

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

2014

ZAKLJUČNA NALOGA

ZAKLJUČNA NALOGA  
MOLEKULARNA ANALIZA SPODNJIH ČELJUSTI  
DIVJEGA PRAŠIČA

RAŠL

DAMIJANA RAŠL

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga  
**Molekularna analiza spodnjih čeljusti divjega prašiča**  
(Molecular analysis of wild boar lower mandibles)

Ime in priimek: Damijana Rašl  
Študijski program: Biodiverziteta  
Mentor: izr. prof. dr. Elena Varljen Bužan  
Somentor: asist. Sara Zupan

Koper, avgust 2014

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Damijana RAŠL

Naslov zaključne naloge:

Molekularna analiza spodnjih čeljusti divjega prašiča

Kraj: Koper

Leto: 2014

Število listov: 49

Število slik: 5

Število tabel: 4

Število prilog: 3

Št. strani prilog: 7

Število referenc: 40

Mentor: izr. prof. dr. Elena Varljen Bužan

Somentor: asist. Sara Zupan

Ključne besede: mikrosateliti, citokrom b, PCR, lovske trofeje, degradirana DNA

Izvleček:

Obdelane lovske trofeje in spodnje čeljusti parklarjev so pomembni viri genetskih informacij, vendar je zaradi močne degradiranosti izolacija DNA močno otežena. V nalogi smo poskušali optimizirati postopek izolacije DNA, čemur je sledila optimizacija postopka verižne reakcije s polimerazo (PCR). Za optimizacijo smo uporabili čeljusti divjega prašiča (*Sus scrofa*), ki so bile odstranjene vseh vidnih organskih tkiv po kuhanju v vreli vodi, ter pobeljene z uporabo do 30 % vodikovega peroksida. Nekateri vzorci so bili temeljito obdelani z vodikovim peroksidom, zato iz njih ni bilo mogoče pridobiti DNA, v ostalih vzorcih pa je bila DNA prisotna, a močno degradirana. Uspešnost izolacije in pomnoževanja smo kontrolirali z določanjem nukleotidnega zaporedja mitohondrijskih genov (citokroma b in kontrolne regije) ter z genotipizacijo mikrosatelitnih markerjev. Genotipizacija vzorcev je bila uspešna tako pri optimalnih kot pri nizkih masnih koncentracijah in slabi čistoči vzorcev DNA. Zaporedje gena za citokrom b je bilo pomnoženo le pri vzorcih iz mišic, saj je bila DNA pri vzorcih kosti in zobovja premočno degradirana, da bi lahko dobili daljša zaporedja. Poskušali smo optimizirati tudi pomnoževanje kontrolne regije (D-loop), s katero bi lahko identificirali, če je v Sloveniji prisotna endemična italijanska filogenetska klada, vendar smo bili pri optimizaciji manj uspešni. Naša raziskava kaže na to, da so lahko lovske trofeje in spodnje čeljusti zelo uporabne pri filogenetskih študijah, kakor tudi pri določanju genetske strukture populacij.

## Key words documentation

Name and SURNAME: Damijana RAŠL

Title of the final project paper:

Molecular analysis of wild boar lower mandibles

Place: Koper

Year: 2014

Number of pages: 49

Number of figures: 5

Number of tables: 4

Number of appendix: 3

Number of appendix pages: 7

Number of references: 40

Mentor: Assoc. Prof. Elena Varljen Bužan, PhD

Co-Mentor: Assist. Sara Zupan

Keywords: microsatellite, cytochrome b, PCR, game species trophy, degraded DNA

Abstract:

Game species trophies and lower jaws of ungulates are important sources of genetic information, but due to degradation, isolation of DNA is significantly more difficult. In our research we tried to optimized process of DNA isolation, followed by optimization of the polymerase chain reaction (PCR). For optimization we used jaws of wild boar (*Sus scrofa*), which have been cleaned of all visible organic tissue after boiling in water, and bleached with up to 30% hydrogen peroxide. Some of the samples were (like bones and teeth) overcleaned and it was not possible to isolate DNA from them. In other isolates DNA was significantly degraded. Performance of isolation and amplification was monitored by determining nucleotide sequence of mitochondrial gene (cytochrome b and control region) and the genotyping of microsatellite markers. Genotyping of samples was successful in both optimum and low mass concentration, and also in poor cleanliness of samples. Cytochrome b gene was amplified only in tissue samples, because the DNA from jaw samples was too degraded for a long sequence amplification. We also tried to optimized the amplification of the control region (D-loop), due to possible identification of the endemic Italian clade, but we were unsuccessful in optimization so far. Our research shows the usefulness of trophies and lower jaws for phylogenetic studies and determination of the genetic structure of population.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Eleni V. Bužan za strokovne usmeritve in pomoč pri nalogi ter možnost opravljanja zaključne naloge v Laboratoriju za molekularno ekologijo Znanstveno – raziskovalnega središča, Univerze na Primorskem.

Somentorici asist. Sari Zupan se zahvaljujem za vso pomoč in nasvete v laboratoriju, brez česar ne bi mogla dokončati te naloge.

Zahvaljujem se tudi Martinu Seniču za vso pomoč pri laboratorijskem delu.

Zahvaljujem se tudi ERICo Velenje d.o.o. ter lovskim društvom za posredovane vzorce.

Zahvaljujem se tudi družini, Primožu Volariču ter sošolcem, ki ste mi bili moralna podpora pri pisanju te zaključne naloge.

## Kazalo vsebine

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Divji prašič (<i>Sus scrofa</i> Linnaeus, 1758) .....</b>	<b>1</b>
1.2.1 Sistematika divjega prašiča .....	1
1.2.2 Geografska razširjenost .....	2
1.2.3 Zgodovina in današnja razširjenost v Sloveniji.....	2
1.2.4 Opis.....	2
1.2.5 Čutila .....	3
1.2.6 Življenjski prostor .....	4
1.2.7 Prehrana.....	4
1.2.8 Razmnoževanje.....	5
<b>1.3 Trofejni lov.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Demografske posledice.....	6
1.3.2 Genetske in evlucijske posledice .....	8
<b>1.4 Genetski problemi divjega prašiča v Evropi .....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Genetska variabilnost divjega prašiča.....	9
1.4.2 Disperzija po poledenitvah .....	10
1.4.3 Hibridizacija .....	10
1.4.4 Translokacija .....	11
<b>1.5 Namen in cilji dela .....</b>	<b>11</b>
<b>1.6 Pomen zbirk čeljusti .....</b>	<b>12</b>
<b>1.7 Mikrosateliti .....</b>	<b>12</b>
<b>1.8 Citokrom b.....</b>	<b>13</b>
<b>1.9 MtDNA kontrolna regija (D-Loop) .....</b>	<b>13</b>
<b>2 METODE DE LA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Vzorci tkiva .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Izolacija DNA .....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Priprava tkiva na izolacijo .....	15
2.2.2 Liza tkiva.....	15
2.2.3 Vezava DNA na kolono .....	15
2.2.4 Čiščenje DNA.....	15
2.2.5 Ekstrakcija DNA iz kolone.....	15
<b>2.3 Merjenje koncentracij DNA in nečistoč.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....</b>	<b>16</b>

<b>2.5 Določanje mikrosatelitnih lokusov: Mikrosateliti</b> .....	16
<b>2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo PCR</b> .....	16
<b>2.5.2 Fragmentna analiza</b> .....	19
<b>2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja: Citokrom b</b> .....	19
<b>2.6.1 Verižna reakcija s polimerazo</b> .....	19
<b>2.6.2 Gelska elektroforeza</b> .....	19
<b>2.6.3 Direktno čiščenje PCR produktov</b> .....	20
<b>2.6.4 Sekvenčna reakcija</b> .....	20
<b>2.6.5 Čiščenje s precipitacijo z ETANOL/EDTA</b> .....	20
<b>2.6.6 Analiza nukleotidnega zaporedja</b> .....	21
<b>2.7 Določanje nukleotidnega zaporedja: D-loop</b> .....	21
<b>2.7.1 Verižna reakcija s polimerazo</b> .....	21
<b>3 REZULTATI Z DISKUSIJO</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Izmerjena masna koncentracija in absorbanca</b> .....	23
<b>3.3 Analiza mikrosatelitov in zaporedja gena citokroma b</b> .....	25
<b>4 ZAKLJUČEK</b> .....	<b>27</b>
<b>5 LITERATURA</b> .....	<b>28</b>

## **Kazalo slik**

Slika 1: Shematski model vpliva selektivnega lova na populacijo, povzet po (Milner in sod. 2007). Polne črte predstavljajo dobro dokumentirane posledice, prekinjene črte pa slabše dokumentirane posledice. ....	7
Slika 2: Prikaz puljenja zob iz spodnje čeljusti .....	14
Slika 3: Na levi stani zob na katerem se nahaja tkivo, na desni strani pa zob, ki je preveč očiščen in zato neprimeren za izolacijo DNA .....	14
Slika 4: Prikaz mikrosatelitnih lokusov .....	24
Slika 5: Agarozni gel citokroma b (prvih 16 vzorcev so tkivni vzorci, drugih enajst so trofejni vzorci) .....	25



## **Kazalo preglednic**

Preglednica 1: Sistematska klasifikacija divjega prašiča ( <i>Sus scrofa</i> ) po IUCN .....	1
Preglednica 2: Volumen komponent PCR reakcije .....	17
Preglednica 3: Temperaturni profili za PCR reakcijo .....	17
Preglednica 4: Izmerjene koncentracije in absorbance vzorcev; *redčitev na 50ng/uL.....	23

## **Kazalo prilog**

<b>Priloga A:</b> Podrobni podatki o izoliranih vzorcih.....	31
<b>Priloga B:</b> Podatki o mikrosatelitnih lokusih.....	33
<b>Priloga C:</b> Rezultati mikrosatelitnih lokusov .....	34

## Seznam kratic

A260: Absorbanca pri valovni dolžini 260nm

A280: Absorbanca pri valovni dolžini 280nm

AFLP: dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov (angl. amplified fragment length polymorphism)

Bp: bazni par

CYT B: citokrom b (angl. Cytochrome b)

ddH<sub>2</sub>O: voda brez RNA in DNA

DNA: deoksiribonukleinska kislina

EDTA: etildiamin tetraacetna kislina

mtDNA: mitohondrijska deoksiribonukleinska kislina

PCR: verižna reakcija s polimerazo

RAPD: naključno pomnoževanje polimorfne DNA (angl. random amplified polymorphic DNA)

RFLP: polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)

RNA: ribonukleinska kislina

SNP: polimorfizem enega nukleotida (angl. single nucleotid polymorphism)

## 1 UVOD

### 1.1 Vloga varstvene genetike

Vloga varstvene genetike pri varstvu organizmov in habitatov postaja vedno pomembnejša. Daje nam ključne podatke za razumevanje biologije vrst, obenem pa lahko s pomočjo varstvene genetike opredelimo nevarnosti, ki ogrožajo populacije in jih poskušamo omejiti. Z metodami varstvene genetike, ki temeljijo na analizi informativnih genetskih markerjev, lahko zaznamo strukturo populacije in negativne vplive, ki so posledica zgodovinskih dogodkov (npr. genetski zdrs, sokrvje, hibridizacija, efekt ozkega grla ter številne druge procese). Dolgoročen cilj varstvene genetike je ohranjanje vrst kot dinamičnih subjektov, zmožnih spopadanja s klimatskimi spremembami (Frankham in sod. 2010).

