifični mikrosateliti (Dallas in Piertney, 1998)

Lokus	Začetni oligonukleotidi: smer 5'→3'	Ponovitve	Velikost (bp)	Barva	T (°C)
Lut435	F TGAAGCCCAGCTTGGTACTTC R ACAGACAGTATCCAAGGGACCTG	(CA) ₂₉	120	FAM	58
Lut453	F AGTGCTTGACTTGGTAATGG R AGACTGAAAGCTCTGTGAGGTC	(CA) ₂₆	130	JOE	55
Lut457	F CAGGTTATGGCTTATGGCTTC R CAGGGTTGATTCTGGTGAGG	(CA) ₂₆	190	FAM	55
Lut604	F TATGATCCTGGTAGATTAACTTTGTG R TTTCAACAATTCATGCTGGAAC	(CA) ₂₆	130	TAMRA	58
Lut615	F TGCAAAATTAGGCATTCATTCC R ATTCTCTTGCCTTGCTTC	(CA) ₂₇	120	JOE	58
Lut701	F GGAAACTGTTAAAGGAGCTCAC R CAGTGTTCATAAGGATGCTCCTAC	(GATA) ₁₁ GAA (GATA) ₂ GAA (GATA) ₄	200	JOE	55
Lut715	F TTCACAATAGCCAAGATATGGAC R TGGCATAATATCCTTCTCATGG	(GATA) ₆ GAT (GATA) ₇ GAT (GATA) ₅	200	FAM	55
Lut717	F TGTTGCCTTCAGAGTCCTGTG R GTCAGGCATTGTAACATATTCTCAG	(GATA) ₁₂	190	TAMRA	55
Lut733	F GATCTCATTAAATGTTCTTACAC R TGGTTCTCTGCAGGATCTG	(GATA) ₄ GAT (GATA) ₁₂	170	FAM	55
Lut782	F GAGATATCACTAACGAAATACACGGATG R ACAAAAGACTGAGCAAACAAGC	(GATA) ₆ GAT (GATA) ₁₀	190	TAMRA	55
Lut818	F AAGGATGTGAAACAGCATTG R CCATTTATACACATAAATCGGAT	(GATA) ₁₁	150	FAM	55
Lut832	F TGATACTTCTACCCAGGTGTC R TCCTTAGCATTATCTTATTACCAC	(GATA) ₁₁	180	JOE	55
Lut833	F CAAATATCCTTGGACAGTCAG R GAAGTTATCTAATTGGCAGTGG	(GATA) ₁₅	150	JOE	55

* F – začetni (ang. forward), R – povratni začetni oligonukleotid (ang. reverse primer); bp – bazni pari

V ustrezno označene 0,2 µl PCR strip tubice smo prenesli po 3 µl DNK vzorca oz. 1 µl DNK kontrole, izolirane iz mišičnega tkiva. V 1,5 ml mikrocentrifugirki smo pripravili reakcijsko mešanico PCR (ang. PCR master mix), ki je vsebovala bidestilirano vodo, reakcijski pufer z MgCl₂, začetne oligonukleotide, mešanico 4 deoksinukleotid trifosfatov (dNTP) in nazadnje DNK *Taq* polimerazo (preglednica 2). Reakcijsko mešanico PCR smo razdelili v strip tubice, ki so že vsebovale vzorčno DNK.

Preglednica 2: Volumni reagentov za pripravo reakcijske mešanice PCR za en vzorec in en lokus

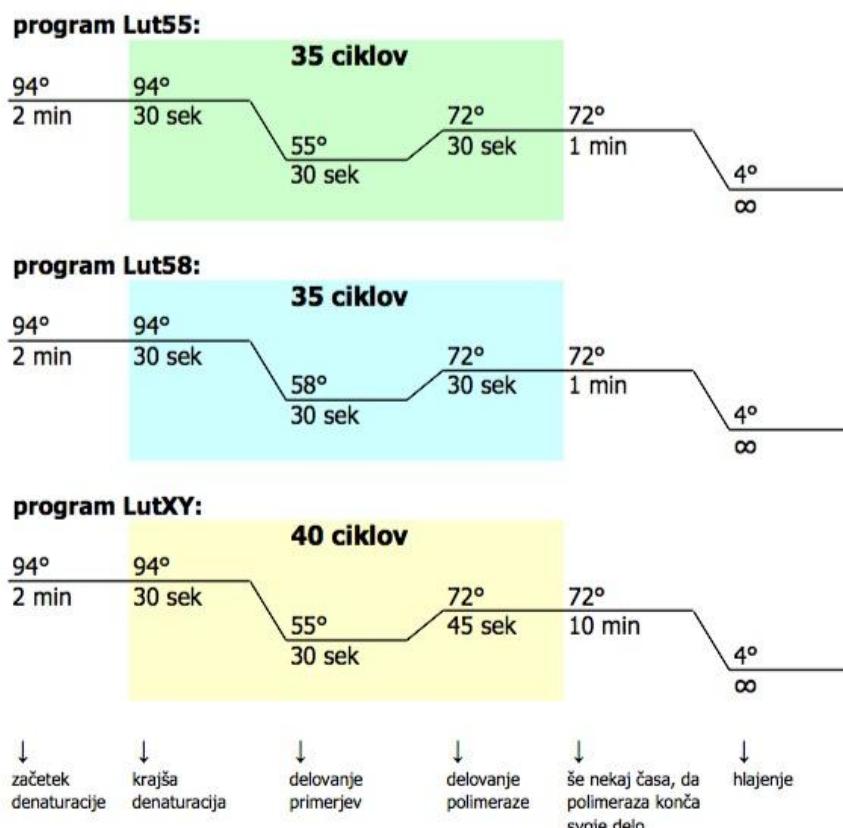
Volumen	Reagent
0,25 µl	5' začetni oligonukleotid, 0,6 µM
0,25 µl	3' začetni oligonukleotid, 0,6 µM
0,25 µl	mešanice dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 200 µM (Fermentas, Litva)
0,60 µl	MgCl ₂ , 2,5 mM (Fermentas, Litva)
1,00 µl	PCR pufer, 1x (Fermentas, Litva)
0,10 µl	DNK polimeraza <i>Taq</i> , 0,5 U (Fermentas, Litva)
3,00 µl	vzorec DNK
Σ 5,45 µl	
4,55 µl	bidestilirana voda (do 10 µl)
Σ 10,00 µl	

Aktivnost polimeraze je temperaturno pogojena, zato smo polimerazo, reakcijsko mešanico in strip tubice ves čas priprave hranili na ledu.

Sočasno smo podvojevali do 5 mikrosatelitnih lokusov, kar imenujemo hkratna PCR (ang. multiplex PCR). Ta tehnika je zelo praktična, saj prihrani veliko časa in zmanjša stroške potrošnega materiala. Pri izbiri mikrosatelitnih lokusov za hkratno PCR smo upoštevali temperaturo prileganja in obarvanost začetnih oligonukleotidov ter minimalno razliko 50 bp med velikostmi mikrosatelitnih lokusov.

Po kratkem centrifugiraju smo pripravljene PCR strip tubice prenesli v ciklični termostat. Uporabili smo programa Lut55 in Lut58, za določanje spola pa LutXY (slika 9). Razlika v časovno-temperaturnih programih je v temperaturi prileganja in številu ciklov.

Protokol za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov je bil optimiziran za vzorec DNK visoke kakovosti, izoliran iz miščnega tkiva vidre. S tem smo preprečili morebitne inhibicije PCR reakcije iz iztrebkov izolirane DNK ter preizkusili robustnost reakcije PCR (količina DNK in začetnih oligonukleotidov, temperatura prileganja).



Slika 9: Programi, ki smo jih uporabili v tehniki PCR

Napake pri genotipiziranju in ocenjevanju velikosti populacije so našli praktično v vseh študijah, ki temeljijo na neinvazivnem vzorčenju (Bonin in sod., 2004; Broquet in Petit, 2004; Pompanon in sod., 2005; Hansen in sod., 2007). Objavljeni so bili številni protokoli, ki zmanjšujejo te napake ter hkrati povečujejo uspeh pomnoževanja željenih fragmentov iz vzorcev z majhno koncentracijo DNK in DNK slabše kakovosti (Bellemain in Taberlet, 2004; Piggott in sod., 2004; Arandjelovic in sod., 2009).

Da bi zmanjšali napake pri genotipizaciji zaradi lažnih alelov in izpada alelov, smo pomnoževanje in tipizacijo mikrosatelitnih lokusov in identifikacijo spola ponovili vsaj dvakrat.

3.3.3 Elektroforeza na agaroznem gelu

Elektroforeza na agaroznem gelu je postopek, ki omogoča razvrščanje DNK molekul po velikosti. Hitrost potovanja DNK molekule pod vplivom električnega polja je odvisna od

njene velikosti in oblike. Krajše molekule v enakem času prepotujejo daljšo pot skozi gel kot daljše (Makovets, 2013).

Uspešnost izolacije DNK smo preverili na 2 % agaroznem gelu (preglednica 3). Mešanico agaroze in 0,5 x TBE pufra (preglednica 4) smo postopoma segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se ni agaroha raztopila. Mešanico smo nato ohladili na mešalu ter dodali barvilo etidijev bromid. Barvilo se veže na fragmente DNK in fluorescira pod UV svetlobo ter tako omogoča vizualizacijo fragmentov DNK. Pripravljeno mešanico smo vlili v model za gel z že vstavljenimi glavnički. Ko se je gel strdil, smo ga skupaj z modelčkom vstavili v horizontalno elektroforezno enoto z 0,5 x pufrom TBE.

Preglednica 3: Sestava agaroznega gela

Agarozni gel, 2 %

1,4 g	agaroha (Lonza, ZDA)
70 ml	TBE pufer, 0,5 M
0,5 µl	etidijev bromid (Fluka, Švica)

Na parafilm smo odpipetirali 6 µl PCR produkta lokusa Lut717 (kot najbolj zanesljivega kazalca) ter vzorcu dodali nanašalni pufer (preglednica 4). Vsebino na parafilmu smo previdno prenesli v žepke na gelu. Na vsakih 8 žepkov smo nanesli velikostni razred 100 bp (Fermentas, Litva).

Preglednica 4: Sestava uporabljenih pufrov

TBE pufer, 10x

60,50 g	Tris baza, 0,5 M
30,85 g	borna kislina, 0,5 M
3,72 g	EDTA, 10 mM
	bidestilirana voda do 1.000 ml

Nanašalni pufer

0,025 g	bromfenol modro
3,0 ml	glicerol
6,8 ml	T10E1 pufer
0,2 ml	EDTA, 0,5 M

Elektroforeza je potekala pri sobni temperaturi pod začetno napetostjo 90-100 V prvih 15 minut, nato še 20 minut pri 120 V. Gel smo osvetlili in fotografirali pod UV

transiluminatorjem Gel Doc 1000. S pomočjo standarda smo razbrali dolžine fragmentov DNK.

Vzorce, ki niso imeli jasno vidnega fragmenta na željeni dolžini, smo vrnili v postopek PCR ter jim povečali koncentracijo DNK v PCR reakcijski mešanici iz 3 µl na 5 µl. Izločili smo vzorce, ki tudi po ponovni elektroforezi PCR produkta z višjo koncentracijo DNK niso imeli jasno vidnega fragmenta. Vzorce z vidno prisotnim fragmentom pri 3 µl ali 5 µl DNK smo z enako koncentracijo uporabljali pri nadalnjem delu.

3.3.4 Restrikcijska analiza

S pomočjo restrikcijskih encimov ali endonukleaz lahko režemo DNK na določenih mestih v nekleotidnem zaporedju, ki jih imenujemo restrikcijska mesta (Brooker, 2012).

Pomnožene PCR fragmente za določanje spola smo razgradili z encimom *BsmI*. Pripravili smo restrikcijsko mešanico (preglednica 5) in jo v cikličnem termostatu inkubirali 3 ure pri 37 °C. Sledila je kapilarna elektroforeza na ABI 3110xl Genetic Analyzer ter analiza s programskim orodjem GeneMapper. Genotip samice je vseboval samo en fragment dolžine 119 bp, medtem ko genotip samca dva fragmenta dolžin (119 bp in 178 bp).

Preglednica 5: Volumni reagentov za restrikcijsko analizo gena ZFX/ZFY za en vzorec

Volumen	Reagent
1,5 µl	restrikcijski pufer
0,2 µl	encim <i>BsmI</i>
5,3 µl	bidestilirana voda
8 µl	PCR produkt

3.3.5 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je postopek ločevanja DNK molekul po velikosti z uporabo električnega polja v kapilarah. Je hitra in zelo učinkovita tehnika za ločevanje tako manjših kot večjih molekul. Za analizo v primerjavi z običajnimi vrstami elektroforez porabi malo vzorca in reagentov (Xu, 1996).