Največji problemi varstvene genetike, ki so jih definirali Frankham in sod. (2010), so:

- Škodljivi vplivi sokrvja (angl. inbreeding) na reprodukcijo in preživetje.
- Izguba genetske diverzitete in posledično izguba potenciala za adaptacijo na okoljske spremembe (izguba evolucijskega potenciala).
- Fragmentacija populacij in izguba genskega pretoka.
- Kako naključni procesi, kot na primer genetski zdrs (angl. genetic drift), prevladajo nad naravno selekcijo.
- Akumulacija in izguba škodljivih mutacij (letalne mutacije).
- Genetska adaptacija v ujetništvu in njene škodljive posledice pri procesu reintrodukcije.
- Reševanje taksonomskih neznank.
- Opredeljevanje upravljaljskih enot znotraj vrst.
- Škodljive posledice na preživetveni potencial organizmov (angl. fitness), ki se včasih pojavi kot posledica razkrižanja (angl. outbreeding depression).
- Uporaba molekularnih genetskih analiz v forenziki in razumevanje biologije vrste.

### 1.2 Divji prašič (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758)

#### 1.2.1 Sistematika divjega prašiča

Sistematska klasifikacija po IUCN je prikazana v preglednici 1.

Preglednica 1: Sistematska klasifikacija divjega prašiča (*Sus scrofa*) po IUCN

Kraljestvo	Animalia (Živali)
Deblo:	Chordata (Strunarji)
Razred	Mammalia (Sesalci)
Red:	Cetartiodactyla (Sodoprsti kopitarji)
Družina:	Suidae (Svinje)
Rod:	<i>Sus</i> (Svinja)
Vrsta:	<i>S. scrofa</i> (Divji prašič)

Divji prašič je po IUCN določen v kategorijo najmanj ogrožena vrsta (angl. least concern). V to kategorijo je določen zaradi široke razširjenosti, številčnosti, tolerance na motnje v okolju in zaradi pojavljanja v mnogih zavarovanih območjih.

### **1.2.2 Geografska razširjenost**

Divji prašič je ena od najbolj geografsko razširjenih vrst kopenskih sesalcev. Avtohtono razširjenost ima v Evropi, Aziji in severni Afriki, njegov areal razširjenosti pa se je močno povečal s človeško aktivnostjo (Oliwer in sod. 2014), kot lovno vrsto so ga namreč naselili na vse ostale kontinente, razen Antarktike (Scandura in sod. 2011). Številčnost in območje razširjenosti divjega prašiča sta se v Sloveniji in drugih evropskih državah v zadnjih desetletjih občutno povečala; posledično so narasle tudi škode, ki jih povzroča v kmetijstvu (Jerina 2006). Vrsta je v preteklosti izginila iz Britanskega otočja, Skandinavije, dela severne Afrike, iz velikega dela bivše Sovjetske zveze in Japonske. Kljub temu ostaja razmeroma široko razširjena (Oliwer in sod. 2014). Vrsta je bila leta 1980 reintroducirana v Združenem kraljestvu in leta 1970 na Švedskem (Albarella 2010). Zaradi škode, ki jih povzroča na kmetijskih pridelkih, je v mnogih državah označena kot konfliktna vrsta, na katero je dovoljen lov (Oliwer in sod. 2014).

### **1.2.3 Zgodovina in današnja razširjenost v Sloveniji**

Za razširjenost divjega prašiča v Sloveniji je ključnega pomena dekret Marije Terezije iz leta 1770, v kateri je odredila, da je potrebno vse prostoživeče divje prašiče pokončati (Kryštufek 1991). Po tem dekretu se je številčnost populacij divjega prašiča zmanjšala, vrsta je postajala vse redkejša in v drugi polovici 18. in v prvi polovici 19. stoletja jih na Kranjskem skorajda ni bilo več. Pojavljali so se le posamezni tropi, ki so prišli iz sosednje Hrvaške, kjer jim divjega prašiča ni uspelo zatreti. Leta 1913 je Herman Goriany na svojem posestvu na Gorjancih postavil majhno oboro, v katero je spustil samico s štirimi mladiči. Samica je hitro pobegnila iz ograde in naslednje leto polegla devet mladičev, nekje v istem času pa so pobegnile tudi preostale živali iz ograde. Zatem so vse pogosteje videvali divje prašiče v Beli Krajini, v okolici Novega mesta in v Mali gori (Krže 1982; Kryštufek 1991). V naslednjih dvajsetih letih so se divji prašiči razširili na Snežnik, Kočevsko, Zasavje, okolico Celja, Haloze in na Boč. Danes poseljuje divji prašič praktično celotno ozemlje Slovenije (Kryštufek 1991). Jerina (2006) navaja, da divji prašič trenutno poseljuje okoli 55% Slovenije, njegov potencialni habitat pa zavzema 67% Slovenije. Odmiki med sedanjim in potencialnim stanjem so največji na Primorskem, zato se tam pričakuje, da se bo razširjenost divjega prašiča najbolj povečala in sicer v Istri in v južnem delu obmejnega pasu z Italijo (Jerina 2006).

### **1.2.4 Opis**

Divji prašič je ena najuspešnejših sinantropnih vrst prostoživečih živali v Evropi. Pojem sinantropne vrste označuje živalske vrste, ki so povezane s človekovim bivališčem in dejavnostjo, vendar niso udomačene. Uspešno se je prilagodil v kulturni krajini in spada med vrsto divjadi, ki najuspešneje kljubuje antropogenim pritiskom. Takšno uspešnost vrsti omogočajo naslednje značilnosti: socialno življenje, visok reprodukcijski potencial, velika gibljivost, generalistična prehranska strategija in inteligenca (Jerina 2006). Za divjega prašiča je značilna poraslost s ščetinami, ki so po zatilju in ledjih daljše. V

primerjavi z domačim prašičem je divji ožji, vitkejši, višji, ima klinasto glavo ter pokončna ušesa in dolge, vitke noge. Trup ima ozek in stisnjen, doseže tudi do 110 cm plečne višine. Na nogah ima štiri prste z dobro razvitimi parklji. Prednja prsta ima dobro razvita, medtem, ko sta zadnja dva prsta zakrnela. Glavo ima trikotne oblike, z dolgim rilcem. Njegov rilec je izredno mišičast, spodnjo čeljust ima zelo gibljivo ter ojačano, kar mu daje prednost pri ritju po zemlji (Krže 1982). Zobni niz je bolj ali manj popoln (v zgornji čeljusti imajo praviloma vse 4 predmeljake), vsi zobje izrastejo v tretjem letu starosti (Kryštufek 1991). Skupno ima od 42 do 44 stalnih zob, mlečnih pa 28. V polovici spodnje čeljusti ima 11 zob in sicer 3 sekalce, 1 podočnik, praviloma 4, redkeje 3 predmeljake in 3 meljake. V zgornji čeljusti ima 10 zob, 3 sekalce, 1 podočnik, 3 predmeljake in 3 meljake (Krže 1982). Velike podočnike, ki se izvihajo nazven, imenujemo tudi čekani, kateri so pri samcih močnejši kot pri samicah (Kryštufek 1991). Čekani jim rastejo neprestano in imajo široko, odprto korenino. Jeseni divjemu prašiču zraste tudi gosta podlaka, ki je poleg podkožnega sala odličen izolator. Rep ni zavrit, temveč je ravno viseč.

Barvo dlake divjega prašiča je težko opisati, ker so posamezne ščetine različnih barv: rumenkaste, rjavkaste, sive in črne. Ščetine ima na koncih svetlejšje in razcepljene. Mladiči so ob rojstvu po hrbtu in bokih rjavorumeni s svetlorjavimi podolžnimi progami, glavo in noge imajo svetlorjave barve, trebuh pa skoraj bel. Mladiči postanejo jeseni enobarvni, vendar z rjavkastim podtonom na bokih. Noge divjih prašičev so skoraj črne barve, prav tako pa je glava temnejša od trupa, najtemnejša pa so ušesa (Krže 1982). Življenjska doba divjega prašiča je od 8 do 10 let. Njegov najpomembnejši naravni sovražnik je volk, ki je še posebej nevaren v visokem snegu (Kryštufek 1991).

### 1.2.5 Čutila

Od čutil ima divji prašič najboljše razvit voh, saj ima v rilcu v nosni sluznici izjemno veliko površino vohalnih čutnic (Leskovic in Pičulin 2012). Dober voh koristi predvsem pri iskanju hrane z ritjem po zemlji in listju. Na ta način divji prašič zazna v zemlji ležečo hrano, kot so razni želodi, žiri, kostanji, korenike in razne žuželke. Divji prašič lahko ovohava tudi sledove na tleh, podobno kot psi goniči (Krže 1982). Ušesa ima razmeroma velika, z močnim gibalnim mišičevjem tako, da jih lahko obrača na vse strani, dviguje ali spušča ter s tem zaznava vse zvoke v okolici. Ima dobro razvit sluh, značilno pa je, da spremlja šume in jih tudi ovrednoti, kar vpliva na njegovo obnašanje. Praviloma so divji prašiči zelo oprezne živali in se odzivajo za različnimi šumi (Krže 1982). Prašičem pripisujejo tudi sposobnost razlikovanja med vsakodnevnim in neobičajnim hrupom v bivalnem okolju (Leskovic in Pičulin 2012).

Po starih virih sodeč naj bi imel divji prašič slab vid ter slabše razvito vidno polje, kakor ostala parkljasta divjad. Vendar z novejšimi raziskavami (Krže 2005) ugotavljajo, da morda temu ni tako. Dvom o slabem vidu divjega prašiča se poraja že pri opazovanju prašiča, kako dobro se izogiba različnim oviram pri begu. Večina raziskav na temo vida, je potekala na udomačenih prašičih. Oči udomačenega prašiča in divjega prašiča so anatomsko enake, vendar ima divji prašič gostejšo mrežo živčnih celic, kar jim zagotavlja tudi boljši vid. Včasih so sklepali, da so prašiči kratkovidni, kar pa je danes malo verjetno, saj imajo sposobnost zelo hitrega bega in umikanja pred nevarnostjo. Divji prašiči so bili prvotno dnevna divjad, kar se kaže tudi v sestavi oči. To se kaže tudi v večjem deležu dnevnih, za svetlobo občutljivih čutnih celic kot nočnih. Divji prašiči razlikujejo barve bikromatično oziroma dvoobarvno podobno, kot psi in mačke (Krže 2005).

### 1.2.6 Življenjski prostor

V Sloveniji divji prašič poseljuje listnate in mešane gozdove, prav tako pa mu ustrezajo tudi obsežnejša močvirja. Najdemo ga lahko vse do gozdne meje (Kryštufek 1991). Jerina (2006) je raziskoval, kako okoljski dejavniki vplivajo na prostorsko razporeditev divjega prašiča in ugotovil, da na kakovost habitata vplivajo naslednji dejavniki:

- Delež neporaslih površin, travnikov in zamočvirjenih zemljišč (z večanjem teh površin se zmanjšuje življenjski prostor prašiča).
- Delež mešane kmetijsko-gozdne rabe tal in površin v zaraščanju (z večanjem teh površin se življenjski prostor povečuje).
- Delež površinske zastopanosti gozda in njegove fragmentacije (največja kakovost habitata je med 75-80 % zastopanosti gozda).
- Delež površine odraslih gozdov (z večanjem teh površin se povečuje življenjski prostor).
- Delež listavcev (z večanjem teh površin se raba življenjski prostor povečuje).
- Količina padavin in povprečne temperature (velikost življenjskega prostora narašča s temperaturo in upada s količino padavin).

Gozd je osnovni habitat divjega prašiča, saj mu daje kritje pred nemirom, plenilci in ekstremnimi abiotičnimi dejavniki. V gozdu samice polegajo mladiče. Le v gozdu se lahko prašiči tudi podnevi umikajo pred motnjami. Zaradi tega se z naraščanjem gozdnosti in s povečevanjem velikosti zaplat gozda, populacijska gostota divjega prašiča povečuje. V gozdu je pomemben delež listavcev, saj se s povečevanjem njihovega deleža povečuje delež biomase semen (žir, želod, kostanj) plodonosnih drevesnih vrst. V Sloveniji divjemu prašiču najbolj ustrezajo toplejša območja z milimi zimami in malo snega, njegovo razširjenost omejujejo le nizke temperature ne pa tudi visoke temperature (Jerina 2006).

### 1.2.7 Prehrana

Divji prašič je vsejeda žival, večino njegove prehrane sestavljajo podzemni deli rastlin, kot so korenine, gomolji, čebulice ipd. (Krže 1982; Kryštufek 1991). Najbolj priljubljena hrana divjega prašiča so plodovi kostanja, hrasta in bukve (kostanj, želod in žir), čemur dajejo prednost v vsakem letnem času. V izsušenih rečnih kanalih jedo tudi gomolje močvirskih rastlin, najbolj priljubljene so vrste rogoza (rod *Typha*). Poleg rastlinske hrane pa potrebujejo tudi ustrezen delež živalske hrane. Živalsko hrano divjih prašičev sestavljajo sesalci vse od miši pa do srnjih mladičev, prehranjuje pa se tudi z mrhovino. Mnogokrat se prehranjuje tudi z različnimi nevretenčarji, ki jih odkrije v zemlji med kopanjem. Med drugim sestavljajo živalski del prehrane divjih prašičev mladi, še nebogljeni ptiči in jajca v talnih gnezdih ptic, razni plazilci, polži ter deževniki (Krže 1982, Leskovic in Pičulin 2012). S svojim prehranjevanjem divji prašič vpliva na gozdni habitat. Vplivi divjega prašiča so tako koristni kot negativni.

Povzeto po Pokorny in Jelenko (2013) so glavni vplivi divjega prašiča:

#### Koristni vplivi

- Z ritjem pospešujejo razgradnjo organskega materiala.
- Ustvarjajo pestrejši habitatne razmere in dolgoročno večajo biotsko pestrost.
- Širjenje semen in gliv z zoohorijo.
- Zmanjšanje števila škodljivih nevretenčarjev.

- Odstranjevanje mrhovine.
- Zagotavljanje prehranskih virov za veliko število živali.

#### Negativni vplivi

- Z ritjem zmanjšujejo količino krme in pašnega potenciala za živino.
- Oteženo pomlajevanje gozdov.
- Širjenje tujerodnih vrst in patogenih organizmov.
- Prenos bolezni.
- Hibridizacija z domačim prašičem.

Divje prašiče privlačijo različne kmetijske površine kot so njive, pašniki in travniki, predvsem zaradi energijsko in beljakovinsko bogate hrane. Zaradi tega lahko pričakujemo veliko škode na posameznih kmetijskih kulturah. Divji prašič se zelo rad prehranjuje na krompiriščih ter tudi z žiti in koruzo. Na žitnih poljih divji prašič povzroča škodo s teptanjem s čimer se oteži žetev in zmanjša pridelek (Krže 1982). Zaradi oportunističnega prehranjevanja in s tem povezane škode v kmetijstvu, sodi divji prašič med t.i. problematične vrste divjadi, ki lahko človeškim aktivnostim povzročajo občutne probleme (Jerina 2006).

### 1.2.8 Razmnoževanje

Začetek parjenja oziroma bukanja je odvisen predvsem od prehranskih razmer. Parjenje večinoma poteka v mesecu novembru, decembru in januarju. Najprej se začnejo pariti starejše samice, njihovo parjenje poteka konec novembra in začetek decembra. Zatem se pariyo dvoletne samice in nato še enoletne samice. Paritveno obdobje posamezne svinje traja od 21 do 23 dni. Če samica v tem obdobju ni oplojena, se parjenje ponovi čez tri tedne (Krže 1982). Samice so spolno zrele v 8-10. mesecu medtem, ko samci spolno dozoriyo nekoliko kasneje, pri 9-18 mesecih. Odrasli samci so večino časa samotarji, tropu se približajo le v času parjenja (Kryštufek 1991). Poleganje mladičev poteka od februarja do maja z izrazitimi viški v marcu in aprilu. V jugozahodni Sloveniji pa svinje polegajo čez vso leto (Pokorny in sod. 2011). Število pujskov je odvisno od letnih ekoloških razmer, največji prirastki so po obilnih letinah bukve in hrasta. Divja svinja lahko skoti vse do deset mladičev, so pa znani tudi primeri, ko je divja svinja nosila 17 zarodkov. Izgube med mladiči so v prvih tednih življenja lahko občutne, predvsem zaradi neugodnih vremenskih razmer (deževje, nizke temperature), nekaj pa tudi zaradi napadov zveri (Krže 1982). Mladiči ob rojstvu že vidijo in so odlakani. Mati mladiče doji poldrugi do poltretji mesec (Kryštufek 1991). Povezanost svinje in mladičev traja okrog leta in pol, v tem času pa svinja vnovič poleže (Krže 1982).

### 1.3 Trofejni lov

Lovne trofeje so lahko zelo pomemben vir genetskih informacij za ugotavljanje populacijske strukture ter spola uplenjenih živali. Mnogokrat se trofeje uporabljajo za kontrolne namene ugotavljanja spola po smrti (angl. post mortem). Dober primer te prakse je ugotavljanje spola uplenjenega gamsa z izolacijo tkiva iz rogljev, kjer so raziskovalci želeli ugotoviti ali je bila uplenjena žival res samec kot je zapisal lovec ali pa je bila uplenjena samica kot je sumila lovska družina. Z analizo genskega lokusa SRY, ki je vezan na kromosom y in je pozitiven samo pri samcih, so ugotovili, da je šlo za uplenjeno



samico. Uspešnost te raziskave kaže na široko uporabo lovnih trofej v genetskih analizah (Poličnik in sod. 2011).

Zbiranje trofej živali je znano že iz prazgodovine, ko so ljudje menili, da imajo določeni deli živali posebne moči in da lahko odvrčajo zlo in nesrečo iz domov. Danes se izraz lovska trofeja uporablja le v povezavi z lovцем, ki je trofejo pridobil. V 19. stoletju se je uveljavilo ocenjevanje lovskih trofej, v tistem času so trofeje ocenjevali le na videz, najboljše uplenitelje so tudi nagradili. Konec 19. stoletja so začeli uporabljati obrazce za enotno vrednotenje lovskih trofej, saj je pred tem prihajalo do sporov med uplenitelji, zaradi pristranskega ocenjevanja. Lovske trofeje, ki se ocenjujejo so:

- Rogovja, tj. kostne tvorbe (jelen, srnjak, damjak, kozorog).
- Roglji in polži, tj. kožne tvorbe (gams, kozorog, muflon).
- Zobje - Čekani (divji prašič).
- Lobanje zveri (medved, volk, šakal, lisica, rakunasti pes, jazbec, ris, divja mačka).
- Kožuhi (medved, volk, šakal, ris, divja mačka) (Leskovic in Pičulin 2012).

Zaradi ocenjevanja trofej se lahko pojavijo tudi številne negativne posledice. Pri lovcih se lahko pojavi močna želja po pridobitvi čim močnejših lovskih trofej, kar lahko izniči pravi pomen sodobnega lova. Pomen sodobnega lova je predvsem vzdrževati divjad posameznih vrst v ravnovesju med seboj in v okolju, ohraniti vrstno in gensko pestrost divjadi, ohraniti divjadi naravni način življenja v času in prostoru ter ohraniti divjad kolikor je mogoče neodvisno od neposredne človekove pomoči. Kljub temu se v določenih primerih zgodi razmah trofeizma - zaradi želje po najboljših trofejah se ponekod poslužujejo tudi naslednjih ukrepov:

- Reja divjih živali v oborah, s pomočjo posebnih hranilnih mešanic krme ter hormonskih pripravkov.
- Križanje v umetnih razmerah (genski inženiring).
- Prirejanje trofej (dodajanje skritih uteži, umetni popravki naravne barve, loščenje konic rogov in parožkov rogovja, raztegovanje kožuhov itd.).
- Prikrivanje dejanskega izvora živali, zaradi gojenja v oborah.
- Genetsko onesnaževanje posameznih značilnih podvrst in ekotipov divjadi zaradi umetnega križanja oz. vnosa genov iz drugih ekotipov; vse zaradi želje po čim močnejših trofejnih delih in zaslužka pri odprodaji odstrela (Leskovic in Pičulin 2012).

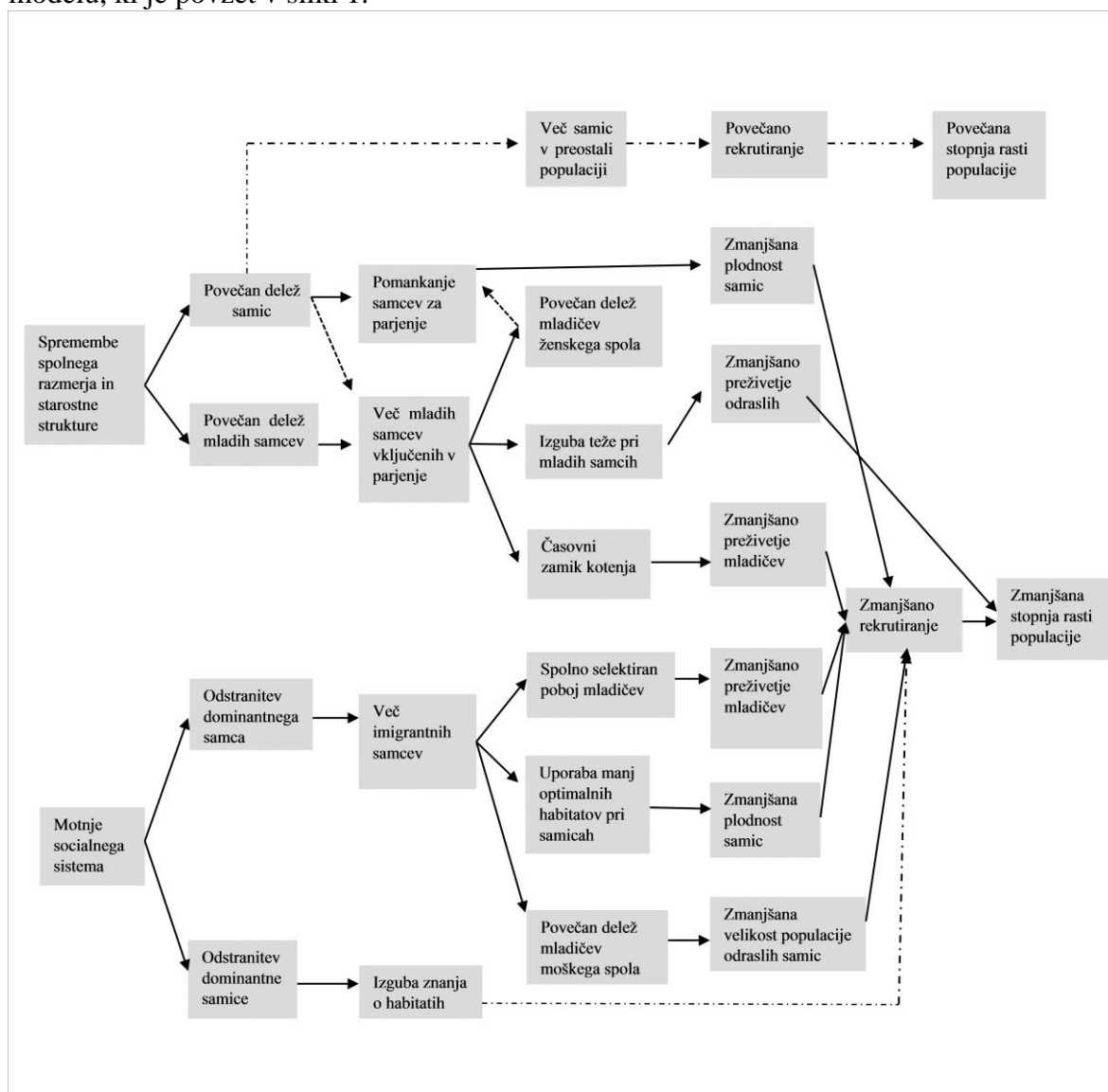
Smrtnost kot posledica lova se z mnogih vidikov močno razlikuje od naravne smrtnosti. Lovci mnogokrat streljajo osebkke, ki so na vrhuncu svojega življenja. Ti osebki pa imajo v naravnih okoliščinah visoko stopnjo preživetja (Festa-Bianchet 2003). Zaradi takšnega selektivnega lova, se lahko pojavijo številne posledice v populaciji (Festa-Bianchet 2003), ki so lahko demografske, genetske in evolucijske (Coltman 2008).