Po končani PCR smo vzorce pripravili za analizo s kapilarno elektroforezo. Na mikrotitersko ploščo smo prenesli mešanico PCR produkta vsakega vzorca, formamida in dolžinskega standarda ROX (preglednica 6). Mikrotitersko ploščo smo na kratko centrifugirali, da smo odstranili prisotne zračne mehurčke, ki bi lahko motili analizo. Ploščo smo pokrili z aluminijevim folijom in tako zaščitili v PCR produktu prisotna fluorescentna barvila pred svetlobnim virom.

Vse skupaj smo v cikličnem termostatu 1 minuto denaturirali pri 94 °C. Takoj po končani denaturaciji smo ploščo prenesli na led. S tako pripravljenimi vzorci smo izvedli kapilarno elektroforezo na 16 kapilarnem sekvenatorju ABI 3110xl Genetic Analyzer. Elektroferogramme smo analizirali s programskim orodjem GeneMapper. Velikosti alelov smo zaokrožili na cela števila.

Preglednica 6: Volumni reagentov za analizo s kapilarnim sekvenatorjem za en vzorec

Volumen	Reagent
12 µl	formamid (Applied Biosystems, ZDA)
0,4 µl	ROX standard (Applied Biosystems, ZDA)
1,5 µl	PCR produkt

3.3.6 Obdelava podatkov

Rezultate analize mikrosatelitnih lokusov smo odčitali in primerjali ročno, da bi zagotovili zanesljivo določanje genotipov zelo podobnih si vzorcev.

Za zanesljivo genetsko označevanje smo upoštevali minimalno število lokusov (Taberlet in Luikart, 1999). Izločili smo vse vzorce, ki so vsebovali informacije o aleilih na manj kot šestih lokusih. Preveč pomanjkljivih informacij je bilo tudi pri tipizaciji lokusa Lut615, zato smo ta lokus iz študije izločili.

Pomembni označevalci genetske raznolikosti so bogastvo alelov (AR), ki predstavlja povprečno število alelov posameznega lokusa, korigirano glede na število genotipiziranih osebkov, število alelov (NA), opažena (H_0) in pričakovana heterozigotnost (H_E). Naštete parametre ter stopnjo polimorfizma smo ocenili za vsak lokus posebej in sicer s programom FSTAT 2.9.3.2. (Goudet, 2002). Hardy-Weinbergov model predstavlja idealno, neskončno veliko populacijo osebkov, v kateri ni mutacij, migracij, selekcije, v kateri se parijo vsi osebki, parjenje med osebki pa je naključno. Pri izpolnjenih danih pogojih se frekvenca

alelov in genotipov iz ene generacije v drugo ne spreminja. Takšnih populacij v naravi ni, lahko pa za opazovano populacijo v naravi ugotovimo ali je opazovana populacija (oziroma njene frekvence alelov) v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (HWE) ali se od HWE statistično značilno razlikuje (Brooker, 2012). Po metodi Markove verige (ang. Markov chain model) smo testirali odmike vseh mikrosatelitskih lokusov od HWE z Bonferroni korekcijo (Rice, 1989). Program FSTAT 2.9.3.2 je podal oceno koeficiente parjenja v sorodstvu (F_{IS}).

Genetske razlike med posamezniki smo prikazali s faktorialno korespondenčno analizo (FCA) v programu GENETIX 4.05 (Belkhir in sod., 2004).

Opredeljene genotipe smo glede na podatke o vzorčenju locirali in označili na zemljevidu. Primerjali smo jih z bazo slik, pridobljenih s foto pastmi na določenih lokacijah.

4 REZULTATI

4.1 USPEŠNOST IZOLACIJE DNK

Od vseh nabranih vzorcev smo jih izolirali 56,23 % s povprečno stopnjo uspešnosti izolacije 29,75 % (preglednica 7).

Preglednica 7: Pregled uspešnosti izolacije DNK po sezонаh

Sezona	Vzorci (št.)	Izolirani vzorci (št.)	Izolirani vzorci (%)	Starost izoliranih vzorcev*	Uspešno izolirani vzorci (št.)	Uspešno izolirani vzorci (%)	Starost uspešno izoliranih vzorcev
zima 2005-06	94	34	36,17	724 dni	11	32,35	712 dni
zima 2006-07	102	40	39,22	547 dni	4	10,00	490 dni
jesen 2007	19	18	94,74	77 dni	8	44,44	75 dni
zima 2007-08	39	39	100,00	51 dni	15	38,46	40 dni
zima 2008-09	27	27	100,00	68 dni	9	33,33	81 dni
	281	158	56,23	327 dni	47	29,75	249 dni
kadaver	2	2	100,00	340 dni	2	100,00	340 dni
	283	160	56,54	328 dni	49	30,63	253 dni

* povprečna starost od dneva pobiranja vzorca do dneva izolacije DNK iz vzorca

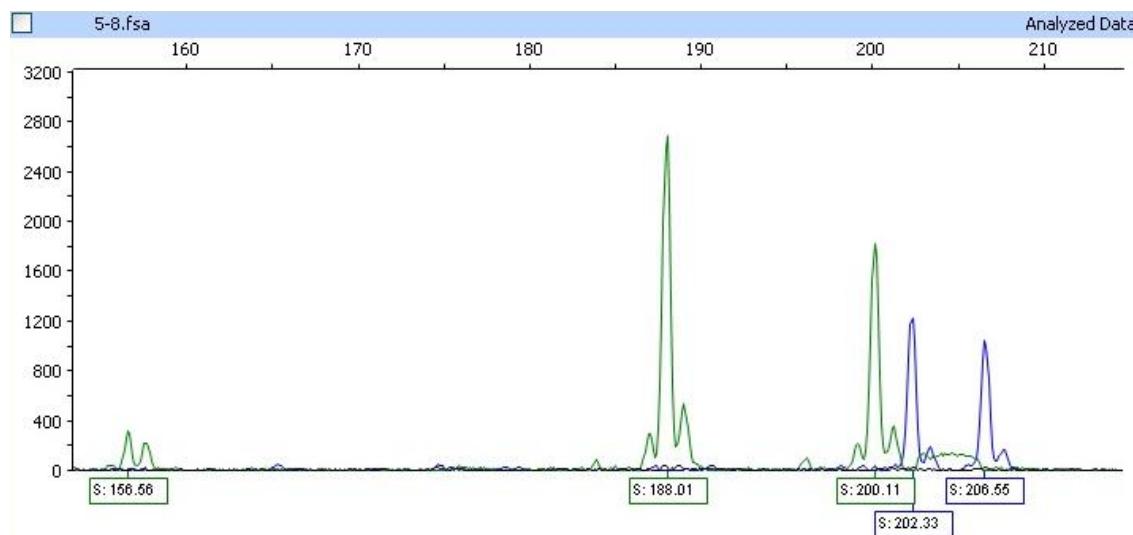
Zdi se, da je čas shranjevanja vzorcev pred izolacijo zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na učinkovitost izolacije DNK iz iztrebkov. Uspešnost izolacije DNK se namreč razlikuje med sezonomi. Vzorci zime 2007-2008 imajo s povprečno starostjo 40 dni za 6 % boljšo stopnjo uspešnosti izolacije kot vzorci zime 2005-2006, ki so bili v povprečju stari 712 dni (preglednica 7). Od pričakovanj odstopata dve sezoni v letu 2007. Zima 2006-2007 je imela s komaj 10 % uspešnostjo izolacije najmanj kakovostne vzorce. Presenetljivo pa je imela jesen 2007 najboljše rezultate; skoraj 45 % uspešno izoliranih vzorcev je imelo dovolj kakovostne genomske DNK, da je bilo mogoče uspešno PCR pomnoževanje.

4.2 ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV

4.2.1 Vizualizacija alelov

V programu GeneMapper smo pregledovali prisotnost alelov, s pomočjo elektroferograma pa ugotavljali velikost ter homozigotnost oziroma heterozigotnost alelov na posameznih lokusih. Primer izrisa elektroferograma za vzorec g16 prikazuje slika 10. Osebek je na

lokusu Lut833 homozigot (157/157), na lokusih Lut701 (188/200) in Lut715 (202/206) pa heterozigot.



Slika 10: Prikaz alelov na lokusih Lut833, Lut701 in Lut715 za vzorec g16 (ime 8)

4.2.2 Populacijsko genetski parametri

V preglednici 8 so zbrani podatki o številu in razponu dolžine alelov, ki smo jih zasledili pri posameznem lokusu.

Preglednica 8: Opis alelov na posameznem lokusu

Lokus	Število alelov	Bogastvo alelov	Najmanjša dolžina alela (bp)	Največja dolžina alela (bp)
Lut717	5	4,727	183	199
Lut833	10	9,132	143	169
Lut818	6	6,000	154	178
Lut715	8	7,376	192	216
Lut701	10	9,303	182	208
Lut832	8	7,866	170	192
Lut782	4	3,885	185	193
Lut733	9	8,413	159	177
Lut453	3	2,997	122	126
Lut604	5	4,999	129	139
Lut435	5	4,977	122	132
Lut457	6	5,661	179	191

* bp – bazni pari

Na vseh lokusih smo našli 79 različnih alelov. Število alelov na posameznem lokusu se giblje med 3 in 10. Povprečno število alelov na lokus je 6,58. Največjo polimorfnost imata lokusa Lut833 in Lut701, najmanjšo pa lokus Lut453. Najmanjša vrednost za bogastvo alelov znaša 2,997, največja 9,303.

Literatura za raziskave na podlagi mikrosatelitnih lokusov opredeljuje alele, ki se pojavljajo s frekvenco manjšo od 0,05, kot redke alele ter alele, ki se pojavljajo s frekvenco manjšo od 0,01, kot zelo redke alele. Aleli, ki niso redki, so pogosti (Hale in sod., 2012). Tako smo v naši raziskavi za redkost alelov upoštevali frekvence, ki so navedene v literaturi, pogostim alealom pa smo na podlagi normalne porazdelitve podatkov določili frekvenco pojavljanja 0,34 ali več, ki predstavljajo vsaj 1/3 vseh opažanj.

V populaciji se nahaja 23 redkih alelov (29,11 %) (preglednica 9). Največ redkih alelov ima lokus Lut833, lokusi Lut818, Lut453, Lut604 in Lut435 pa takšnih alelov nimajo. Zelo redkih alelov v raziskovani populaciji nismo opazili.

Preglednica 9: Redki aleli na posameznem lokusu

Lokus	Število alelov	Redek alel (in njegova frekvenca pojavljanja)		
Lut717	2	183 (0,023)	199 (0,023)	
Lut833	5	143 (0,019)	145 (0,037)	149 (0,037)
Lut818			163 (0,037)	169 (0,019)
Lut715	3	208 (0,019)	214 (0,039)	216 (0,019)
Lut701	4	182 (0,019)	190 (0,019)	192 (0,039)
Lut832	3	178 (0,042)	180 (0,042)	182 (0,042)
Lut782	1	187 (0,035)		
Lut733	3	159 (0,036)	171 (0,018)	175 (0,036)
Lut453				
Lut604				
Lut435				
Lut457	2	189 (0,039)	191 (0,019)	
	23			

Pogostih alelov je bistveno manj, predstavljajo le 13,92 % vseh alelov (preglednica 10). V povprečju ima lokus 2,88 redkih in 1,22 pogostih alelov.

Preglednica 10: Pogosti aleli na posameznem lokusu

Lokus	Število alelov	Pogost alel (in njegova frekvenca pojavljanja)	
Lut717	2	191 (0,341)	195 (0,523)
Lut833	1	157 (0,463)	
Lut818			
Lut715	1	206 (0,462)	
Lut701			
Lut832	1	188 (0,458)	
Lut782	1	189 (0,569)	
Lut733			
Lut453	2	124 (0,431)	126 (0,483)
Lut604	1	133 (0,375)	
Lut435	1	124 (0,370)	
Lut457	1	179 (0,558)	
		11	

Heterozigotnost je dobro merilo stopnje genetske raznolikosti, ki predstavlja raznolikost alelov in genotipov v preučevani populaciji. Višje vrednosti imajo tisti lokusi, ki imajo večje število alelov, ki se malo razlikujejo v frekvencah. Vrednosti opažene heterozigotnosti se gibljejo med 0,42 in 0,71 (preglednica 11). Večina lokusov ima vrednosti opažene heterozigotnosti nad 0,5. Manjše vrednosti opazimo na lokusih Lut717, Lut715, Lut782 in Lut457. Na lokusu Lut453 je opažena heterozigotnost malce večja od pričakovane. Povprečna vrednost opažene heterozigotnosti v populaciji je 0,55, pričakovane pa 0,71. Povprečni koeficient parjenja v sorodstvu (F_{IS}) znaša 0,25. Pozitivne vrednosti F_{IS} pomenijo manjšo heterozigotnost v populaciji od pričakovane, kar je lahko posledica nenaključnega parjenja oziroma parjenja v sorodstvu. Samo lokus Lut453 ima rahlo negativno vrednost F_{IS} , ki pa ne odstopa signifikantno od nič.

Preglednica 11: Opažena in pričakovana heterozigotnost

Lokus	H_0	H_E	F_{IS}	Statistična značilnost
Lut717	0,4545	0,6012	0,266	ns
Lut833	0,5926	0,7401	0,217	ns
Lut818	0,5263	0,8047	0,370	***
Lut715	0,4231	0,7249	0,432	***
Lut701	0,5769	0,8084	0,304	***
Lut832	0,5000	0,7309	0,335	***
Lut782	0,4483	0,5951	0,263	ns

se nadaljuje ...

... nadaljevanje

Lut733	0,6786	0,8048	0,175	ns
Lut453	0,5862	0,5737	-0,004	ns
Lut604	0,7083	0,7439	0,069	ns
Lut435	0,6296	0,7387	0,166	ns
Lut457	0,4231	0,6361	0,352	***
	0,5456	0,7085	0,249	***

Ho – opažena heterozigotnost; H_E – pričakovana heterozigotnost; F_{IS} – koeficient parjenja v sorodstvu; Statistična značilnost – odstopanje F_{IS} vrednosti od 0 (merilo za Hardy-Weinbergovo ravnovesje) (** P < 0,001; ns – statistično neznačilna odstopanja)

Na petih od dvanajstih lokusov smo ugotovili statistično značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja (preglednica 11). Tudi celokupna F_{IS} vrednost je visoko statistično značilno različna od nič.

4.3 STRUKTURA POPULACIJE

4.3.1 Ocena številčnosti genotipov

Ob upoštevanju visoke variabilnosti mikrosatelitnih lokusov je verjetnost, da bi imela dva različna osebka popolno enake mikrosatelite na 12 lokusih, zelo majhna. Zato smo pojav istega genotipa šteli kot najdbo iztrebka iste živali. Dodatno težavo pri interpretaciji genotipov predstavljajo nepopolni genotipi, zlasti tisti, ki imajo določene alele na le nekaj lokusih. V takih primerih verjetnost, da nepopolni genotip v resnici predstavlja nov genotip, z naraščajočim številom manjkajočih lokusov drastično pada. Po drugi strani pa zaradi slabe kakovosti DNK nekaterih izvlečkov DNK, majhne razlike v posameznih genotipih (npr. le en drugačen alel od 24), v kombinaciji s slabo kakovostjo elektroforetskih sledi, ni najbolj prepričljiv dokaz za obstoj novega genotipa. Zato smo vse podatke genotipizacije večkrat skrbno preverili ter zelo podobne genotipe zbrali skupaj v en genotip. To pomeni, da nekateri genotipi, ki so se pojavili večkrat, niso bili vedno popolnoma enaki pri vseh lokusih. Naše ocenjeno število genotipov je zato verjetno podcenjeno in ga imenujemo konzervativna ocena števila genotipov (KOŠG). Kljub jasno edinstvenim kombinacijam alelov na določenih lokusih, smo izločili pet genotipov zaradi prevelike nepopolnosti v celotnem genotipu (priloga C).

Po teh pravilih smo v preiskovani populaciji v petih sezонаh vzorčenja našli 29 različnih genotipov. Vsak genotip predstavlja edinstveno kombinacijo alelov, ki so navedene v prilogi B. Za 16 osebkov nismo uspeli pridobiti popolnega genotipa.

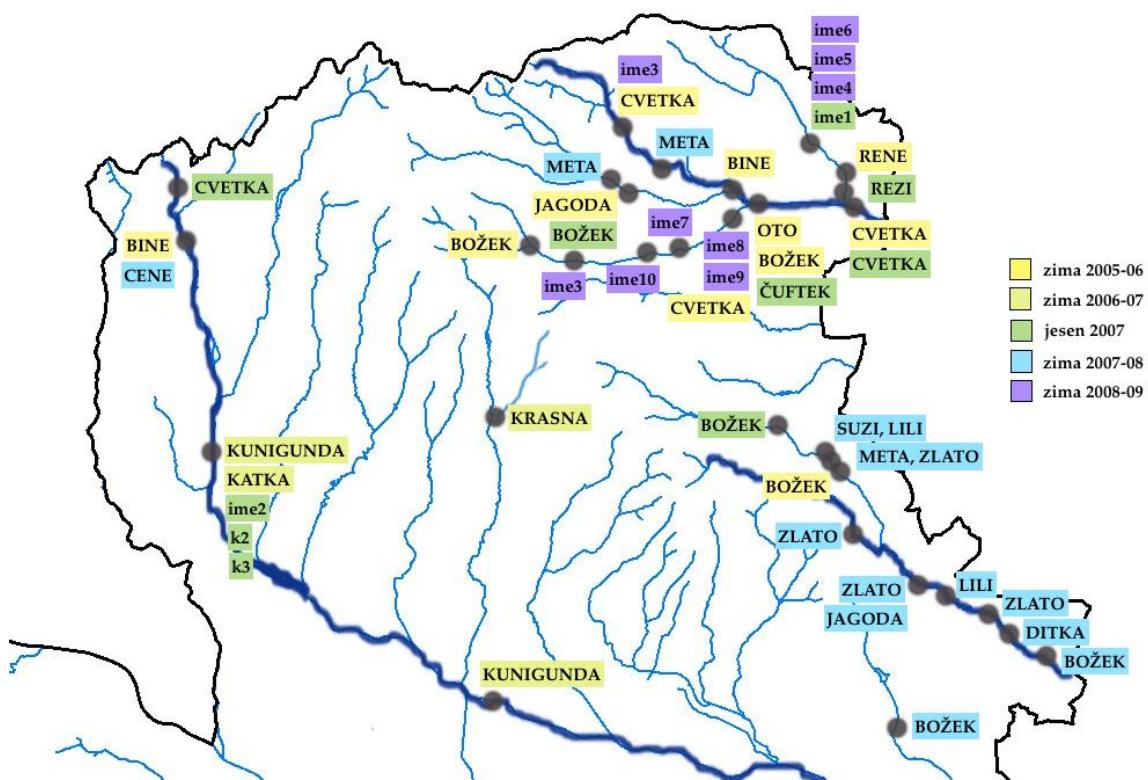
Z označevalcem ZFX/ZFY smo uspešno določili spol 17 genotipom, od tega je 7 samcev in 10 samic. Tem genotipom smo dodelili konkretno ime, ki je na vrsto spola žensko ali pa moško, ostalim smo dodelili identifikacijsko številko. Največkrat smo posamezni genotip opazili enkrat, tretjino genotipov pa vsaj dvakrat (preglednica 12). V več kot eni sezoni smo opazili samo tri genotipe in sicer genotip Božek, Cvetka in Jagoda.

Preglednica 12: Pogostost pojavljanja posameznega genotipa

Ime	Pogostost	Število sezón	Spol*
1 Bine	2	1	♂
2 Božek	7	3	♂
3 Cene	1	1	♂
4 Cvetka	5	2	♀
5 Čuftek	1	1	♂
6 Ditka	1	1	♀
7 Jagoda	2	2	♀
8 Katka	1	1	♀
9 Krasna	1	1	♀
10 Kunigunda	2	1	♀
11 Lili	2	1	♀
12 Meta	3	1	♀
13 Oto	1	1	♂
14 Rene	1	1	♂
15 Rezi	1	1	♀
16 Suzi	1	1	♀
17 Zlato	4	1	♂
18 ime 1	1	1	
19 ime 2	1	1	
20 ime 3	2	1	
21 ime 4	1	1	
22 ime 5	1	1	
23 ime 6	1	1	
24 ime 7	1	1	
25 ime 8	1	1	
26 ime 9	1	1	
27 ime 10	1	1	
28 k2	1	1	♂
29 k3	1	1	♂

* ♀ – ženski spol (samica) ; ♂ – moški spol (samec)

Genotipom smo na podlagi lokacije in datuma vzorčenja določili geografsko in sezonsko porazdelitev na geograski karti območja vzorčenja (slika 11). Iz slike je razvidno, da so genotipi posamezne sezone locirani predvsem na enemu od treh glavnih vodotokov. Tako območje Velike Krke pokrivajo predvsem genotipi iz zime 2005-2006 in zime 2008-2009, območje Ledave genotipi iz zime 2006-2007 ter območje Kobiljskega potoka genotipi iz zime 2007-2008.

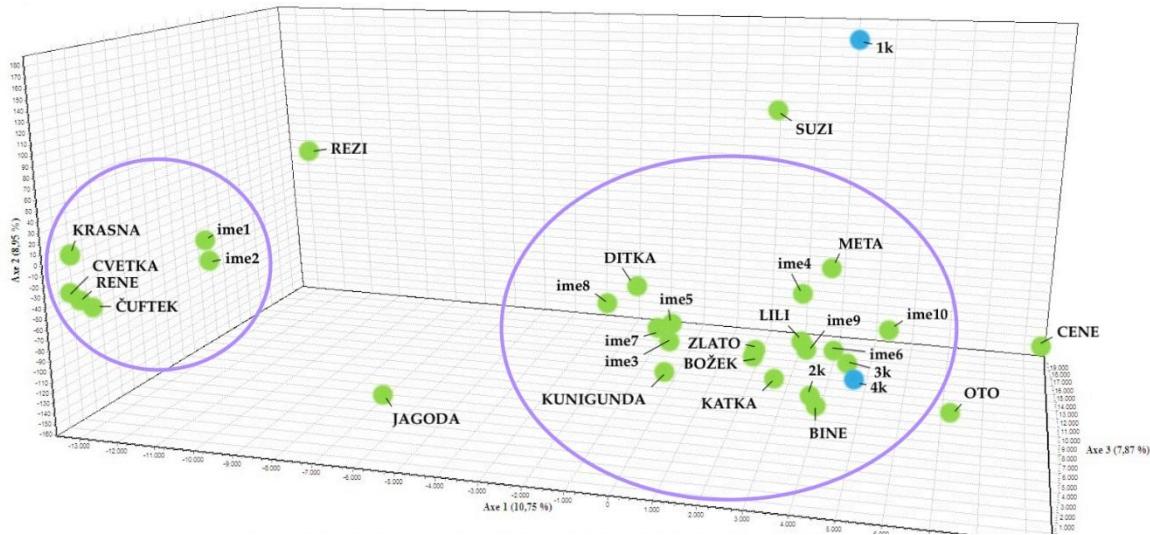


Slika 11: Geografsko-sezonska porazdelitev najdenih genotipov

4.3.2 Povezanost genotipov

Sorodstvene odnose med posameznimi genotipi predstavljamo s korespondenčno analizo (slika 12). Vzorci so razporejeni glede na genetsko raznolikost preko treh osi. Prva os pojasni 10,75 % variacije med vzorci, druga 8,95 % in tretja 7,87 %. Z modro barvo sta označena genotipa oziroma vzorca, ki ju nismo vključili v analizo populacijsko genetskih parametrov, primerjali pa smo njuno sorodstveno povezavo z ostalimi genotipi. Kadaver 1 je bil namreč najden izven območja Krajinskega parka Goričko (Razkrižje, rokav Mure), vzorec preparirane vidre 4k pa je brez znane lokacije.

Preučevano populacijo vider lahko razdelimo v eno večjo in eno manjšo družino, šest genotipov (Rezi, Jagoda, Suzi, Oto, Cene, 1k) pa kot sorodnike teh družin.



Slika 12: Korespondenčna analiza

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Neinvazivno genetsko vzorčenje postaja vse bolj priljubljena metoda za pridobivanje podatkov o redkih ali ogroženih živalskih vrstah, med drugimi tudi o vidrah. Število vider smo ocenjevali s tako imenovano metodo ulova, označevanja in ponovnega ulova (CMR, ang. capture – mark – recapture) (McKelvey in Schwartz, 2004). Namesto izraza »ulov« bomo v nadaljevanju uporabljali izraz »najdba«. Predvidevali smo, da vzorci izvirajo od iste živali, če so se genotipi ujemali in jih šteli kot »ponovno najdbo« iste živali. Genotipi, ki se niso ujemali z ostalimi, so kazali na »novo najdeno« žival.

Kritičen dejavnik pri ocenjevanju številčnosti živali z metodo CMR je vzorčenje. Vidrini iztrebki so znani po majhnih količinah DNK, ki jo je mogoče izolirati iz iztrebkov, ter slabi kakovosti DNK z nizkim uspehom genotipizacije in visoko stopnjo napak pri genotipizaciji (Pompanon in sod., 2005; Lampa in sod., 2008). Napake genotipizacije v povezavi z nezadostnim razlikovanjem genotipov pa vodijo v precenjevanje oziroma podcenjevanje ocene velikosti populacij.

Precenitev številčnosti osebkov v populaciji je posledica t.i. osebkov »duhov«, ko zaradi napak pri genotipizaciji različni vzorci iste živali ne dajo enakih rezultatov. To navidezno ustvari nove genotipe. V modelu CMR so ti prikazani kot »novo najdene« živali namesto »ponovno najdene« živali, kar vodi v večje število posameznikov in posledično v večjo oceno velikosti populacije od dejanske. Do podcenjevanja številčnosti osebkov pride v primeru, kadar si vzorci različnih osebkov na videz delijo isti genotip. Vzorci enega osebka so zaradi napak v genotipizaciji dodeljeni drugemu osebku oziroma si dva različna osebka delita isti genotip, kar je lahko posledica ali prenizke možnosti razlikovanja med genotipoma (premajhno število analiziranih mikrosatelitnih lokusov) ali pa ker sta osebka enoajčna dvojčka. Takšni vzorci so prikazani kot »ponovno najdene« živali namesto na »novo najdene« in s tem podcenjujejo dejansko velikost populacije.