### 1.3.1 Demografske posledice

Lovci pogosto kažejo zanimanje za lov določenih velikostnih razredov, z določeno trofejno vrednostjo. Takšen način lova pa ima lahko neugodne posledice na demografsko strukturo populacije (Milner in sod. 2007). Dva največja učinka selektivnega lova na populaciji sta spremenjena starostna struktura, ki je pomaknjena proti mlajšim osebkom in sprememba

spolne strukture, ki pa je pomaknjena proti večjemu številu samic (Ginsberg in Milner-Guilland 1994). Posledice selektivnega lova določenega spola so lahko spremembe spolnega razmerja, posledično v populaciji prevladujejo samice. V populaciji pride do pomankanja samcev pri parjenju, kar pa vodi v zmanjšano plodnost samic. Pri selektivnem lovu določene starostne skupine, se poveča delež mladih samcev, saj streljajo večje trofejne osebkke. To pa vpliva na časovni zamik kotenja, kar pa se odraža na preživetju potomcev, spremembi spolnega razmerja pri potomcih, ter v prevladovanju samic v populaciji (Milner in sod. 2007).

Posledice lova na velike trofejne samce so destabilizirana socialna struktura in dominantna hierarhija, ki lahko povzroči izgubo socialnega znanja, intenzivnejši odstrel določenega spola mladičev, spremembo habitata med reproduktivnimi samicami in spremembo spolnega razmerja mladičev. Vse to pa vpliva na zmanjšano velikost populacije (Milner in sod. 2007). Milner in sod. (2007) so prikazali posledice selektivnega lova v shematskem modelu, ki je povzet v sliki 1.



Slika 1: Shematski model vpliva selektivnega lova na populacijo, povzet po (Milner in sod. 2007). Polne črte predstavljajo dobro dokumentirane posledice, prekinjene črte pa slabše dokumentirane posledice.

### 1.3.2 Genetske in evolucijske posledice

Selektivni lov ima lahko posledice tudi na genetsko variabilnost populacije, ne le na demografske značilnosti populacije. Štiri glavne posledice selektivnega lova na genetsko variabilnost povzete po (Harris in sod. 2002; Allendorf in sod. 2008) so:

- Vpliv na stopnjo genskega pretoka med sosednjimi demi (populacijami).
- Vpliv na stopnjo genetske variabilnosti (vpliv genetskega zdrsa).
- Zmanjšan preživetveni potencial osebkov zaradi namernega izločanja posameznikom z lastnostmi, ki jih lovci in upravljalci štejejo za nezaželene.
- Zmanjšan preživetveni potencial osebkov zaradi lova na osebkke z lastnostmi, ki so zaželene pri lovcih (trofejni lov).

Vse vrste imajo ločene lokalne reproduktivne skupine (subpopulacije), ki so nekoliko reproduktivno izolirane od drugih takšnih populacij. Lov lahko vpliva na takšne lokalne populacije in zmanjša njihovo produktivnost. Ključen problem je lov na skupino posameznikov, ki so mešanica več subpopulacij, kar lahko vpliva na izumrtje ene ali več takih subpopulacij (Allendorf in sod. 2008). Lov lahko poveča stopnjo genetskega pretoka v določenih podpopulacijah in povzroči genetsko preobremenjenost in izgubo lokalnih prilagoditev (Harris in sod. 2002; Allendorf in sod. 2008). Prekomeren lov lahko zmanjša gostoto lokalnih populacij, kar povzroči več imigracij iz sosednjih podpopulacij, ki so manj prizadete zaradi lova. To lahko privede do genetske preobremenjenosti preostalih osebkov v subpopulaciji in s tem zmanjša preživetveni potencial osebkov (Allendorf in sod. 2008).

Genetski zdrs je naključna sprememba v frekvenci alelov, pojavlja se v vseh populacijah, vendar je njegov učinek viden le v populacijah, ki imajo majhno efektivno velikost (Harris in sod. 2002). Pri zmanjšani velikosti populacije lahko pride do zmanjšane števila migrantov, ki pa povzročajo izgubo genetske pestrosti v subpopulacijah. Genetska variabilnost je merjena s heterozigotnostjo in alelno frekvenco. Izguba heterozigotnosti v vsaki generaciji je rezultat genetskega zdrsa in je merjena z efektivno velikostjo populacije. Pri lovu se pogosto cilja na specifičen spol, določen starostni razred osebkov, kar lahko zmanjša velikost efektivne populacije in poveča stopnjo izgube genetske pestrosti. Ta efekt je pogosto povečan še z izgubo habitatov, kar še dodatno zmanjša velikost populacije in poveča njeno izolacijo (Allendorf in sod. 2008). Harris in sod. (2002) menijo, da je izguba genetske variabilnosti, tudi če je vgnuzdana znotraj večje populacije, še en razlog za izognitev načinu lova, kjer se spreminja spolna struktura populacije.

Lovci mnogokrat z lovom iz populacije izločajo za njih nezaželene lastnosti. Tako poskušajo vplivati na karakteristike rogovja in rogov pri sodoprstih kopitarjih. Zaradi takšnega načina lova, se lahko izgubijo redki aleli, ki so lahko pomembni v evoluciji na dolgi rok (Harris in sod. 2002; Festa-Bianchet 2003.). Drug način lova pa je, ko lovci streljajo reprezentativne osebkke t.i. trofejni lov. Pri posameznikih, z določenimi fenotipi, je večja verjetnost, da bodo odstranjeni iz populacije z lovom. Pod pritiskom lovcev so predvsem kopitarji, pri katerih imajo samci opazno rogovje in rogove. Takšen lov bo prinesel genetske spremembe v populaciji, če se ta fenotip deduje. Te spremembe bodo vplivale na frekvenco fenotipa in na produktivnost (Allendorf in sod. 2008). Festa-Bianchet (2003) ugotavlja, da ima trofejni lov dve glavni posledici na populacije, to sta

sprememba v reproduktivni strategiji zaradi večje smrtnosti odraslih osebkov in sprememba morfologija rogovja in rogov.

Dober primer trofejnega lova je debeloroga ovca (*Ovis canadensis*), kjer se je telesna masa in velikost rogov močno zmanjšala skozi čas. Coltman in sod. (2003) so ugotavljali vpliv trofejnega lova na težo ovnov in velikost rogov. Obe lastnosti sta močno dedovani. Ugotovili so negativno povezavo med starostjo, ko je bil oven ustreljen in njegovo plemensko vrednostjo (angl. breeding value) za dolžino rogov, ne pa za njihovo težo. Trofejni samci z veliko plemensko vrednostjo so imeli tako manj možnosti, da doživijo starost pri kateri dosežejo visoko stopnjo očetovstva. Kot posledica tega je bila negativna povezava med plemensko vrednostjo za dolžino rogov in uspešnostjo parjenja skozi življenje. Trofejni lov je imel tako na to populacijo negativen vpliv, saj je imel evlucijske posledice na dolžino rogov in telesno maso.

Vse te spremembe v genetski varibilnosti in strukturi subpopulacij lahko ugotavljamo tudi empirično z molekularnimi ekološkimi metodami. Molekularni markerji, ki jih lahko uporabimo so alocimi, mikrosateliti, minisateliti, AFLP, RAPD, SNP (Coltman 2008). Nujno je, da upravljamo prostoživečo divjad tako, da čim bolj zmanjšamo evlucijski vpliv. Lovske kriterije je pomembno prilagoditi tako, da samci lahko dosežejo reprodukcijski vrh in se razmnožujejo, preden so odstranjeni iz populacije. Pomembno pa je tudi, da se pri lovu vzpostavi ravnovesje med ustreljenimi samci in samicami in starostjo ustreljenih osebkov (Coltman 2008).

## 1.4 Genetski problemi divjega prašiča v Evropi

Genetska problematika divjega prašiča v Evropi je povezana predvsem z hibridizacijo (parjenje genetsko različnih osebkov, tudi različnih fenotipov) in introgresijo (prenos genov iz ene vrste ali oblike na drugo zaradi hibridizacije čez delno vzpostavljeno reproduktivno bariero) z domačim prašičem. Divji prašič je prednik domačega prašiča, s katerim si deli tesno genetsko afiniteto in se z njim lahko hibridizira. Genetska introgresija z domačim prašičem lahko tako predstavlja vir diferenciacije ter predstavlja veliko grožnjo genski integriteti (Scandura in sod. 2011). Skozi čas so na razširjenost divjega prašiča vplivali različni dejavniki, kot so kvartarne poledenitve, nato domestikacija v neolitiku (pred 10 000 leti), več ozkih grl v različnih območjih v zadnjih nekaj stoletjih, velika demografska razširitev v zadnjih 50 letih ter več introdukcij posameznikov v območja, kjer je vrsta v preteklosti izumrla (Scandura in sod. 2008).

### 1.4.1 Genetska variabilnost divjega prašiča

Kromosomsko število azijskih in evropskih divjih prašičev varira od 36 do 38 (Kryštufek 1991; Scandura in sod. 2011). Azijski divji prašič ima kromosomsko število  $2n=38$ , medtem ko so osebki s številom  $2n=36$  najdeni v Evropi. Evropske populacije imajo številčne polimorfizme s 36, 37 in 38 kromosomi. Kariotipi z  $2n=37$  so nastali z križanjem posameznikov z  $2n=36$  in  $2n=38$ . Predniško stanje vrst je bilo po vsej verjetnosti  $2n=38$ , kar je tudi najpogostejši kariotip v azijskih divjih in udomačenih populacijah.  $2n=36$  pa je izpeljan znak, ki pa je zdaj zelo pogost v evropskih populacijah. V nekaterih lokacijah je opažen polimorfizem, ki je rezultat translokacije in hibridizacijami z domačimi prašiči. Scandura in sod. (2008) so analizirali 664 sekvenc divjega in domačega prašiča. Z analizo mtDNA so prišli do ugotovitev, da se v Evropi nahajajo tri mtDNA linije in sicer E1, E2 in

klada A. Kladi E1 in A sta široko razširjeni v Evropi in vzhodni Aziji, medtem ko je klada E2 do zdaj najdena samo v Italiji, od klade E1 pa jo loči pet fiksiranih tranzicij.