Da bi se izognili napakam pri določanju CMR, smo po genotipizaciji podatke večkrat skrbno preverili in poiskali morebitne napake. Pri interpretaciji nepopolnih oziroma nezanesljivih genotipov smo, da ne bi precenili velikosti populacije ter njene genetske raznolikosti, uporabili konzervativno metodo (Taberlet in sod., 1996; Waits in sod., 2001).

5.1 IZOLACIJA DNK IZ IZTREBKOV VIDER

Iztrebki so zelo problematičen vir DNK zaradi prisotnosti velikega števila mikroorganizmov ter visoke stopnje razgrajene DNK, ki je posledica delovanja nukleaz različnih virov. Glede na starost in način shranjevanja vzorcev smo pričakovali stopnjo uspešnosti izolacije DNK med 25 in 40 % (Lampa in sod., 2008).

Uspešnost izolacije DNK iz vidrinih iztrebkov se med posameznimi raziskavami razlikuje (preglednica 13). Naša povprečna stopnja uspešnosti izolacije DNK je 29,75 %, kar je primerljivo s podatki iz literature. Z zelo veliko stopnjo uspešnosti izolacije DNK izstopata raziskavi na Tajvanu (Hung in sod., 2004), kjer so bili vzorci zamrznjeni pri -80 °C, in v Franciji (Janssens in sod., 2008).

Preglednica 13: Primerjava uspešnosti izolacije DNK z drugimi viri

Lokacija	Uspešnost izolacije DNK	Vir
Slovenija	29,75 %	naša raziskava
Velika Britanija	~ 20,00 %	Jansman in sod., 2001
Tajvan	65,00 %	Hung in sod., 2004
Češka, Slovaška	34,00 %	Hájková in sod., 2006
Nemčija	24,10 %	Kalz in sod., 2006
Italija	41,20 %	Prigioni in sod., 2006c
Madžarska	14,10 %	Lanszki in sod., 2008
Francija	73,00 %	Janssens in sod., 2008
Irska	38,00 %	White in sod., 2013

Dejavnost markiranja igra pomembno vlogo pri izbiri primernih vzorcev za izolacijo DNK. Kljub temu, da nekateri avtorji navajajo nesezonsko markiranje (Mason in Macdonald, 2004), je sezonsko pogojeno markiranje odvisno od lokacije in geografskega področja. Na Škotskem je na primer aktivnost markiranja največja pozimi in najmanjša poleti (Kruuk, 1992), v Bolgariji pa najvišja jeseni ter najnižja spomladi (Georgiev, 2008). V našem primeru je bila dejavnost markiranja najbolj intenzivna jeseni. PCR pomnoževanje fragmentov DNK vzorcev iz jeseni 2007 je bilo s skoraj 45 % najbolj uspešno.

Pomen svežine vzorca je prikazana na vzorcih iz zimskega obdobja 2007-2008. V primerjavi z ostalimi zimskimi obdobji je bil čas shranjevanja vzorcev pred izolacijo najkrajši, uspeh izolacije DNK pa je zaradi tega dosegel skoraj 40 %.

Glede na dejavnost markiranja vider na Goričkem bi bilo smiselno vzorce v primeru nadaljnih analiz pobirati v jesenskem času in jih shranjevati, če je le mogoče, pri -80 °C. Analiza DNK pa naj se opravi v čim krajšem času, saj so razlike v času shranjevanja vzorcev pokazale velik pomen pri izoliranju bolj kakovostne DNK, ki je ključna za pravilno genotipiziranje oziroma za hitrejše in boljše doseganje rezultatov.

5.2 ODSTOPANJE OD HARDY-WEINBERGOVEGA RAVNOVESJA

Alelna raznolikost oziroma povprečno število alelov na lokus je bilo višje v primerjavi z raziskavami, ki so kot vir DNK prav tako uporabile iztrebke (preglednica 14). Na lokusih Lut701, Lut715, Lut733, Lut832 in Lut833 smo zabeležili večje število alelov kot poroča literatura (Dallas in Piertney, 1998). Razlog temu so lahko potrjeni lažni aleli. Pogoj genotipizacije, da naj bi vsak alel videli najmanj dvakrat, namreč ni bil vedno izpolnjen večinoma zaradi slabe kakovosti izolirane DNK, ki ni dopuščala večkratnih ponovitev PCR.

Preglednica 14: Primerjava populacijskih parametrov z drugimi viri

Lokacija	N	N _A	H _O	H _E	F _{IS}	Signifikantnost	Vir
vir DNK je iztrebek:							
Slovenija	12	6,6	0,55	0,71	0,25	***	naša raziskava
Anglija	7-9	5,1		0,54			Dallas in sod., 2003
Tajvan	7	3,9	0,76	0,61			Hung in sod., 2004
Nemčija	6	5,3	0,64	0,65	0,16	*	Kalz in sod., 2006
Češka	10	4,5	0,51	0,53	0,02	ns	Hájková in sod., 2007
Slovaška	10	4,7	0,55	0,59	0,06	*	Hájková in sod., 2007
Švedska	8	3,4	0,55	0,53	-0,05	ns	Arrendal, 2007
Madžarska	9	5,0	0,53	0,68		ns	Lanszki in sod., 2008
Francija	9	4,0	0,50	0,52		ns	Janssens in sod., 2008
Španija	10	4,4	0,61	0,62	0,02	ns	Ferrando in sod., 2008
"	10	3,5	0,68	0,62	-0,11	ns	"
Irska	9	3,1	0,47	0,51			White in sod., 2013
vir DNK je tkivo:							
Portugalska	11	4,7	0,56	0,60	0,09	***	Mucci in sod., 2010
Španija	11	5,8	0,58	0,64	0,11	***	"
Francija	11	4,8	0,48	0,59	0,20	***	"
Anglija	11	2,5	0,46	0,43	0,04	ns	"
Irska	11	4,2	0,58	0,59	0,06	ns	"

se nadaljuje ...

... nadaljevanje

Lokacija	N	N _A	H _O	H _E	F _{IS}	Signifikantnost	Vir
Danska	11	2,9	0,35	0,39	0,14	*	Mucci in sod., 2010
Nemčija	11	6,3	0,58	0,65	0,11	***	"
Avstrija	11	4,6	0,44	0,57	0,25	***	"
Češka	11	3,9	0,50	0,51	0,04	ns	"
Slovaška	11	4,4	0,58	0,58	0,03	ns	"
Madžarska	11	3,9	0,53	0,64	0,26	***	"
Srbija, Črna gora	11	4,4	0,67	0,66	0,06	ns	"
Latvija,	11	4,3	0,69	0,63	0,00	ns	"
Belorusija							
Finska	11	6,6	0,65	0,70	0,08	***	"
Švedska	11	6,6	0,65	0,71	0,09	***	"
Norveška	11	6,8	0,50	0,65	0,24	***	"
Italija	11	2,6	0,37	0,37	0,02	ns	"

N – število analiziranih lokusov; N_A – povprečno število alelov na lokus; H_O – opažena heterozigotnost; H_E – pričakovana heterozigotnost; Signifikantnost – statistično značilno odstopanje F_{IS} vrednosti od 0 (merilo za Hardy-Weinbergovo ravnovesje) (** P < 0,001; * P < 0,05; ns – statistično neznačilna odstopanja); F_{IS} – koeficient parjenja v sorodstvu

Opažena heterozigotnost je bila kljub majhni velikosti populacije zmerna ter enaka v primerjavi z raziskavo na Madžarskem (reka Drava, približno 70 - 100 km razdalja od Goričkega) (Lanszki in sod., 2008). Od vseh raziskav, kjer je bil vir DNK vidrin iztrebek, je F_{IS} vrednost naše preučevane populacije bistveno večja od nič, kar kaže na statistično značilno odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja. Podatki se sicer ujemajo z rezultati iz tkivnih raziskav na Madžarskem in Avstriji, vendar je bilo v teh raziskavah uporabljeno malo vzorcev - le 6 oziroma 18 (Mucci in sod., 2010). Večina preučevanih populacij v Evropi ni bila v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (preglednica 14). Takšne populacije nakazujejo izgubo genetske raznolikosti, ki je v največji meri posledica majhnosti populacij in posledičnega parjenja v sorodstvu. Mucci in sod. (2010) so povečano homozigotnost teh populacij pripisali Wahlundovemu učinku (Wahlund, 1928), saj se med populacijami nahajajo velike geografske vrzeli oziroma so vsaj delno izolirane. Predvidevamo, da je ta učinek prisoten tudi na našem raziskovalnem območju. Vidrina populacija na Goričkem je namreč del večje populacije, ki se deli še na Gradiščansko populacijo v Avstriji (Sackl in sod., 1996) ter območje Zalske županije na Madžarskem (Kemenes, 1991). Na Madžarskem, kjer je prisotno večje število vider, je videti, da so populacije v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (Lanszki in sod., 2008).

Veliko oviro pri migraciji vider med državami predstavlja »črni koridor«, ki ga sestavlja regionalna cesta in meddržavna železniška povezava. Najpogosteji vzrok smrtnosti vider v zadnjem času je namreč promet (Hönigsfeld Adamič, 2007). Vnos »svežih« genov v populacijo iz drugih območij je tako otežen. Zato je v našem primeru verjetno k odstopanju od Hardy-Weinbergovega ravnovesja pripomogla tudi spolna selekcija. Najbolj dominanten samec na področju Krajinskega parka Goričko je bil Božek, ki je s svojo reprodukcijsko uspešnostjo omogočil večji prenos svojih genov (alelov) v naslednje generacije.

5.3 VELIKOST POPULACIJE

Gostota markiranja se lahko uporablja kot kazalnik za ocenjevanje velikosti populacij vider. V okviru strokovnih izhodišč za vzpostavljanje omrežja Natura 2000 so bila pregledana celotna območja vodotokov na Goričkem. Na podlagi pozitivnih najdb (iztrebki, sledi) je bila postavljena približna ocena številnosti (51 - 100 osebkov), saj po pregledu terena po standardni evropski metodi ni mogoče sklepati na številnost populacije (Hönigsfeld Adamič, 2003). Skupno število najdenih genotipov (KOŠG) v naši raziskavi se je približalo številu 30. Seveda pa dejstvo, da je bila genetska analiza interpretirana na podlagi KOŠG, še vedno dopušča možnost večjega števila dejansko prisotnih genotipov. Zelo podobni genotipi, ki so bili šteti kot isti genotip, lahko predstavljajo zelo bližnje sorodnike. Vključno z izločenimi genotipi bi se dejansko število posameznih genotipov, določenih v naši raziskavi, približalo 50.

Nekateri genotipi so bili najdeni na relativno velikem območju, kar je znak velikih migracij določenih živali. Zračna razdalja najbolj oddaljenih lokacij najdenih vzorcev posameznega genotipa je znašala dobrih 20 km. Tak primer sta Božek, ki je pokrival celotni vzhodni del krajinskega parka med Gornjimi Petrovci in Dobrovnikom, ter Cvetka, ki je prepotovala pot od Hodoša do Sotine.

Noben genotip, pridobljen iz iztrebkov, ni bil enak genotipu kadavrov.

5.4 INTERPRETACIJA MOŽNIH SORODSTVENIH RAZMERIJ MED GENOTIPI

Primerjava genotipov in njihova geografska ter sezonska porazdelitev so dejavniki, na podlagi katerih smo skušali interpretirati sorodstveno razmerje med posameznimi osebkami.

Ker je vidra izrazito teritorialna vrsta, predvidevamo, da so genotipi, najdeni v več kot dveh sezонаh na istem območju, odrasli osebki. Območje, na katerem so bili ti genotipi najdeni, predstavlja njihov areal aktivnosti. Za genotipe, najdene v samo eni sezoni, predvidevamo, da so mladiči. Kot najbolj pomembna genotipa v populaciji štejemo genotip Božeka in Cvetke, zato smo ju podrobneje analizirali in poiskali živali, ki so povezane z njima.

Božeka (♂) smo opazili kar v treh sezонаh in je pokrival zelo veliko območje. Glede na podobnost genotipov je videti, da je v ožjem sorodu z večino najdenih genotipov. Glede na razporeditev alelov sklepamo, da je verjetno brat Binetu (♂) in Katki (♀), ki se je selila na zahodni konec Krajinskega parka Goričko. Poleg tega je Božek verjetno oče Zlatu (♂) in Lili (♀), ki bi lahko bila brat in sestra. Ker sta se pojavila le v zimi 2007-2008, sta bila v tem obdobju verjetno mladiča. Meta (♀) bi lahko bila njuna mati ali teta. Tudi vsi najdeni genotipi zime 2008-2009 so videti zelo sorodni Božeku. Božek bi lahko bil njihov oče ali stric.

Božeku je do jeseni 2007 na območju Peskovskega potoka in Velike Krke družbo delala Cvetka (♀), s katero sta verjetno starša Rezi (♀) in Jagodi (♀). Cvetkini ožji sorodniki so Krasna (♀), Rene (♂) in Čuftek (♂).

Dva kadavra, najdena na istem območju Ledave v razmaku treh dni, sta verjetno brata in spadata v ožji krog Božekove družine. Izgleda, da je bila preparirana vidra sorojenec oziroma starš teh dveh kadavrov. Kadaver, najden ob Muri, ne kaže ožje sorodnosti s populacijo na Goričkem.

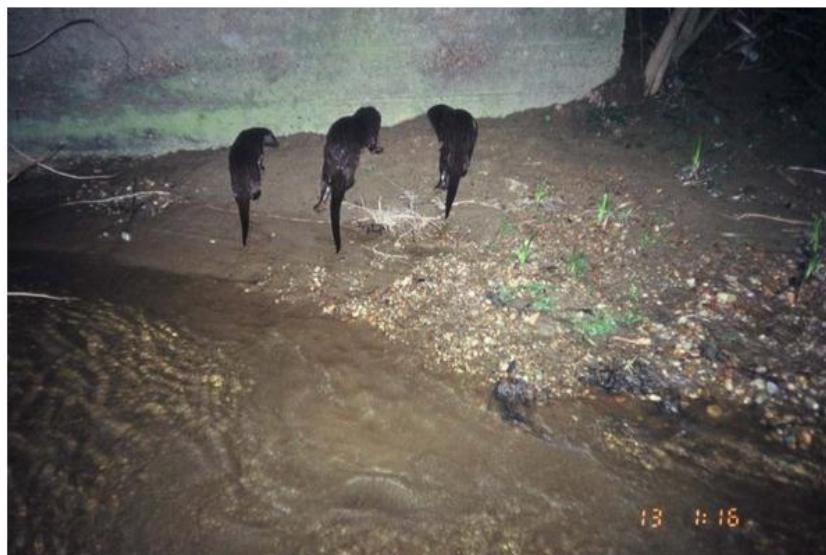
Na žalost se Božek ne sprehaja več po Goričkem, saj ga je na dan odprtja vidrinega centra Aqualutra v Križevcih, 12. 9. 2009, povozil avto (Peček, 2016).

5.5 PRIMERJAVA PODATKOV S SLIKAMI FOTOPASTI

Fotografske pasti se niso izkazale kot uporabna neinvazivna metoda za določanje posameznih vider, zato povezovanje genotipov s slikami ni bilo najbolj uspešno. Na lokacijah vzorčenja, ki so jih v istem časovnem obdobju pokrivale nameščene kamere, smo uspeli uspešno določiti le pet vzorcev oziroma štiri genotipe. Kamere so bile namreč aktivne le prvi dve sezoni vzorčenja in sicer od 6. 12. 2005 do 6. 7. 2007 (Hönigsfeld Adamič in Smole, 2011). Iz obeh sezona smo zaradi dolgega časa skladiščenja vzorcev izolirali DNK z najslabšo kakovostjo.

Hönigsfeld Adamič in Smole (2011) od 121 pridobljenih vidrinih slik sklepata, da so področje v raziskovalnem obdobju naseljevale dve do tri odrasle vidre in trije mladiči. Točnega števila odraslih živali ni bilo mogoče določiti, ker kakovost slik ni bila dovolj velika, da bi lahko identificirali isto žival na več slikah.

V istem časovnem obdobju smo z analizo DNK določili šest genotipov. Na območju Peskovskega potoka tri (Božek, Cvetka, Oto), na območju Velike Krke (Cvetka, Bine) in Dolenskega potoka po dva genotipa (Rene, Cvetka), na območju Adrijanskega potoka pa en genotip (Jagoda). Čeprav ne moremo trditi, da je na sliki Božek, Cvetka ali katera druga vidra, lahko domnevamo, da se je v fotopast ujel eden od najdenih genotipov na tisti lokaciji. Slika 13 prikazuje tri živali ob Peskovskem potoku, kar potrjuje prisotnost več kot ene živali v takratnem obdobju na tej lokaciji.



Slika 13: Viderini mladiči iz istega gnezda pod mostom Peskovskega potoka, dne 13. 4. 2006 (Hönigsfeld Adamič in Smole, 2011: 65)

5.6 SKLEPI

Uspešnost izolacije DNK iz iztrebkov vider je bila v skladu z literaturo. Glede na rezultate (dejavnost markiranja vider in razlike v kvaliteti DNK glede na čas shranjevanja) in nekatere literaturne vire pa predlagamo, da se pobiranje vzorcev opravi v jesenskem času, se jih do izolacije DNK shranjuje pri -80 °C in izolacijo DNK opravi v čim krajšem času po pobiranju.

Uporabljeni za vrsto *Lutra lutra* specifični mikrosatelitski označevalci so polimorfni. Število alelov na lokus je bilo primerljivo z drugimi raziskavami vidrinih populacij.

Ugotovili smo statistično značilno odstopanje populacije vider od Hardy-Weinbergovega ravnovesja, kar je značilno za večino preučevanih populacij v Evropi. Populacija vider nakazuje izgubo genetske raznolikosti, ki je v največji meri posledica parjenja v sorodstvu.

Skupno število najdenih genotipov (KOŠG) v naši raziskavi se je približalo številu 30. Nekateri genotipi so bili najdeni na relativno velikem območju, kar je znak velikih migracij nekaterih osebkov. Rezultati nakazujejo tudi prisotnost t.i. alfa samca (Božek), ki je pokrival veliko geografsko območje.

6 POVZETEK

Tako kot v večini evropskih držav, so v preteklosti tudi populacije vider v Sloveniji utrpele velike izgube. Po uvedbi pravnega varstva v Evropi in Sloveniji so se vidre začele počasi vračati v potoke in jezera. Naša raziskava je potekala na območju Krajinskega parka Goričko, kjer trenutno najdemo najbolj sklenjeno populacijo vider v Sloveniji. Preučevali smo genetsko pestrost vidre na Goričkem z genotipizacijo že razvitih za vrsto specifičnih molekularnih označevalcev.

V okviru projekta Aqualutra so bili med jesenjo 2005 in spomladjo 2009 nabrani viderini iztrebki, iz katerih smo izolirali DNK s 30 % uspešnostjo. Po izolaciji smo izbrane odseke DNK, to je mikrosatelite in ZFX/ZFY, pomnožili s PCR, določili dolžine alelov s pomočjo kapilarnega sekvenatorja in tako pridobili genotipe za 29 vider. S statističnimi programi smo obdelali podatke in ocenili osnovne populacijsko genetske parametre.

Na 12 polimorfnih mikrosatelitnih lokusih smo določili 79 različnih alelov s povprečnim številom 6,58 alelov na lokus, ki je primerljivo z drugimi raziskavami viderinih populacij. Povprečna vrednost opažene heterozigotnosti je 0,55, pričakovane pa 0,71. Odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnovesja je bilo statistično značilno na petih posameznih lokusih ter preko vseh lokusov v celotni populaciji.

Dobljeni rezultati so bili v veliki meri skladni z rezultati drugih avtorjev, ki so raziskovali to vrsto. Glede na povprečno opaženo in pričakovano heterozigotnost sklepamo, da se osebki z genetskega vidika ne parijo naključno. Eden izmed razlogov je verjetno spolna selekcija. Prikaz razporeditve genotipov s korespondenčno analizo nam je razkril, da genotipi v večji meri pripadajo eni sami družini. Najbolj dominanten samec na področju Krajinskega parka Goričko je bil Božek in sklepamo, da je bil »glava« te družine ravno on.

Na podlagi naših rezultatov je težko napovedati usodo vrste, saj so za opredelitev varstvenega statusa potrebna številčnejša vzorčenja populacije. Za nadaljnje študije priporočamo ponovno vzorčenje v jesenskem času, analiza vzorcev pa naj bo opravljena v čim krajšem času po pobiranju.

7 VIRI

Al-Samarai F.R., Al-Kazaz A.A. 2015. Molecular markers: an introduction and applications. European journal of molecular biotechnology, 9, 3: 118-130

Arandjelovic M., Guschanski K., Schubert G., Harris T.R., Thalmann O., Siedel H., Vigilant L. 2009. Two-step multiplex polymerase chain reaction improves the speed and accuracy of genotyping using DNA from noninvasive and museum samples. Molecular ecology resources, 9, 1: 28-36

Arif I.A., Khan H.A. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. Animal biodiversity and conservation, 32, 1: 9-17

Arrendal J. 2007. Conservation genetics of the Eurasian otter in Sweden. Acta Universitatis Upsaliensis, Digital comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology 278: 60 str.

Arrendal J., Vilà C., Björklund M. 2007. Reliability of noninvasive genetic census of otters compared to field censuses. Conservation genetics, 8, 5: 1097-1107

Arrendal J., Walker C.W., Sundqvist A.K., Hellborg L., Vilà C. 2004. Genetic evaluation of an otter translocation program. Conservation genetics, 5, 1: 79-88

Assessing biodiversity in Europe – the 2010 report. 2010. Copenhagen, European Environment Agency: 58 str.

Beaumont M.A. 1999. Detecting population expansion and decline using microsatellites. Genetics, 153, 4: 2013-2029

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05. Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, Francija.
<http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/> (25. 7. 2016)

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

- Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P., Pompanon F., Brochmann C., Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular ecology*, 13, 11: 3261-3273
- Brooker R.J. 2012. Genetics: analysis & principles. 4th edition. Clark M.C. (ur.). New York, McGraw-Hill Education: 761 str.
- Broquet T., Petit E. 2004. Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular ecology*, 13, 11: 3601-3608
- Brzeziński M., Romanowski J., Cygan J.P., Pabin B. 1996. Otter *Lutra lutra* distribution in Poland. *Acta theriologica*, 41, 2: 113-126
- Chanin P. 2003a. Ecology of the European otter. Conserving Natura 2000 rivers. Ecology series no. 10. Peterborough, English Nature: 64 str.
- Chanin P. 2003b. Monitoring the otter *Lutra lutra*. Conserving Natura 2000 rivers. Monitoring series no. 10. Peterborough, English Nature: 43 str.
- Chanin P., Coxon K. 2000. DNA fingerprinting of otter spraints. V: Proceedings of the first otter toxicology conference, Isle of Skye, sep. 2000. Conroy. J.W.H., Yoxon P., Gutleb A.C. (ur.). Broadford, Isle of Skye, International Otter Survival Fund: 167-174
- Conroy J.W.H., Chanin P.R.F. 1998. The status of the Eurasian otter (*Lutra lutra*). V: Otter conservation – an example for a sustainable use of wetlands. Proceedings VIIth international otter colloquium, Trebon, 14-19 mar. 1998. Dulfer R., Conroy J., Nel J., Gutleb A.C. (ur.). Amsterdam, IUCN/SSC Otter specialist group: 24-48
- Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. 1973. CITES.
<https://cites.org/eng/disc/text.php> (31. 5. 2016)
- Convention on the conservation of European wildlife and natural habitats. 1979. European treaty series, št. 104. Council of Europe portal.
<https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/104> (31. 5. 2016)

- Dallas J.F., Carss D.N., Marshall F., Koepfli K.P., Kruuk H., Piertney S.B., Bacon P.J. 2000. Sex identification of the Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraints. *Conservation genetics*, 1, 2: 181-183
- Dallas J.F., Coxon K.E., Sykes T., Chanin P.R.F., Marshall F., Carss D.N., Bacon P.J., Piertney S.B., Racey P.A. 2003. Similar estimates of population genetic composition and sex ratio derived from carcasses and faeces of Eurasian otter *Lutra lutra*. *Molecular ecology*, 12, 1: 275-282
- Dallas J.F., Piertney S.B. 1998. Microsatellite primers for the Eurasian otter. *Molecular ecology*, 7, 9: 1248-1251
- Direktiva sveta 92/43/EGS z dne 21. maja 1992 o ohranjanju naravnih habitatov ter prostoživečih živalskih in rastlinskih vrst. Ur.l. ES št. L 206/7/1992
- Draškovič P., Krofel M. 2012. Po sledeh vidre. Trdoživ, bilten slovenskih terenskih biologov in ljubiteljev narave, 1, 2: 28-29
- Elliot K.M. 1983. The otter (*Lutra lutra L.*) in Spain. *Mammal review*, 13, 1: 25-34
- Fernández Morán J., Saavedra D., Manteca Vilanova X. 2002. Reintroduction of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in northeastern Spain: trapping, handling, and medical management. *Journal of zoo and wildlife medicine*, 33, 3: 222-227
- Ferrando A., Lecis R., Domingo Roura X., Ponsà M. 2008. Genetic diversity and individual identification of reintroduced otters (*Lutra lutra*) in north-eastern Spain by DNA genotyping of spraints. *Conservation genetics*, 9, 1: 129-139
- Foster-Turley P., Macdonald S., Mason C. 1990. Otters. An action plan for their conservation. IUCN/SSC Otter specialist group. Illinois, Chicago Zoological Society: 126 str.
- Frankham R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetic research*, 66, 2: 95-107

Gaethlich M. 1988. Otters in western Greece and Corfu. IUCN Otter specialisr group bulletin, 3: 17-23

Geboes A.L., Rosoux R., Lemarchand C., Hansen E., Libois R. 2016. Genetic diversity and population structure of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in France. Mammal research, 61, 2: 121-129

Georgiev D.G. 2008. Seasonality in marking activity of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in southern Bulgaria. V: Proceedings of the anniversary scientific conference of ecology, Plovdiv, 01 nov. 2008. Velcheva I.G., Tsekov A.G. (ur.). Plovdiv, Faculty of biology, University of Plovdiv: 236-240

Goričko – Dežela pestrosti. 2010. Krajinski park Goričko.