#### 1.4.2 Disperzija po poledenitvah

Kljub številnim spremembah, ki jih je divji prašič preživel v preteklosti, je bila njihova genetska diverziteteta v Evropi pod večjim vplivom zgodovinskih sprememb (poledenitve). Scandura in sod. (2008) so izdelali primerjalno analizo nukleotidnega zaporedja kontrolnih regij mitohondrijske DNA (mtDNA) divjega prašiča, ki je pokazala vpliv pretekle geografske ekspanzije, kateri bi lahko sledilo krčenje obsega razširjenosti v Evropi v času zadnje poledenitve. Hipotezo, da so bili vzorci genetske varibilnosti divjega prašiča v Evropi oblikovani v zadnji poledenitveni kolonizaciji iz enega ali več južnih refugijev podpirata dva rezultata. Prvi, divergenca med evropskimi vzorci izven Italije so podobni v različnih primerjavah, ni pa opažene korelacije med opazovano genetsko in geografsko distanco. Drugič, mitohondrijske variacije v Italiji niso kompatibilne z demografsko ekspanzijo, tako mtDNA kot jedrni markerji kažejo podobno ali celo višjo raven variacije v Italiji, kot pa v ostalih evropskih regijah. MtDNA kaže, da bi se naj dve največji kladi E1 in E2 ločili pred vsaj 50.000 leti. Endemično klado E2 najdemo samo v Italiji, medtem ko klado E1 najdemo tudi drugod po Evropi. Razlaga za takšen vzorec je krčenje obsega razširjenosti vrste v južne refugije in nato ponovna disperzija v severne predele (Scandura in sod. 2008).

#### 1.4.3 Hibridizacija

Hibridizacija z domačim prašičem se v naravnih okoliščinah dogaja v zelo nizki frekvenci, vendar pa je zelo pogost pojav pri gojenih populacijah in predstavlja problem pri izpustitvi ali pobegu teh živali v divjino (Scandura in sod. 2011). Hibridizacija med divjim prašičem in njegovim domesticiranim sorodnikom je nezaželjena v kontekstu varovanja, kjer se poskušajo ohranjati genetsko čiste linije taksonov (Frantz in sod. 2013). Zaradi problema varovanja se pojavlja vse več študij, ki se ukvarjajo z hibridizacijo med divjim in domačim prašičem. Scandura in sod. (2008) so se osredotočili na več Evropskih populacij divjega prašiča, uporabili so deset polimorfni mikrosatelitov pri 252 divjih prašičih ter mtDNA kontrolno regijo pri 145 osebkih. Ugotovili so, da si divji in domači prašič delita nekatere najbolj pogoste mtDNA haplotipe in mikrosatelitne alele.  $F_{st}$  (fiksacijski indeks, mikrosateliti) vrednosti med divjim in domačim prašičem so bile manjše, kot pa med različnimi populacijami divjega prašiča. Namenska ali nenamenska hibridizacija bi lahko igrala pomembno vlogo pri zmanjšanju genetske divergence med divjim in domačim prašičem. Scandura in sod. (2008) so ugotovili, da 5% do 10% posameznikov divjih prašičev kaže posledice introgresije z domačim prašičem, vendar je globalni prispevek prašičjih genomov na prosto živeče populacije občutno nižji. Našli so tudi azijsko mtDNA v posameznih osebkih divjega prašiča v južni Italiji. Azijska mtDNA je po navadi najdena le v evropskih prašičjih pasmah, ki so križane z azijskimi prašiči, to pa kaže na to, da se je morala zgoditi neka stopnja hibridizacije med divjim in domačim prašičem. Druge dokaze o hibridizaciji so pridobili Frantz in sod. (2013), ki so v svoji študiji analizirali 697 osebkov iz Belgije, Luksemburga in Nemčije. Za analizo so uporabili mikrosatelitno genotipizacijo in mtDNA. Ugotovili so, da 27% osebkov iz Luksemburga nosi mtDNA azijskega izvora, ta DNA pa se je pojavila tudi v belgijskih populacijah. Tudi mikrosatelitni markerji so pokazali, da so belgijski divji prašiči hibridizirali z domačimi prašiči, medtem ko se to pri luksemburških populacijah ni pokazalo, saj so bili

identificirani le štirje takšni osebki. Vsi ti rezultati kažejo, da se hibridizacija med divjim in domačim prašičem dogaja, zato je potrebno sprejeti tudi primerne ukrepe za upravljanje z divjim prašičem v naravi.

#### **1.4.4 Translokacija**

Divji prašič je bil v preteklosti razširjen po celotni Evropi, vendar je prišlo do velikega zmanjšanja populacij v 19. in 20. stoletju zaradi človekovega izkoriščanja in spremembe habitata. Vrsta je v Veliki Britaniji izumrla že pred 17. stoletjem, kasneje je izumrla tudi na Nizozemskem, Danskem, v Češki republiki, Švici, Sloveniji in Baltiških državah. Kasneje je potekala translokacija iz preostalih populacij: Francije, Nemčije, Poljske, Slovaške, Madžarske in Romunije (Scandura in sod. 2011). Te translokacije pa so prinesle številne posledice na populacije divjih prašičev. Vplivale so na genetsko variabilnost z nedavnimi demografskimi ekspanzijami in z mešanjem genetskih skladov različnih podvrst ali populacij (Scandura in sod. 2008). Vernesi in sod. (2003) so raziskovali vpliv translokacije na italijanske in madžarske populacije divjega prašiča. Za študijo so uporabili 105 osebkov iz Italije in Madžarske, pri čemer so uporabili devet avtosomalnih mikrosatelitnih lokusov. Pokazalo se je, da so posamezni osebki iz Italije pod vplivom reintrodukcije in so genski hibridi. Nasploh se pa ni pokazal velik vpliv na gensko strukturo populacij zaradi preteklih translokacij. S tem se strinjajo tudi Scandura in sod. (2008), ki so v svoji raziskavi ugotovili, da ima le 7% osebkov genom, ki ga lahko povežemo z osebki izven Evrope. Iz tega sklepa, da je imela translokacija iz Srednje Evrope minimalen genetski vpliv na populacije.

### **1.5 Namen in cilji dela**

V zaključni nalogi smo želeli optimizirati izolacijo in pomnoževanje DNA iz svežih tkivnih vzorcev ter iz čeljusti divjega prašiča. Predvsem smo se osredotočili na izolacijo tkiva iz obdelanih trofejnih vzorcev. Takšna izolacija je lahko zelo težavna, saj je DNA iz čeljusti močno degradirana zaradi odstranjevanja tkiva ter njihovega prekuhanja v vreli vodi in kasnejša oksidacija z vodikovim peroksidom. Za preverjanje uspešnosti optimizacije amplifikacije smo uporabili mikrosatelitne in mitohondrijske (citokrom b in kontrolno regijo) markerje, Gen za citokrom b smo uporabili za identifikacijo vrste, saj lahko pride pri degradiranih vzorcih tekom postopka do kontaminacije. S kontrolno regijo pa smo želeli identificirati, če v Sloveniji obstaja endemična Italijanska klada E2.

Cilji:

- 1) Izolacija DNA iz svežih tkivnih vzorcev ter iz vzorcev obdelanih čeljusti divjega prašiča.
- 2) Optimizacija pomnoževanja mikrosatelitnih markerjev, citokroma b in kontrolne regije.
- 3) Določanje uspešnosti mikrosatelitnih lokusov tako na svežih tkivih kot na obdelanih čeljustih.
- 4) Določanje nukleotidnega zaporedja za citokrom b in kontrolno regijo.

## 1.6 Pomen zbirk čeljusti

Zbirke lovskih trofej so zelo pomembne v kontekstu varovanja, nadzorovanja in upravljanja populacij. S pomočjo čeljusti lahko pridobimo pomembne podatke o starostni in spolni strukturi populacije, o populacijski dinamiki, o vplivu okolja na vitalnost osebkov, o zdravstvenem stanju osebkov in populacij, o onesnaženosti okolja ter za detekcijo hibridizacije in introgresije v populacijah. V Sloveniji imamo nacionalno arhivsko zbirko čeljusti parklarjev, ki jo je vzpostavil ERICo Velenje. Zbirka vključuje več kot 100 000 primerkov čeljusti parklarjev. Takšne zbirke imajo velik pomen za študije biologije vrste kot tudi za genetske študije tako na nacionalni kot na svetovni ravni. S pomočjo takšnih zbirk bomo lahko v prihodnje pridobili številne podatke o biologiji vrste ter o genetski strukturi populacije (Pokorny in sod. 2011).

## 1.7 Mikrosateliti

Mikrosateliti so tandemsko ponovljiva zaporedja DNA, pri katerih je ponavljajoča enota kratka in dolga manj kot 13bp (Brown in sod. 2007). Mikrosateliti so znani tudi pod imeni ponovitve enostavnih zaporedij oz. SSR (angl. simple sequence repeats) in kratke tandemske ponovitve oz. STR (angl. short tandem repeats) (Guichoux in sod. 2011). Najpogostejša je dinukleotidna ponovitev, polovico slednjih predstavljajo ponovitve motiva CA (Brown in sod. 2007; Griffiths in sod. 2008). Pogosta je tudi ponovitev enega samega nukleotida, (npr. AAAAA) (Brown in sod. 2007).

Mikrosatelite delimo na:

**Popolne**, ki so sestavljeni iz enega motiva ponovitve, npr. ponovitev motiva CT (CTCTCTCTCTCTCT)

**Nepopolne**, pri katerih ena ali več ponovitev vsebuje bazo, ki ne odgovarja motivu ponovitve (npr. CTCTCTCTCTCTCTGTCTCTCTCT)

**Prekinjene**, ki vsebujejo krajšo insercijo baznih parov, ki se ne ujemajo z osnovnim motivom ponovitve (npr. CTCTCTCTGGGCTCTCT)

**Sestavljene**, ki vključujejo dva ali več mikrosatelitov, ki se med seboj razlikujejo po tipu ali motivu ponovitve (npr. CTCTCTCTGATGATGATGAT) (Štajner 2010).

Znano je, da se mikrosateliti pri nekaterih vrstah razvijajo hitreje kot pri drugih, da so daljši in pogostejši pri vretenčarjih, kot pa pri nevretenčarjih (Chambers in MacAvoy 2000). Mikrosateliti so zaradi svoje variabilnosti zelo uporabni v populacijski genetiki, saj je število ponavljajočih se enot pri različnih predstavnik vrste lahko drugačno. Njihova variabilnost je posledica nepravilnega parjenja zdrsnjenih verig (angl. slippage) med replikacijo DNA, kar vodi do insercij in delecij ene ali več ponavljajočih se enot ter nepravilnega prekrižanja pri mejozi (Brown in sod. 2007; Kalia in sod. 2010). Ključ v vsestranskosti mikrosatelitov leži v visoki stopnji variabilnosti, ki je najdena na lokusih, hitrostjo in verodostojnostjo, s katero je informacija pridobljena v laboratoriju. Zato, ker so mikrosatelitni lokusi mnogokrat hipervariabilni (imajo več alelov ob relativno visoki frekvenci), so idealno orodje za molekularno identifikacijo posameznikov (Chambers in MacAvoy 2000). Prihod naslednje generacije sekvenceniranja pomeni, da je identifikacija mikrosatelitov postala enostavnejša in cenejša, prav tako je postala enostavnejša izdelava multipleksnih mikrosatelitov, kar pomeni pomnoženo več kot eno tarčno sekvenco z vključitvijo večih parov začetnih oligonukleotidov v reakciji (Guichoux in sod. 2011). Uporabnost mikrosatelitov je vsestranska, uporabljajo se pri genetskem mapiranju, filogeniji, populacijski in varstveni genetiki, identifikaciji posameznikov ter pri določanju

starševstva, epidemiologiji in patologiji ter mapiranju kvantitativnih lastnosti posameznikov (Chistiakov in sod. 2006).

## 1.8 Citokrom b

Mitohondrijska DNA (mtDNA) je pomembna molekula za razumevanje evlucijskih povezav med posamezniki, populacijami in vrstami. Gen za citokrom b je del mitohondrijske DNA ter je dolg 1140 bp (Irwin in sod. 1991). Mitohondrijska DNA se deduje po materi. Evlucijska stopnja mtDNA je 5 do 10 krat hitrejša od jedrnega genoma, zaradi česar ima mtDNA visoko stopnjo tranzicij in tranzverzij. Te karakteristike omogočajo, da je mtDNA idealno orodje za evlucijske študije (Castro in sod. 1998). Citokrom b je centralna podenota citokroma c, odgovoren je za transmembranski transport elektronov, kjer je redoks energija pretvorjena v protonsko gonilno silo (Esposti in sod. 1993). Gen za citokrom b je bil uporabljen v številnih študijah filogenetskih povezav pri sesalcih (Castresana 2001). Njegova variabilnost je najbolj koristna za primerjavo vrst v istem rodu ali v isti družini. Uporaba tega gena v filogenetskih študijah je pripeljala do predlogov novega sistematskega razvrščanja, ki bolje odraža filogenetske odnose med vrstami (Castresana 2001).

## 1.9 MtDNA kontrolna regija (D-Loop)

Kontrolna regija je del mitohondrijskega genoma in je nekodirajoča regija. Kontrolna regija ima največjo substitucijsko stopnjo znotraj mitohondrijskega genoma. Deli kontrolne regije evolvirajo 2 do 5 krat hitreje kot ostala mtDNA. V kontrolni regiji mtDNA vretenčarjev se nahaja d-zanka (angl. D-loop). D-loop je trovijačna struktura, ki se pojavi med replikacijo. D-loop je dolg med 880 do 1400bp in je najhitreje razvijajoči del mitohondrijskega genoma. Zaradi visoke stopnje mutacij je kontrolna regija dobro orodje za evlucijske študije znotraj vrst (Meyer 1993).

## 2 METODE DELA

### 2.1 Vzorci tkiva

Zamrznjene vzorce svežega tkiva smo pridobili od različnih lovskih družin po Sloveniji (Lovske družine Fajti hrib, Tabor-Sežana, Gaberk-Divača) ter iz Inštituta za ekološke raziskave, Erico Velenje d.o.o., slednji so priskrbeli tudi vzorce čeljusti divjega prašiča. Informaciji o posameznih vzorcih so zapisane v prilogi A.

### 2.2 Izolacija DNA

Izolacija DNA je potekala po protokolu proizvajalca Promega, s pomočjo kita za izolacijo genomske DNA Promega Wizard SV Genomic DNA purification System (Promega 2014). Izolirali smo vzorce svežega tkiva in vzorce tkiva iz čeljusti divjega prašiča. Pri izolaciji DNA iz čeljusti divjega prašiča smo zaradi pomanjkanja primerne tkiva za izolacijo DNA, tkivo pridobivali tako, da smo iz čeljusti pulili zobe ter s skalpelom strgali tkivo zobne pulpe, ki je ostalo pritrjeno na delu zobovja. Za izolacijo DNA smo imeli na voljo 15 čeljusti, vendar so bile nekatere intenzivno z vodikovim peroksidom, zato iz njih ni bilo mogoče pridobiti tkiva. Tako smo iz prvotnih petnajstih čeljusti uporabili le deset, iz katerih smo pridobili tkivo. Vzorec št. 2 smo izolirali dvakrat, izolirali smo maščobo ter



tkivo pod zobom. Na sliki 2 je prikazan postopek puljenja zob. Na sliki 3 pa je prikazana razlika med zobom, na katerega je pritrjeno tkivo in zobom, ki je bil premočno očiščen, da bi bil uporaben za izolacijo DNA.



Slika 2: Prikaz puljenja zob iz spodnje čeljusti



Slika 3: Na levi stani zob na katerem se nahaja tkivo, na desni strani pa zob, ki je preveč očiščen in zato neprimeren za izolacijo DNA

### **2.2.1 Priprava tkiva na izolacijo**

DNA smo izolirali iz 16 vzorcev svežega tkiva ter iz 11 vzorcev čeljusti.

Pri izolaciji DNA iz tkiva smo s skalpelom odrezali košček tkiva približne velikosti 0,5 cm x 0,5 cm. Tkivo smo na papirnati brisački, ki smo jo menjali za vsak nov vzorec, narezali še na manjše koščke ter ga s skalpelom zmacerirali. Tkivo smo nato prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko. Za vsak nadaljnji vzorec smo očistili skalpel ter pinceto, ju razkužili z etanolom ter ožgali nad ognjem, da smo preprečili možnost kontaminacije med vzorci. Pri izolaciji DNA iz zob smo strgali tkivo na zobni pulpi, ki smo ga prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko in vsakemu vzorcu dodali 1mL destilirane vode brez RNA in DNA. Po 15 minutah smo vodo odpipetirali ter postopek dodajanja vode in spiranja ponovili še dvakrat. Po tretjem, zadnjem spiranju smo vodo odpipetirali in nadaljevali z izolacijo (z lizo tkiva).

### **2.2.2 Liza tkiva**

Liza tkiva je postopek pri kateri razgradimo tkivo ter izločimo DNA v tekoči puferski medij. Končni volumen (275  $\mu$ L) pufra za lizo celic je vseboval, 200 $\mu$ L Nuclei Lysis solution, 50 $\mu$ L 0,5M EDTA (pH 8.0), 20 $\mu$ L proteinaze K in 5 $\mu$ L RNA A raztopine. Vsakemu vzorcu smo dodali pripravljeno mešanico in jo dobro premešali na vibracijskem mešalniku ter inkubirali pri 55°C čez noč. Vzorce smo med samo inkubacijo večkrat premešali na vibracijskem mešalniku. Po končani inkubaciji smo vzorcem dodali 250 $\mu$ L Wizard SV Lysis pufra ter vzorce premešali na vibracijskem mešalniku in nato centrifugirali 1 minuto pri 13000 obratih, da so se na dno mikrocentrifugirke usedle nečistoče.

### **2.2.3 Vezava DNA na kolono**

Raztopino vzorca smo nato prepipetirali na kolone za izolacijo, ki so bile položene na zbiralno mikrocentrifugirko. Vzorce smo še enkrat centrifugirali za tri minute na 13000 obratih tako, da se je DNA vezala na kolono. Če se ni ves lizat precedil čez kolono, smo centrifugiranje ponovili. Po centrifugiranju smo prestavili kolono v novo zbiralno mikrocentrifugirko, staro pa smo zavrgli.

### **2.2.4 Čiščenje DNA**

Na kolono vezano DNA smo štirikrat spirali z raztopino za čiščenje Wash solution. Vsakemu vzorcu smo dodali 650 $\mu$ L raztopine in centrifugirali za eno minuto pri 13000 obratih. Tekočino smo po centrifugiranju zavrgli, osušili zbirno mikrocentrifugirko ter ponovili postopek. Po štirikratnem čiščenju smo vzorce centrifugirali še zadnjič za dve minuti pri 13 000 obratih, da smo osušili vezano DNA na koloni.

### **2.2.5 Ekstrakcija DNA iz kolone**

Kolono smo položili v 1,5 mL mikrocentrifugirko ter dodali 250 $\mu$ L Nuclease free water, ki je bila predhodno segreti na 65°C ter inkubirali na sobni temperaturi 15 minut, da smo »sprali« DNA s kolone. Po 15 minutah smo vzorce centrifugirali eno minuto pri 13000 obratih, da je tekočina prešla iz minikolone v mikrocentrifugirko. Vzorcem smo nato izmerili koncentracijo ter jih shranili pri -20°C za nadaljnjo obdelavo.

## 2.3 Merjenje koncentracij DNA in nečistoč

Po izolaciji smo zmerili koncentracije DNA s spektrofotometrom EPOCH. Meritev smo izvedli tako, da smo na ploščo najprej nanесли dva slepa vzorca in sicer 3 $\mu$ L deionizirane vode, ki je služila za umeritev spektrofotometra. Nato smo na ploščo nanесли ostale vzorce, prav tako 3 $\mu$ L, pri pa tem smo pazili da smo nanесли kapljice brez mehurčkov. Najprej smo izmerili slepe vzorce in če so bili ti ustrezni, smo izmerili še ostale koncentracije. Meritev smo nato izvajali v računalniškem programu GEN5, ki izmeri čistočo vzorcev ter koncentracijo DNA. Čistost vzorcev se meri z razmerjem absorbanc pri valovnih dolžinah A260 nm in A280 nm. Vzorec lahko označimo za čist, če je razmerje A260/A280 med vrednostjo 1,8 in 2,0. Rezultate koncentracij DNA dobimo v enoti ng/ $\mu$ L, optimalna koncentracija za PCR je med 50 $\mu$ L in 100 $\mu$ L za sveža tkiva. Pri vzorcih kjer je bila koncentracija višja od optimalne, smo vzorce redčili z deionizirano vodo na ustrezno koncentracijo.

## 2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je in vitro metoda selektivnega pomnoževanja dela DNA na katerega se vežejo začetni oligonukleotidi (Griffiths in sod. 2008). Za izvedbo reakcije je tarčna DNA pomešana s *taq* DNA polimerazo, začetnimi oligonukleotidi in nukleotidi. Začetni oligonukleotidi se morajo vezati na obeh straneh verige, v reakciji pa so pomembni, ker določajo začetno mesto sinteze DNA. Matrične DNA v reakciji je lahko zelo malo, saj je reakcija zelo občutljiva in zadostuje že ena sama molekula DNA (Brown in sod. 2007).

Reakcija se začne s segrevanjem mešanice na 94 °C. Pri tej temperaturi se prekinajo vodikove vezi, ki povezujejo polinukleotidni verigi, DNA se denaturira v enoverižne molekule. Temperatura je nato zmanjšana na 50 °C do 60 °C. Pri tej temperaturi se na nekaterih mestih verige spet povežejo med seboj. Ta temperatura omogoča vezavo začetnim oligonukleotidom na mesto prileganja (angl. annealing positions). Temperatura se nato poviša na 72 °C, kar je optimalna temperatura za delovanje *Taq* polimeraze, ki podaljšuje nastajajočo DNA verigo z dodajanjem deoksiribonukleotidov. Rezultat ene reakcije sta dve dverišni DNA molekuli, novo nastala DNA pa služi za pomnoževanje v naslednjem ciklu. Število molekul tako s cikli eksponentno narašča, po 30 ciklih bo tako več kot 250 milijonov kopij (Brown in sod. 2007).