<http://www.park-goricko.org/sl/prvastran.asp> (24. 11. 2010)

Goudet J. 2002. FSTAT, version 2.9.3.2. A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Lausanne University, Lausanne, Švica.

<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (24. 7. 2016)

Hájková P., Pertoldi C., Zemanová B., Roche K., Hájek B., Bryja J., Zima J. 2007. Genetic structure and evidence for recent population decline in Eurasian otter populations in the Czech and Slovak Republics: implications for conservation. Journal of zoology, 272, 1: 1-9

Hájková P., Zemanová B., Bryja J., Hájek B., Roche K., Tkadlec E., Zima J. 2006. Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces. Molecular ecology notes, 6, 2: 559-562

Hájková P., Zemanová B., Roche K., Bedřich H. 2009. An evaluation of field and noninvasive genetic methods for estimating Eurasian otter population size. Conservation genetics, 10, 6: 1667-1681

Hale M.L., Burg T.M., Steeves T.E. 2012. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. PloS One, 7, 9: e45170.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0045170> (25. 7. 2016)

Hansen H., Ben-David M., McDonald D.B. 2007. Effects of genotyping protocols on success and errors in identifying individual river otters (*Lontra canadensis*) from their faeces. *Molecular ecology resources*, 8, 2: 282-289

Hönigsfeld M. 1986. Vidra. *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758). V: Zveri I. Kune - Mustelidae. Varićak V. (ur.). Ljubljana, Lovska zveza Slovenije: 84-197

Hönigsfeld Adamič M. 2003. Strokovna izhodišča za vzpostavljanje omrežja NATURA 2000. Vidra (*Lutra lutra*). Končno poročilo. Ljubljana, Lutra, Inštitut za ohranjanje naravne dediščine: 50 str.

Hönigsfeld Adamič M. 2007. Ohranjanje populacije vidre (*Lutra lutra*) na Goričkem – 1. faza. V: LIFE III – narava v Sloveniji: zbornik projektov. Kolar Planinšič V., Lebez Lozej J. (ur.). Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor RS: 105-116

Hönigsfeld Adamič M. 2009a. Vidra, kraljica voda. Ljubljana, Lutra, Inštitut za ohranjanje naravne dediščine.

http://www.lutra.si/index.php?option=com_content&view=article&id=35%3Arazstava-aqualutra-v-bistri&catid=3%3Aktualno&Itemid=6&lang=sl (23. 11. 2010)

Hönigsfeld Adamič M. 2009b. Zakaj in kako so se vidre slikale. Porocilo projekta LIFE04NAT/SI/000234 za javnost. Ljubljana, Lutra, Inštitut za ohranjanje naravne dediščine: 7 str.

Hönigsfeld Adamič M. 2010. Vidra (*Lutra lutra*). Ljubljana, Lutra, Inštitut za ohranjanje naravne dediščine: 37 str.

Hönigsfeld Adamič M. 2011. Vidra med nebom in vodo. Svet ptic, revija Društva za opazovanje in preučevanje ptic, 17, 1: 22-23

Hönigsfeld Adamič M., Gregorc T., Nekrep I., Mohar P., Torkar G. 2009. Vidra na pragu prestolnice: Inventarizacija vidre (*Lutra lutra*) in drugih večjih vodnih sesalcev na Ljubljanskem barju in z njim povezanih vodnih ekosistemih. Zaključno poročilo naloge. Ljubljana, Lutra, Inštitut za ohranjanje naravne dediščine: 68 str.

- Hönigsfeld Adamič M., Smole J. 2011. Phototraps as a non-invasive method of monitoring otters (*Lutra lutra*). What can we expect? IUCN Otter specialist group bulletin, 28A: 60-69
- Huang C.C., Hsu Y.C., Lee L.L., Li S.H. 2005. Isolation and characterization of tetramicrosatellite DNA markers in the Eurasian otter (*Lutra lutra*). Molecular ecology notes, 5, 2: 314-316
- Hung C.M., Li S.H., Lee L.L. 2004. Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two stream systems in Kinmen. Animal conservation, 7, 3: 301-311
- IUCN. 1998. Guidelines for re-introductions. Prepared by the IUCN/SSC re-introduction specialist group. Gland, Switzerland in Cambridge, UK, IUCN: 10 str.
- Jahrl J. 1998. Distribution of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Austria 1990-1998. V: Otter conservation – An example for a sustainable use of wetlands. Proceedings VIIth International otter Colloquium, Trebon, 14-19 mar. 1998. Dulfer R., Conroy J., Nel J., Gutleb A.C. (ur.). Amsterdam, IUCN/SSC Otter specialist group: 153-156
- Jansman J., Chanin P.R.F., Dallas J.F. 2001. Monitoring otter populations by DNA typing of spraints. IUCN Otter specialist group bulletin, 18, 1: 12-19
- Janssens X., Fontaine M.C., Michaux J.R., Libois R., de Kermabon J., Defourny P., Baret P.V. 2008. Genetic pattern of the recent recovery of European otters in southern France. Ecography, 31, 2: 176-186
- Jelić M. 2013. Vidra (*Lutra lutra*). Nacionalni programi za praćenje stanja očuvanosti vrsta u Hrvatskoj. Zagreb, Državni zavod za zaštitu prirode: 31 str.
- Jenkins D. 1980. Ecology of otters in northern Scotland. I. Otter (*Lutra lutra*) breeding and dispersion in Mid-Deeside, Aberdeenshire in 1974-79. Journal of animal ecology, 49, 3: 713-735
- Kalz B., Jewgenow K., Fickel J. 2006. Structure of an otter (*Lutra lutra*) population in Germany – results of DNA and hormone analyses from faecal samples. Mammal biology 71, 6: 321-335

Kemenes I. 1991. Otter distribution, status and conservation problems in Hungary. IUCN
Otter specialist group bulletin, 6: 19-20

Koelewijn H.P., Pérez Haro M., Jansman H.A.H., Boerwinkel M.C., Bovenschen J.,
Lammertsma D.R., Niewold F.J.J., Kuiters A.T. 2010. The reintroduction of the Eurasian
otter (*Lutra lutra*) into the Netherlands: hidden life revealed by noninvasive genetic
monitoring. Conservation genetics, 11, 2: 601-614

Kruuk H. 1992. Scent marking by otters (*Lutra lutra*): signaling the use of resources.
Behavioral ecology, 3, 2: 133-140

Kruuk H. 2006. Otters. Ecology, behaviour and conservation. New York, Oxford University
Press Inc.: 280 str.

Kryštufek B. 2001. Raziskava razširjenosti evropsko pomembnih vrst v Sloveniji. Ljubljana,
Prirodoslovni muzej Slovenije: 682 str. (Neobjavljeno poročilo za Ministrstvo za okolje in
prostor)

Lampa S., Gruber B., Henle K., Hoehn M. 2008. An optimisation approach to increase DNA
amplification success of otter faeces. Conservation genetics, 9, 1: 201-210

Lanszki J., Hidas A., Szentes K., Révay T., Lehoczky I., Weiss S. 2008. Relative spraint
density and genetic structure of otter (*Lutra lutra*) along the Drava river in Hungary.
Mammalian biology, 73, 1: 40-47

Lewontin R. 1999. The problem of population genetics. V: Evolutionary genetics, from
molecules to morphology. Singh R.S., Krimbas C.B. (ur.). Cambridge, The Press
Syndicate of the University of Cambridge: 5-23

Libois R., Hallet C. 1995. Situation actuelle de la loutre, *Lutra lutra*, en Belgique et
problématique de sa conservation. Cahiers d'Ethologie, 15, 2-3-4: 157-168

Macdonald S.M., 1983. The status of the otter (*Lutra lutra*) in the British Isles. Mammal
review: 13, 1: 11-23

Makovets. S. 2013. DNA electrophoresis. Methods and protocols. New York, Springer science: 299 str.

Mann G. 2010. European otter (*Lutra lutra*). British wildlife centre. Flickr, a Yahoo company.

<https://www.flickr.com/photos/51395952@N08/albums/72157635993803023/page2>
(22. 8. 2016)

Mason C.F., Macdonald S.M. 2004. Growth in otter (*Lutra lutra*) populations in the UK as shown by long-term monitoring. AMBIO: A journal of the human environment, 33, 3: 148-152

Mburu D., Hanotte O. 2005. A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. Nairobi, ILRI Biodiversity project: 82 str.

McKelvey K.S., Schwartz M.K. 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. Journal of wildlife management, 68, 3: 439-448

Melissen A., Princée F.G.P. 2001. Genetic management of European otters (*Lutra lutra*) in european zoos. Lutra: orgaan van de Vereniging voor zoogdierkunde en zoogdierbescherming. Bulletin de la Societe pour l' etude et la protection des mammifères, 44, 2: 113-117

Mencinger B. 2004. Goričko. V: Naravni parki Slovenije. Peček A. (ur.). Ljubljana, Mladinska knjiga Založba, d.d.: 50-56

Mickevičius E. 1993. The otter in Lithuania. IUCN Otter specialist group bulletin, 8: 29-31

Mucci N., Arrendal J., Ansorge H., Bailey M., Bodner M., Delibes M., Ferrando A., Fournier P., Fournier C., Godoy J.A., Hajkova P., Hauer S., Moen Heggberget T., Heidecke D., Kirjavainen H., Krueger H.H., Kvaloy K., Lafontaine L., Lanzski J., Lemarchand C., Liukko U.M., Loeschke V., Ludwig G., Bo Madsen A., Mercier L., Ozolins J., Paunovic M., Pertoldi C., Piriz A., Prigioni C., Santos Reis M., Sales Luis T., Stjernberg T., Schmid H., Suchentrunk F., Teubner J., Tornberg R., Zinke O., Randi E. 2010. Genetic diversity and landscape genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations in Europe. Conservation genetics, 11, 2: 583-599

Mucci N., Randi E. 2007. Sex identification of Eurasian otter (*Lutra lutra*) non-invasive DNA samples using ZFX/ZFY sequences. Conservation genetics, 8, 6: 1479-1482

NPWS. 2009. Threat response plan: Otter (2009-2011). Dublin, National parks & wildlife service, department of the environment, heritage & local government, 60 str.

Oleynikov A.Y., Saveljev A.P. 2015. The distribution, population and population density of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Russia and some adjacent countries – a review. IUCN Otter specialist group bulletin, Volume 33A, Proceedings European otter workshop, 8-11 junij 2015, Stockholm, Sweden. IUCN Otter specialist group.

http://www.otterspecialistgroup.org/Bulletin/Volume33A/Vol33A_Abstracts.html#Ab7
(19. 7. 2016)

Otters. A SeaWorld education department publication. 2005. SeaWorld Inc.: 23 str.
http://c0026106.cdn1.cloudfiles.rackspacecloud.com/9d24ed62eb044291b367c40a47b02_96d_infobook-otters.pdf (14. 11. 2010)

Parki v Sloveniji. 2006. Ljubljana, Slovenska turistična organizacija, Ministrstvo za okolje in prostor: 22 str.

Pavanello M., Lapini L., Kranz A., Iordan F. 2015. Rediscovering the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Friuli Venezia Giulia and notes on its possible expansion in northern Italy. IUCN Otter specialist group bulletin, 32, 1: 12-20

PCR Application manual. 2006. 3rd edition. Degen H.J., Deufel A., Eisel D., Grünewald-Janho S., Keesey J. (ur.). Mannheim, Roche Diagnostics GmbH: 338 str.