## 2.5 Določanje mikrosatelitnih lokusov: Mikrosateliti

### 2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo PCR

Za analizo mikrosatelitnih lokusov smo uporabili 4 vzorce svežega tkiva (SUS 2, SUS4, SUS12, SUS13) in 6 vzorcev tkiva iz čeljusti, 4 vzorce z optimalno absorbanco in masno koncentracijo (SUSb2\_2, SUS 5, SUS 8, SUS 10) ter 2 vzorca z nizko masno koncentracijo in z neoptimalno absorbanco (SUS 7 IN SUS 9). Uporabili smo 4 mešanice z več začetnimi oligonukleotidi ter tri mešanice s posameznimi pari oligonukleotidov. Podrobnejši podatki o sestavi posameznih mešanic so zapisani v preglednici 2. Podrobnejši podatki o začetnih oligonukleotidih so opisani v prilogi B. Reakcijsko zmes za PCR smo nato pripravili iz ddH<sub>2</sub>O, kappa multiplex (Biosystems) in začetnih oligonukleotidov. V stripe smo razdelili po 8 $\mu$ L reakcijske zmesi ter dodali 2 $\mu$ L DNA. Vzorce smo na kratko

centrifugirali ter jih prenesli v ciklični termostat, kjer smo nastavili temperaturni profil, kot je zapisano v preglednici 3 .

Preglednica 2: Volumen komponent PCR reakcije

	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L/10 $\mu$ L)	Kappa multiplex ( $\mu$ L/10 $\mu$ L)	Začetni oligonukleotidi (10 $\mu$ M)	Volumen začetnih oligonukleotidov	Končna koncentracija
SET1 (Multipleks 1)	3,5 $\mu$ L	3,9 $\mu$ L	SW2532, SW1492, S355	0,1 $\mu$ L	0,1 $\mu$ M
SET2 (Multipleks 2)	3,3 $\mu$ L	3,9 $\mu$ L	SW461, SW2496, SW951, SW2021	0,1 $\mu$ L	0,1 $\mu$ M
SET3 (Multipleks 3)	3,7 $\mu$ L	3,9 $\mu$ L	S215, SW72	0,1 $\mu$ L	0,1 $\mu$ M
SET4 (Multipleks 4)	3,5 $\mu$ L	3,9 $\mu$ L	SW857, S155, SW24	0,1 $\mu$ L	0,1 $\mu$ M
MIX5	3,7 $\mu$ L	3,9 $\mu$ L	S090	0,2 $\mu$ L	0,2 $\mu$ M
MIX6	3,7 $\mu$ L	3,9 $\mu$ L	IGF1	0,2 $\mu$ L	0,2 $\mu$ M
MIX8	3,7 $\mu$ L	3,9 $\mu$ L	S026	0,2 $\mu$ L	0,2 $\mu$ M

Preglednica 3: Temperaturni profili za PCR reakcijo

<b>SET 1</b>				
	Št. ciklov	temperatura	čas	touchdown
Začetna denaturacija		95°C	15 minut	
denaturacija	10	94°C	30 sekund	-0,6°C na cikel
prileganje		Od 58°C do 52°C	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
denaturacija	28	94°C	30 sekund	
prileganje		52°C	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
		60°C	30 minut	
<b>SET 2</b>				
	Št. ciklov	temperatura	čas	touchdown
Začetna denaturacija		95°C	15 minut	
denaturacija	10	94°C	30 sekund	-1°C na cikel
prileganje		Od 62°C do 52°C	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
denaturacija	28	94°C	30 sekund	
prileganje		52°C	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	

		60°C	30 minut	
<b>SET 3</b>				
	Št. ciklov	temperatura	čas	touchdown
Začetna denaturacija		95°C	15 minut	
denaturacija	10	94°C	30 sekund	-1,6°C na cikel
prileganje		Od 63°C do 47	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
denaturacija	28	94°C	30 sekund	
prileganje		47°C	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
		60°C	30 minut	
<b>SET 4</b>				
	Št. ciklov	temperatura	čas	touchdown
Začetna denaturacija		95°C	15 minut	
denaturacija	10	94°C	30 sekund	-1,6°C na cikel
prileganje		Od 63°C do 47°C	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
denaturacija	28	94°C	30 sekund	
prileganje		47°C	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
		60°C	30 minut	
<b>ZMES 5</b>				
	Št. ciklov	temperatura	čas	touchdown
Začetna denaturacija		95°C	15 minut	
denaturacija	10	94°C	30 sekund	-0,8°C na cikel
prileganje		Od 63°C do 55°C	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
denaturacija	28	94°C	30 sekund	
prileganje		55°C	90 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
		60°C	30 minut	
<b>ZMES 6</b>				
	Št. ciklov	temperatura	čas	touchdown
Začetna denaturacija		94°C	10 minut	
denaturacija	35	94°C	30 sekund	
prileganje		55°C	60 sekund	
podaljševanje		72°C	60 sekund	
		60°C	30 minut	
<b>ZMES 7</b>				
	Št. ciklov	temperatura	čas	touchdown
Začetna		94°C	10 minut	

denaturacija			
denaturacija	35	94°C	30 sekund
prileganje		54°C	60 sekund
podaljševanje		72°C	60 sekund
		60°C	30 minut

### 2.5.2 Fragmentna analiza

Za fragmentno analizo smo zmešali reakcijsko zmes s končnim volumnom 12,3 $\mu$ L, ki je bila sestavljena iz 0,3  $\mu$ L LIZ-a 500 (dolžinski standard) in 12 $\mu$ L formamida, ki je močan denaturant DNA vijačnice. Reakcijsko zmes smo nato zmešali na vorteksu. Na ploščo smo nato nanesti 12,3 $\mu$ L reakcijske zmesi in 1 $\mu$ L vzorca ter jo pokrili s septo in jo položili na ciklični termostat za 5 minut na 95°C, da je potekla denaturacija. Po potekli denaturaciji smo preložili ploščo z vzorčki na zmrznjeno ploščo, da so se vzorci ohladili. Ko se je plošča ohladila, smo jo v centrifugi na hitro scentrifugirali ter položili na sekvenator. Rezultate fragmentne analize smo obdelali s programom Genemapper (Applied Biosystems).

## 2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja: Citokrom b

### 2.6.1 Verižna reakcija s polimerazo

Za pomnoževanje zaporedja gena za citokrom b smo uporabili vse izolirane vzorce (27 vzorcev), saj smo želeli potrditi vrstno identifikacijo ter preveriti, da ni prišlo do morebitne kontaminacije v postopku. Verižno reakcijo smo izvajali z začetnimi oligonukleotidi L14727sp in H15497sp (Jaarola in Searle 2002, Jaarola in sod. 2004). Za PCR reakcijo smo zmešali reakcijsko zmes z končnim volumnom 13 $\mu$ L iz 7 $\mu$ L Kappa multiplexa, 4,9 $\mu$ L vode, 0,5 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> in 0,3 $\mu$ L začetnega oligonukleotida (L14727sp) in 0,3 $\mu$ L drugega začetnega oligonukleotida (H15497sp). Reakcijsko zmes smo vorteksirali in kratko centrifugirali, nato pa smo jo razdelili v stripe po 13 $\mu$ L za vsak vzorec. V stripe smo nato dodali 2 $\mu$ L DNA, to smo počeli na zamrznjeni plošči zaradi temperaturno pogojene aktivnosti polimeraze. Vzorce smo nato položili v ciklični termostat, kjer smo nastavili temperaturni profil na:

94°C, 3 minute (1 cikel)

94°C, 15 sekund, 48°C, 30 sekund, 72°C, 60 sekund 30 ciklov)

65°C, 10 minut (1 cikel)

### 2.6.2 Gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza je metoda ločitve DNA molekul različnih dolžin s pomočjo električnega toka, uporablja se tako za DNA kot RNA analize. Pri elektroforezi negativno nabite molekule potujejo proti pozitivni elektrodi, pozitivno nabite molekule pa proti negativni elektrodi. Gel je sestavljen iz agaroze, ki je polisaharid in formira pore velikosti premera od 100nm do 300nm. Velikost por je odvisna od koncentracije agaroze v gelu (Brown 2006). Pripravili smo 1,5% agarozni gel; zatehtali smo 1,9 g agaroze in v merilnem valju izmerili 125ml 0,5 x TBE (Tris boratni pufer z EDTA). Agarozo in TBE smo zmešali v elenmajerici ter segrevali 1 do 2 minuti v mikrovalovni pečici do vrenja. Po vrenju smo postavili elenmajerico pod mrzlo tekočo vodo, da se je gel ohladil na okrog

60°C. Tekoči gel smo vlili v kalup, v katerega smo predhodno postavili tri glavničke po 20 mest, odstranili smo morebitne mehurčke in pustili gel ohlajati. Med tem smo pripravili parafilm, na katerem smo pripravili mešanico nanašalnega barvila (angl. loading dye, Fermentas) in 3 $\mu$ L PCR produkta ter ločeno molekularni standard (angl. gene ladder, Fermentas). S pomočjo molekularnega standarda se določa dolžina fragmentov. Nanašalno barvilo dodamo zato, da ima vzorec večjo gostoto in ostane v jamici ter zaradi lažjega nanašanja na gel. Barvilo je prav tako kot DNA negativno nabito, zato potuje v enaki smeri kot DNA. Pripravljene vzorce smo prenesli v sobo za gel, ohlajen gel smo iz kalupa prenesli v elektroforezo z 0,5 x pufrom TBE ter s pipeto nanесли najprej lestvico v prvo luknjico in v ostale luknjice vzorčke. Elektroforezo smo nastavili na 90 V ter pustili teči 60 minut. Po 60 minutah smo za 5 minut gel prestavili v banjico z etidijevim bromidom in TBE. Etidijev bromid se vrine med bazne pare in fluorescira pod UV lučjo (Brown 2006). Gel smo nato 5 minut spirali v banjici vode in ga fotografirali pod UV lučjo s pomočjo kamere Unitec miniBIS ter z računalniškim programom Gel capture.

### 2.6.3 Direktno čiščenje PCR produktov

Za čiščenje smo uporabili encima alkalno fosfatazo (Fermentas) in eksonukleazo I (Fermentas). Alkalna fosfataza odstranjuje 5' in 3' fosfatne skupine, eksonukleaza pa cepi verige DNA na koncih. Direktno čiščenje PCR produktov smo izvajali pri vzorcih, kjer smo pri gelski elektroforezi dobili primerno dolg produkt gena za citokroma b. Za vsak vzorec smo zmešali reakcijsko zmes s končnim volumnom 2 $\mu$ L, ki je bila sestavljena iz 0,1 $\mu$ L Exo I (eksonukleaza I), 0,5 $\mu$ L AP (alkalna fosfataza) in 1,4 $\mu$ L 1xPCR pufru. V stripe smo nato razdelili po 2 $\mu$ L reakcijske zmesi za vsak vzorec ter dodali 5 $\mu$ L PCR produkta. Stripe smo nato kratko centrifugirali ter položili na ciklični termostat za 45 minut pri 37°C, da smo razgradili začetne oligonukleotide in odvečne nukleotide v mešanici ter nato za 15 minut pri 80°C, da smo inaktivirali uporabljena encima.

### 2.6.4 Sekvenčna reakcija

Pri sekvenčni reakciji dobimo sete fragmentov, dolžine fragmentov kažejo na pozicijo baze DNA, s kapilarno elektroforezo pa lahko nato določimo zaporedje DNA. Sekvenčno reakcijo smo izvajali na vzorcih tkiva in čeljusti za gen citokrom b, ki so bili predhodno očiščeni z metodo direktnega čiščenja. Za reakcijo smo zmešali dve reakcijski zmesi, v prvo zmes smo dodali 4,3 $\mu$ L vode, 2 $\mu$ L Big Dye buffer (Fermentas), 0,5 $\mu$ L Big dye (BigDye Terminator v3.1 Cycle, Fermentas), ter 0,2 $\mu$ L začetnega oligonukleotida (L14727sp), drugo mešanica je bila enaka s tem, da smo primešali drug začetni oligonukleotid (H15497sp). Reakcijsko mešanico smo razdelili v stripe po 7 $\mu$ L ter dodali 3 $\mu$ L DNA. Ko smo razdelili mešanico v stripe, smo jih pokrili s folijo, zaradi občutljivosti barvila Big dye na svetlobo. Stripe smo nato prenesli na ciklični termostat, kjer smo nastavili protokol na 96°C za tri minute (1 cikel), nato 96°C za 10 sekund, 49°C za 10 sekund, 60°C za 4 minute (50 ciklov), ter 7 minut na 72°C (1 cikel).