Peček B.B. 2016. Božekovi potomci in butični turizem. Vestnik, LXVIII, 21: 17.
<http://www.pomurje.si/media/e-vestnik.201621.xxl.pdf> (15. 8. 2016)

Piggott M., Bellemain E., Taberlet P., Taylor A.C. 2004. A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. Conservation genetics, 5, 3: 417-420

Pompanon F., Bonin A., Bellemain E., Taberlet P. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. Nature review genetics, 6, 11: 847-859

Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam.
Ur.l. RS št. 72-4055/02

Prigioni C., Balestrieri A., Remonti L., Gargaro A., Priore G. 2006a. Diet of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in relation to freshwater habitats and alien fish species in southern Italy. Ethology ecology and evolution, 18, 4: 307-320

Prigioni C., Balestrieri A., Remonti L., Sgrosso S., Priore G. 2006b. How many otters are there in Italy? *Hystrix, the Italian journal of mammalogy*, 17, 1: 29-36

Prigioni C., Remonti L., Balestrieri, Sgrosso S., Priore G., Mucci N., Randi E. 2006c. Estimation of European otter (*Lutra lutra*) population size by fecal DNA typing in southern Italy. *Journal of mammalogy*, 87, 5: 855-858

Protocol for isolation of DNA from stool for human DNA analysis. 2001. V: QIAamp® DNA stool mini kit handbook. For DNA purification from stool samples. Hilden, QIAGEN GmbH: 22-24

Quaglietta L., Martins B.H., de Jongh M., Boitani L. 2012. A low-cost GPS GSM/GPRS telemetry system: performance in stationary field tests and preliminary data on wild otters (*Lutra lutra*). *PLoS One*, 7, 1: e29235.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029235> (25. 7. 2016)

Rice W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 1: 223-225

Roos A., Loy A., de Silva P., Hajkova P., Zemanová B. 2015. *Lutra lutra*, Eurasian otter. The IUCN red list of threatened species 2015: e.T12419A21935287.
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015- 2.RLTS.T12419A21935287.en> (31. 5. 2016)

Ruiz Olmo J., Calvo A., Palazón S., Arqued V. 1998. Is the otter bioindicator? *Galemys*, 10, no. especial: 227-237

Sackl P., Ilzer W., Kolmanitsch E. 1996. Historische und aktuelle Verbreitung des Fischotters (*Lutra lutra*) in der Steiermark. *Forschungsbericht Fischotter*, 3: 4-25

Sites of Community Importance (SCI) designated for the Eurasian otter (*Lutra lutra*) in the EU-27 and its current distribution in EU-25 member states according to the article 17 EU habitats directive reporting in 2008. 2010. European Environment Agency.
<http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/sites-of-community-importance-sci>
(31. 5. 2016)

Smith K. 2002. Genetic polymorphism and SNPs: genotyping, haplotype assembly problem, haplotype map, functional genomics and proteomics. Seminar: Algorithmic Problems in Computational Biology. Tel Aviv university school of computer science.
<http://www.cs.tau.ac.il/~rshamir/seminar/03/> (8. 7. 2016)

Soto Azat C., Boher F., Fabry M., Pascual P., Medina Vogel G. 2008. Surgical implantation of intra-abdominal radiotransmitters in marine otters (*Lontra felina*) in central Chile. *Journal of wildlife diseases*, 44, 4: 979-982

Spooner D., van Treuren R., de Vicente M.C. 2005. Overview of molecular technologies. V: Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical bulletin, 10: 3-23

Šimek M., Kadleciková Z. 2010. Eurasian otter in the Czech Republic. *Journal Zooreport profí* 2: 1-4

Štajner N. 2010. Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo kultivarjev vinske trte (*Vitis vinifera* L.). *Acta agriculturae Slovenica*, 95, 2: 183-192

- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escavage N., Waits L.P., Bouvet J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic acids research*, 24, 16: 3189-3194
- Taberlet P., Luikart G. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological journal of the Linnean society*, 68, 1-2: 41-55
- Thomason B. 2014. The Shetland otter experience. Shetland nature; wildlife, birding and photography holidays.
<http://www.shetlandnature.net/otters/the-shetland-otter-experience/> (22. 8. 2016)
- Trindade A. 1994. Monitoring *Lutra lutra* habitats in Portugal: A conceptual plan. IUCN Otter specialist group bulletin, 10: 41-46
- Urban P. 2010. The Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Slovakia – A preliminary report from a survey. IUCN Otter specialist group bulletin, 27, 3: 148-157
- Uredba o Krajinskem parku Goričko. Ur.l. RS št. 101-4505/2003
- Uredba o posebnih varstvenih območjih (območjih Natura 2000). Ur.l. RS št. 49-2277/2004
- Waits L.P., Luikart G., Taberlet P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular ecology*, 10, 1: 249-256
- Wahlund S. 1928. Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Verbungslehre aus Betrachtet. *Hereditas*, 11, 1: 65-106
- Weber D. 1990. The end of the otter and of otter reintroduction plans in Switzerland. IUCN Otter specialist group bulletin, 5: 45-50
- White S., O'Neill D., O'Meara D.B., Shores C., O'Reilly C., Harrington A.P., Weyman G., Sleeman D.P. 2013. A non-invasive genetic survey of otters (*Lutra lutra*) in an urban environment: A pilot study with citizen scientists. IUCN Otter specialist group bulletin, 30, 2: 103-111

Xu Y. 1996. Tutorial: capillary electrophoresis. The chemical educator, 1, 2: 1-14

ZAHVALA

Najprej bi se zahvalila mentorici prof. dr. Simoni Sušnik Bajec za vse strokovne nasvete in spodbudo pri nastajanju diplomskega dela, za pomoč v laboratoriju, pri statistični obdelavi podatkov, vedno prijeten pogovor, predvsem pa za ves čas in potrpljenje, saj je trajalo zelo dolgo, da sem prispela do cilja.

Recenzentu prof. dr. Juriju Poharju se zahvaljujem za hiter in temeljit pregled naloge, koristne popravke in napotke.

Zahvaljujem se predsedniku komisije prof. dr. Petru Dovču za pregled naloge.

Prav tako se zahvaljujem ge. Marjani Höngsfeld Adamič z inštituta za ohranjanje naravne dediščine Lutra. Zaradi njene ljubezni do vider in njihovega varstva, sem dobila priložnost sodelovati v projektu LIFE – Aqualutra.

Gospe Sabini Knehtl se iskreno zahvaljujem za njeno prijaznost in pomoč pri urejanju vseh administrativnih zadev skozi vsa leta študija.

Za bibliografsko ureditev naloge se zahvaljujem ge. Jerneji Bogataj.

V najbolj napetih mesecih mi je bila na voljo vsako minuto Mojca B. Hvala ti, ker sem lahko komplikirala s teboj, reševala probleme, delila »stickerse« in slike obrokov na vibr ...

Posebna zahvala gre Andreji in Brigitu Horvat za vso toplino, objeme in ker mi vsakič znova povesta, da me imata radi.

Za prijetno družbo, nasmeh, oporo in pomoč v času študija ter nastajanju diplomskega dela se zahvaljujem celi čredi sošolcev in priateljev:

Rebeki D., Barbari P., Andreju G., Andreji L., Moniki K., Ireni J., Anji J., Milanki Ž., Andreji S., Simoni S., Urši P., Eriki K., Poloni K., Urški H., Manci K., Ivi B., Tanji Z, Lauri D.

Mojima mačjima sončkoma Žaku in Mejki hvala za vse buce in predilno tolažbo.

Rajko, hvala ker me preprosto sprejemaš tako kot sem. Hvala za vzpodbudne besede, razumevanje, tvojo nesebičnost, potrpežljivost in ljubezen.

Največja zahvala gre mojim domačim: mami, očetu in bratu Janezu, ki so mi ves čas stali ob strani in potrpežljivo čakali na zaključno dejanje. Rada vas imam!

Hvala vsem, ki ste do tega trenutka postali del mojega življenja. Brez vas ne bi postala in doseгла to, kar sem.

PRILOGE

Priloga A: Seznam vzorcev, ki so bili izbrani za izolacijo DNK

	Datum	Vodotok	Lokacija	Breg	Svežina	Tip	Oznaka
1	10.12.05	Peskovski potok	Kompas	L	?	SM	b02
2	11.12.05	Mačkovski potok	Mačkovci	D	?	SM	b01
3	04.01.06	Peskovski potok	Podrti most	L	<24h	SM	b04
4	04.01.06	Peskovski potok	Izliv P.p. v Krko	L	<24h	SM	b07
5	06.01.06	Ledava	Nuskova	L	<24h	SM	b09
6	06.01.06	Peskovski potok	Višnja	D	?	SM	b11
7	06.01.06	Peskovski potok	Izliv Peskov. potoka v Krko	L	?	SM	b13
8	23.02.06	Mala Krka	Turnerjev ribnik	D	<24h	M	b14
9	24.02.06	Ledava	Kramarovci	L	<24h	SM	b17
10	28.02.06	Adrijanski potok	Sojkini	/	<24h	SM	b23
11	02.03.06	Velika Krka	OŠ Šalovci	D	<24h	SM	b25
12	04.03.06	Velika Krka	Švenderin breg	D	<24h	M	b32
13	04.03.06	Peskovski potok	Izliv P.p. v Krko	L	<24h	SM	b33
14	17.03.06	Kobiljski potok	Most pri cerkvi	L	?	SM	b36
15	17.03.06	Ratkovski potok	1. most za Prosenjakovci	D	?	SM	b39
16	18.03.06	Kobiljski potok	Cesta za Čikečko vas	/	<24h	SM	b46
17	30.03.06	Dolenski potok	1. most pod Hodoškim j.	D	<24h	SM	b51
18	30.03.06	Dolenski potok	3. most pod Hodoškim j.	L	<24h	SM	b55
19	31.03.06	Dolenski potok	Piknik plac	/	<24h	SM	a02
20	31.03.06	Dolenski potok	3. most pod Hodoškim j.	L	<24h	SM	a05
21	31.03.06	Peskovski potok	Jančijeve mlake	/	<24h	SM	a10
22	05.04.06	Dolenski potok	Železniški podhod	L	<24h	M	a15
23	05.04.06	Velika Krka	Krplivnik	D	<24h	SM	a16
24	05.04.06	Peskovski potok	Šalovci 16	D	<24h	SM	a19
25	05.04.06	Peskovski potok	Izliv v Krko	D	<24h	SM	a20
26	06.04.06	Dolenski potok	Vtok Hodoškega jezera	D	<24h	S	a21
27	13.04.06	Velika Krka	Most nad Lenaršič. mlin.	L	<24h	M	a27
28	17.04.06	Mačkovski potok	Kolovoz pred Moščanci	L	<24h	SM	a29
29	18.04.06	Mačkovski potok	AP pred Vanečo	L	<24h	SM	a30
30	18.04.06	Mačkovski potok	AP Vaneča	L	<24h	SM	a31
31	18.04.06	Mačkovski potok	AP Vaneča	L	<24h	SM	a32
32	20.04.06	Mačkovski potok	AP pred Vanečo	L	<24h	SM	a35
33	20.04.06	Mačkovski potok	AP Vaneča	D	<24h	SM	a36
34	21.04.06	Mačkovski potok	1. most v Mačkovcih	D	<24h	SM	a37
35	21.04.06	Mačkovski potok	2. most v Mačkovcih	D	<24h	SM	a38
36	30.11.06	Mačkovski potok	Most pred Vanečo	L	<24h	M	4
37	30.11.06	Kmetov potok	Moščanci	L	<24h	M	6
38	05.12.06	Lukaj	Lukaj nad jezerom	D	<24h	S	13
39	06.12.06	Ledava	Brana	D	<24h	SM	18

se nadaljuje ...

... nadaljevanje

	Datum	Vodotok	Lokacija	Breg	Svežina	Tip	Oznaka
40	06.12.06	Ledava	Brana	L	<24h	SM	19
41	06.12.06	Ledava	Brana	L	<24h	SM	20
42	06.12.06	Ledava	Brana	L	<24h	SM	21
43	07.12.06	Ledava	Brana	L	<24h	SM	25
44	07.12.06	Ledava	Brana	D	<24h	SM	28
45	07.12.06	Ledava	Brana	D	<24h	SM	29
46	07.12.06	Ledava	Brana	D	<24h	SM	30
47	08.12.06	Ledava	Brana	D	<24h	M	33
48	08.12.06	Ledava	Brana	D	<24h	SM	34
49	08.12.06	Ledava	Brana	D	<24h	S	35
50	08.12.06	Ledava	Brana	L	<24h	S	36
51	08.12.06	Ledava	Brana	L	<24h	S	37
52	19.12.06	Mačkovski potok	pred Mačkovci	D	<24h	SM	39
53	20.12.06	Mačkovski potok	Odcep za Pečarovce	D	<24h	M	43
54	20.12.06	Kmetov potok	Moščanci	D	<24h	M	45
55	22.01.07	Ledava	Kramarovci	D	<24h	SM	56
56	22.01.07	Ledava	Kramarovci	D	<24h	SM	57
57	23.01.07	Ledava	Brana	D	<24h	SM	61
58	23.01.07	Ledava	Brana	D	<24h	S	62
59	23.01.07	Bodonski potok	Nogomet. igrišče Bodonci	L	<24h	SM	65
60	24.01.07	Ledava	Brana	L	<24h	S	69
61	24.01.07	Ledava	Domajinci	D	<24h	S	70
62	24.01.07	Ledava	Domajinci	D	<24h	S	71
63	25.01.07	Ledava	Kramarovci	D	<24h	M	73
64	25.01.07	Ledava	Večeslavci	L	<24h	SM	75
65	25.01.07	Ledava	Večeslavci	D	<24h	SM	76
66	25.01.07	Ledava	Brana	L	<24h	SM	78
67	25.01.07	Ledava	Brana	D	<24h	S	79
68	25.01.07	Ledava	Brana	D	<24h	SM	80
69	25.01.07	Ledava	Brana	D	<24h	S	81
70	25.01.07	Ledava	Brana	D	<24h	SM	82
71	25.01.07	Ledava	Kopališče Murska Sobota	D	<24h	S	84
72	25.01.07	Bodonski potok	Puževci	D	<24h	S	85
73	26.01.07	Ledava	Akumulacija Domajinci	D	<24h	S	89
74	26.01.07	Ledava	Kopališče Murska Sobota	L	<24h	SM	90
75	26.01.07	Ledava	Kopališče Murska Sobota	L	<24h	SM	91
76	10.08.07	Kobiljski potok	Kobiljske gramoznice	/	<24h	M	7/01
77	13.08.07	Dolenski potok	Hodoško jezero, čistilna n.	/	<24h	S	7/02
78	13.08.07	Dolenski potok	2. most pod jezerom	D	<24h	S	7/03
79	13.08.07	Dolenski potok	Železniški podhod	L	<24h	M	7/04
80	13.08.07	Velika Krka	Krplivnik	D	<24h	S	7/05
81	17.08.07	Ledava	Žaga Sotina	D	<24h	SM	7/06
82	14.09.07	Mačkovski potok	Zadnji most v parku	/	<24h	SM	7/07

se nadaljuje ...

... nadaljevanje

	Datum	Vodotok	Lokacija	Breg	Svežina	Tip	Oznaka
83	14.09.07	Mačkovski potok	Zadnji most v parku	/	<24h	SM	7/08
84	24.09.07	Peskovski potok	Kompas	L	<24h	S	7/09
85	26.09.07	Peskovski potok	Izliv v Krko	L	<24h	SM	7/10
86	28.09.07	Velika Krka	Lenaršičev mlin	L	<24h	SM	7/11
87	02.10.07	Dolenski potok	Železniški podhod	D	<24h	M	7/13
88	02.10.07	Ledava	Loka nad jezerom	/	<24h	SM	7/14
89	02.10.07	Ledava	Brana	/	<24h	SM	7/15
90	12.10.07	Ratkovski potok	Časarjev mlin	L	<24h	SM	7/16
91	16.10.07	Adrijanski potok	Skrlemkini	L	<24h	M	7/17
92	26.10.07	Peskovski potok	Šalovci 16	D	<24h	SM	7/18
93	26.10.07	Peskovski potok	Kompas	L	<24h	M	7/19
94	26.11.07	Adrijanski potok	Skrlemkini	L	<24h	SM	z01
95	26.11.07	Adrijanski potok	Gasilska mlaka Sojkini	/	<24h	SM	z02
96	27.11.07	Ledava	Brana	L	<24h	S	z03
97	28.11.07	Velika Krka	Odcep za Budince	L	<24h	SM	z04
98	30.11.07	Ledava	Kramarovci	L	<24h	S	z05
99	30.11.07	Bodonski potok	Puževci	D	<24h	S	z06
100	30.11.07	Bodonski potok	Nogomet. igrišče Bodonci	L	<24h	M	z07
101	01.12.07	Kobiljski potok	Odcep za Moravske Topl.	L	<24h	SM	z08
102	01.12.07	Kobiljski potok	Odcep za Moravske Topl.	L	<24h	SM	z09
103	01.12.07	Kobiljski potok	Odcep za Moravske Topl.	L	<24h	SM	z10
104	01.12.07	Ratkovski potok	Prosenjakovci center	L	<24h	M	z11
105	01.12.07	Ratkovski potok	Prosenjakovci center	L	<24h	M	z12
106	01.12.07	Ratkovski potok	Časarjev mlin	L	<24h	M	z13
107	10.12.07	Velika Krka	Lenaršičev mlin	L	<24h	M	x01
108	10.12.07	Dolenski potok	1. most Hodoš	L	<24h	SM	x02
109	18.12.07	Ledava	Serdica	L	<24h	SM	x03
110	18.12.07	Ledava	Nuskova	L	<24h	SM	x04
111	18.12.07	Ledava	Nuskova	D	<24h	SM	x05
112	18.12.07	Ledava	Sv. Jurij	D	<24h	SM	x06
113	18.12.07	Ledava	Pertoča	D	<24h	SM	x07
114	14.01.08	Kobiljski potok	Cerkev Kobilje	L	<24h	M	x08
115	14.01.08	Kobiljski potok	Kobilje 134	L	<24h	M	x09
116	14.01.08	Kobiljski potok	Motvarjevci 97	L	<24h	M	x10
117	14.01.08	Kobiljski potok	Čikečka vas	L	<24h	M	x11
118	14.01.08	Ratkovski potok	Odcep za Čikečko vas	D	<24h	M	x12
119	15.01.08	Andrejski potok	Sebeborci	L	<24h	M	x13
120	15.01.08	Kobiljski potok	Malo Kobilje	D	<24h	M	x14
121	15.01.08	Kobiljski potok	Cerkev Kobilje	L	<24h	M	x15
122	15.01.08	Ratkovski potok	Odcep za Čikečko vas	L	<24h	M	x16
123	16.01.08	Bukovniški potok	Dobrovnik	L	<24h	M	x17
124	16.01.08	Kobiljski potok	Gramoznice Kobilje	/	<24h	M	x18
125	16.01.08	Kobiljski potok	Motvarjevci 94	D	<24h	M	x19

se nadaljuje ...

... nadaljevanje

	Datum	Vodotok	Lokacija	Breg	Svežina	Tip	Oznaka
126	16.01.08	Kobiljski potok	Odcep za Moravske Topl.	L	<24h	M	x20
127	16.01.08	Kobiljski potok	Čikečka vas	D	<24h	M	z14
128	16.01.08	Ratkovski potok	Odcep za Čikečko vas	D	<24h	M	z15
129	16.01.08	Ratkovski potok	Prosenjakovci, odcep za H.	D	<24h	M	z16
130	16.01.08	Ratkovski potok	Časarjev mlin	L	<24h	M	z17
131	17.01.08	Kobiljski potok	Gramoznice Kobilje	/	<24h	M	z18
132	17.01.08	Kobiljski potok	Motvarjevci 97	L	<24h	M	z19
133	08.12.08	Peskovski potok	Šalovci most – kamera	/			g01
134	08.12.08	Peskovski potok	Podrti most	/			g02
135	08.12.08	Dolenski potok	Hodoško j. piknik plac	/			g03
136	08.12.08	Dolenski potok	Hodoško j. piknik plac	/			g04
137	08.12.08	Dolenski potok	Hodoško j. piknik plac	/			g05
138	08.12.08	Dolenski potok	Hodoško jezero most	/			g06
139	08.12.08	Dolenski potok	Hodoš - most – kamera	/			g07
140	26.12.08	Peskovski potok	Šalovci most – kamera	/			g08
141	26.12.08	Dolenski potok	Hodoško j. piknik plac	/			g09
142	26.12.08	Dolenski potok	Hodoško jezero most	/			g10
143	26.12.08	Velika Krka	Lenaršičev mlin – kamera	/			g11
144	16.01.09	Peskovski potok	Petrovske njive – kamera	/			g12
145	16.01.09	Peskovski potok	most - Bagijeve mlake 1	/			g13
146	16.01.09	Peskovski potok	most - Bagijeve mlake 2	/			g14
147	16.01.09	Peskovski potok	most - Bagijeve mlake 3	/			g15
148	16.01.09	Peskovski potok	Šalovci most – kamera	/			g16
149	16.01.09	Dolenski potok	Hodoš - most – kamera	/			g17
150	16.01.09	Dolenski potok	Hodoš - most – kamera	/			g18
151	16.01.09	Peskovski potok	Jančijeve mlake 1 do 7	/			g19
152	16.01.09	Peskovski potok	Jančijeve mlake 1 do 7	/			g20
153	16.01.09	Peskovski potok	Jančijeve mlake 1 do 7	/			g21
154	16.01.09	Peskovski potok	Jančijeve mlake 1 do 7	/			g22
155	16.01.09	Peskovski potok	Jančijeve mlake 1 do 7	/			g23
156	16.01.09	Peskovski potok	Jančijeve mlake 1 do 7	/			g24
157	16.01.09	Peskovski potok	Jančijeve mlake 1 do 7	/			g25
158	16.01.09	Peskovski potok	Šalovci most, kamera	/			g26
159	16.01.09	Peskovski potok	Kompas - most dolvodno	/			g27
160	07.04.07	rokav Stare Mure	Razkrižje / Sr. Bistrica			K	k1
161	17.10.07	Ledava	Domajinci (pod jezerom)			K	k2
162	20.10.07	Ledava	Domajinci (pod jezerom)			K	k3
163						P	k4

* Lokacija: AP – avtobusna postaja

** Breg: L – levi, D – desni

*** Tip iztrebka: M – iztrebek, S – sporočilni iztrebek (»spraint«), MS – iztrebek z markacijo, K – kadaver (vzorec mišice), P – preparirana (vzorec preparirane kože)

Priloga B: Genotipi osebkov

Ime / Lokus	717	833	818	715	701	832	782	733	453	604	435	457
Bine				202206	204206	170170	189189	169169	124126	139139	124124	179187
Božek	191195	157161	156158	202206	190204	170188	185189	169173	124126	131133	124128	179187
Cene	149157			202202	204204	188188	187187		122122		122122	181181
Cvetka	191195	155159	154154	200204	186202	178186	189193	167167	124124	131135	122130	179183
Čuftek	191195	155159		200204	186202	178186	189189	159167	124126	131135	122130	179183
Ditka	195195	145155		206206	200200		193193	171177	124126	133135	124128	181181
Jagoda	157161	154156	206206	186186	186186	189189	167175	124126	139139	124128	187187	
Katka	161161					188188	189189	161169	124126		124128	183183
Krasna	195199	155157	154154	204204	182200	186186	189193	167167	124126	129131		
Kunigunda	191195					189193	173175	124126		124128	189189	
Lili	195195	157161	156158	206206	204206	188192	189189	165173	126126	133135	124128	179179
Meta	195195	157161	158174	192208	208208	188188	185189	169177	124126	133133	124132	179187
Oto	153153		214214	204204	188188	189189	169169	122122		122122	183183	
Rene	195195	155159		200200	202202	186186	189189	159167	124124	131135	122130	179183
Rezi	189189	163163	176176	200200	200200		185185	167167	124124	129133	124128	179179
Suzi	191191	145149	176176	192192			185185	165165	126126		124124	179179
Zlato	195195	157161	156158	206206	200204	192192	189189	173177	126126	133135	124128	179179
ime 1	191195	157157		204204	200200	182182	185193	167167	124124	129129	122130	179179
ime 2		155157	154154		188202		185185	167167	122124	131135	130130	179179
ime 3	195195	157157	178178	202206	188200	186188	189189	169173	124126	133135	122132	179179
ime 4	191191	157157	176178	206206	204208	180188	189193	169173	124126	133135	124124	179181
ime 5	191195	157157	154158	206206	204204	184188	185193	169169	124126	131131	124132	179179
ime 6	191195	153157	156156	202206	204204	170188	189193	169173	126126	129133	124124	179181
ime 7	191191	157157	154156	202206	188200	170188	189193	169173	124126	133135	122130	179181
ime 8	189189	157157	154156	202206	188200	188188	189193	169173	124126	133135	122130	179179
ime 9		157157	156156	202206	188200	188188	189193	169173	126126	133133		
ime 10	195195	157157		206216	204204	180188	189189	165169	126126	133133	124124	
k2	183191	143153	174178	206206	192204	184188	189189	161173	124126	131133	122122	179183
k3	191195	153169	174174	206206	192204	184188	189193	161173	124126	133135	122122	179191
ostali vzorci*:												
k1	199203	151163	164164	192196	208208	188188	189193	165169	124126	135135	124124	179191
k4	195195	153153	174178		204204		189189		124126	133133	124124	179189

* k1 – kadaver, najden izven območja Krajinskega parka Goričko (Razkrižje, rokav Mure); k4 – vzorec preparirane vidre (brez znane lokacije)

Priloga C: Izločeni genotipi

Ime / Lokus	717	833	818	715	701	832	782	733	453	604	435	457
Angelca			170176				189189	173175			124124	
Pučko							189189	161161			122124	189191
izločen1	181191			198198						131131		
izločen2	183201											
izločen3		174174	194196	208208			175175	124126				
izločen4		172172								133133		
izločen5			204204				169169			122122		
izločen6										122124		
izločen7								124126				
izločen8							173173					
izločen9					188188							
izločen10						169173						
izločen11					188188	189189	161161	124126		124128		
izločen12										122124		
izločen13					188188	191191	169169			124128		
izločen14					188188	189189	169169					
izločen15	195195					189189		124126		124128		
izločen16	191195									124124		
izločen17					170170		169169	126126	129131		179179	

* obarvane so kombinacije alelov, ki jih pri drugih genotipih na istem lokusu nismo zaznali