### 2.6.5 Čiščenje s precipitacijo z ETANOL/EDTA

Ploščo z vzorci smo najprej na kratko centrifugirali tako, da so se vse kapljice usedle na dno plošče. V vzorčke smo nato dodali 2,5 $\mu$ L 125mM EDTA (pH 8.0) ter jih na kratko centrifugirali tako, da je EDTA prišel v stik s sekvenčno reakcijo. Zatem smo dodali 30 $\mu$ L absolutnega etanola vsakemu vzorcu ter jih pokrili s folijo in 5-10 obrnili. Vzorce smo pustili pokrite in jih inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. Po 15 minutah smo vzorce



centrifugirali pri maksimalni hitrosti (14000 obratov/minuto) 55 minut pri 4°C. Po končanem centrifugiranju smo izlili etanol s hitrim gibom navzdol tako, da je v plošči ostal samo palet. Ploščo smo osušili tako, da smo jo obrnjeno navzdol centrifugirali na papirnati brisački pri 190x 2 minuti. Ploščo smo nato inkubirali na sobni temperaturi 5 minut ter pazili, da je zaščitena pred svetlobo. Na koncu smo vzorcem dodali 12µL formamida, da se je v DNA v peletu raztopila. Vzorce smo sekvencirali na sekvencatorju (genetski analizator ABI Prism 3130) in jim določili nukleotidno zaporedje.

## 2.6.6 Analiza nukleotidnega zaporedja

Rezultate citokroma b smo najprej obdelali v računalniškem orodju CodonCode Aligner, s pomočjo katerega smo odstranili slabše dele sekvenc ter očistili sekvence. Pridobljena zaporedja smo nato preverili s programom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST je orodje, s pomočjo katerega lahko najdemo podobnosti med posameznimi zaporedji. Program primerja nukleotidna in proteinska zaporedja z zaporedji v podatkovni bazi ter izračuna statistično podobnost med njimi. S pomočjo programa smo preverili, če smo dobili pravilno vrsto in ocenili, če je prišlo do morebitne kontaminacije.

## 2.7 Določanje nukleotidnega zaporedja: D-loop

### 2.7.1 Verižna reakcija s polimerazo

Za regijo D-loop smo uporabili osem vzorcev živali odvzetih v primorski regiji, saj smo želeli preveriti, če tudi v Sloveniji obstaja endemična italijanska klada E2 (Scandura in sod. 2008). Za reakcijo smo zmešali dve ločeni reakcijski zmesi. Prva zmes s končnim volumnom 13µL je vsebovala 8µL Kappa multiplex, 1,50µL MgCl<sub>2</sub>, 1,50µL vode, 1µL začetnega oligonukleotida D-loop MF (Douzery in Randy 1997) ter 1µL drugega začetnega oligonukleotida D-loop H493 (Douzery in Randy 1997). Druga reakcijska zmes s končnim volumnom 13µL je vsebovala 8µL Kappa multiplex, 1,50µL MgCl<sub>2</sub>, 1,50µL vode, 1µL začetnega oligonukleotida D-loop L362 (Douzery in Randy 1997), 1µL drugega začetnega oligonukleotida D-loop H (Douzery in Randy 1997). Reakcijski zmesi smo vorteksirali in kratko centrifugirali, nato pa smo ju razdelili v stripe po 13µL za vsak vzorec. V stripe smo nato dodali 2µL DNA, to smo počeli na zamrznjeni plošči zaradi temperaturno pogojene aktivnosti polimeraze. Vzorce smo nato položili v ciklični termostat, kjer smo nastavili temperaturni profil na :

1. Reakcijska zmes:
  - 95°C, 15 min (1 cikel)
  - 94°C 40 sekund (20 ciklov)
  - Touchdown iz 58°C za 0,5°C na cikel, 90 sekund (20 ciklov)
  - 72°C, 150 sekund (20 ciklov)
  - 94°C, 40 sekund (20 ciklov)
  - 50°C, 90 sekund (20 ciklov)
  - 72°C, 150 sekund (20 ciklov)
  - 60°C, 30 minut (1 cikel)
2. Reakcijska zmes
  - 95°C, 15 min (1 cikel)
  - 94°C 40 sekund (20 ciklov)



Touchdown iz 56°C za 0,5°C na cikel, 90 sekund (20 ciklov)

72°C, 150 sekund (20 ciklov)

94°C, 40 sekund (20 ciklov)

50°C, 90 sekund (20 ciklov)

72°C, 150 sekund (20 ciklov)

60°C, 30 minut (1 cikel)

Nadaljnji postopki potekajo po enakem vrstnem redu kot pri pomnoževanju zaporedja gena za citokrom b.

### 3 REZULTATI Z DISKUSIJO

#### 3.1 Izmerjena masna koncentracija in absorbanca

Izolacija DNA iz svežih tkivnih vzorcev je bila uspešna pri vseh vzorcih, medtem ko je bila izolacija iz trofejnih vzorcev uspešna pri 62 % vzorcev. Pri ostalih vzorcih pa so bile čeljusti tako intenzivno očiščene, da izolacija ni bila uspešna. Iz vzorcev čeljusti smo tkivo izolirali iz tkiva na korenini zoba, notranjosti zoba ter maščobe, ki se nahaja v čeljustih. DNA smo izolirali iz zobovja, ker so zobje so odporni na neugodne razmere, kot so vlaga, visoka temperatura in mikrobi. Zaradi teh značilnosti so dober vir DNA, pri močno degradiranih vzorcih ali pa vzorcih, kjer imamo na voljo za izolacijo le lobanjo (Hughes-Stamm 2012). Raziskava Gaytmenn in sod. (2003) je pokazala, da se največje količine DNA nahajajo v korenini zoba, temu pa sledi območje krone, konica korenine in konica krone. Korenina zoba je sestavljena in zobne pulpe in dentina, zaradi česar vsebuje tudi največje količine DNA. Rezultati te raziskave se skladajo tudi z našimi rezultati, saj smo pri 82 % izoliranih vzorcev, izolirali DNA iz tkiva na korenini zoba. Glede na masno koncentracijo in razmerje absorbanca so bili najbolj uspešni vzorci izolirani iz tkiva na korenini zoba. Na korenini je tkivo namreč zaščiteno pred kontaminacijo ter se ohrani kljub čiščenju čeljusti. Pri izolaciji je zato ključnega pomena ohranjenost tkiva na zobeh. Rezultati koncentracije in absorbanca posameznih vzorcev so prikazani v preglednici 4. Pri vzorcu svežega tkiva je bilo 81 % vzorcev v ustreznem rangu absorbanca, ki se giblje od 1,8 do 2,0, kar pomeni, da večina vzorcev ne vsebuje ostankov proteinov in drugih nečistoč. Izmerjene koncentracije so bile pri večini vzorcev nekoliko nižje od optimalne koncentracije, ki se giblje okrog 50ng/μL. Pri vzorcih čeljusti je bila optimalna absorbanca le pri 36 % vzorcih, izmerili pa smo tudi nižje masne koncentracije, kot pri vzorcih svežega tkiva. Takšni rezultati so posledica degradacije tkiva v čeljustih.

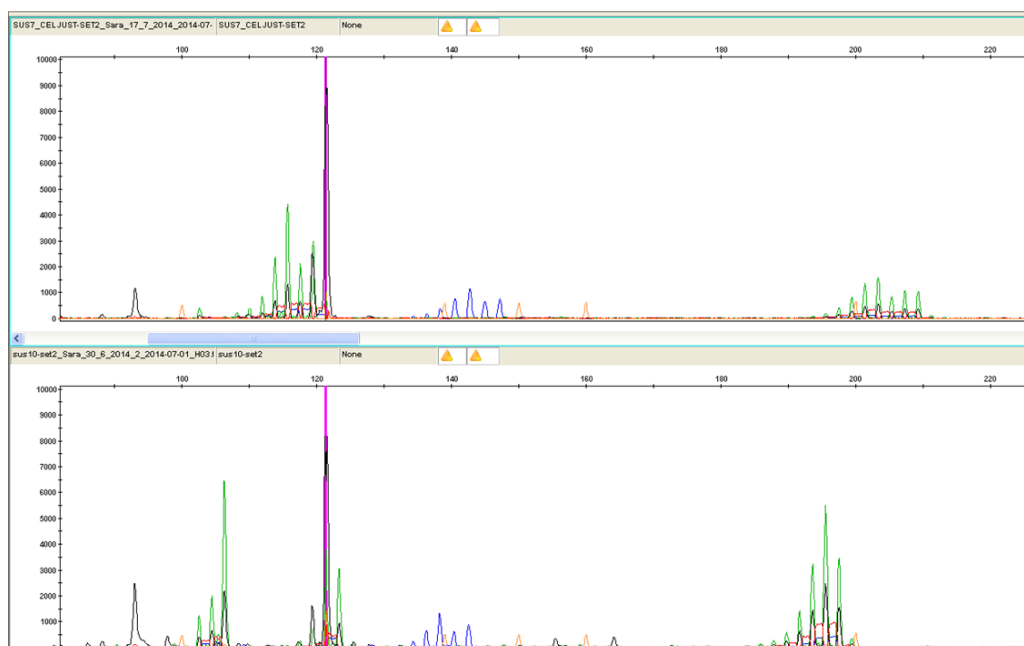
Preglednica 4: Izmerjene koncentracije in absorbanca vzorcev; \*redčitev na 50ng/uL

ŠTEVILKA VZORCA	ČISTOČA (A260/A280)	KONCENTRACIJA (ng/μL)	LOKACIJA TKIVA
SUS 1	1,83	31,20	mišica
SUS 2	1,89	349,45*	mišica
SUS 3	1,84	49,86	mišica
SUS 4	1,74	42,22	mišica
SUS 5	1,83	36,64	mišica
SUS 6	1,84	55,56	mišica
SUS 7	1,84	55,30	mišica
SUS 8	1,78	46,48	mišica
SUS 9	1,81	44,23	mišica
SUS 10	1,84	13,14	mišica
SUS 11	1,90	131,21*	mišica
SUS 12	1,76	27,09	mišica
SUS 13	1,91	65,12	mišica
SUS 14	1,86	19,08	mišica
SUS 15	1,86	22,03	mišica
SUS 16	1,95	35,10	mišica

SUS 1_ČELJUST	1,69	26,02	Tkivo pod zobom
SUS 2_1_ČELJUST	1,06	64,85	Tkivo pod zobom
SUS 2_2_ČELJUST	1,22	98,69*	Maščoba v čeljusti
SUS 3_ČELJUST	1,64	17,64	Notranjost zoba
SUS 4_ČELJUST	1,63	19,03	Tkivo pod zobom
SUS 5_ČELJUST	1,84	12,88	Tkivo pod zobom
SUS 6_ČELJUST	1,88	14,29	Tkivo pod zobom
SUS 7_ČELJUST	1,45	6,27	Tkivo pod zobom
SUS 8_ČELJUST	1,90	27,42	Tkivo pod zobom
SUS 9_ČELJUST	1,80	9,48	Tkivo pod zobom
SUS 10_ČELJUST	1,91	139,01*	Tkivo pod zobom

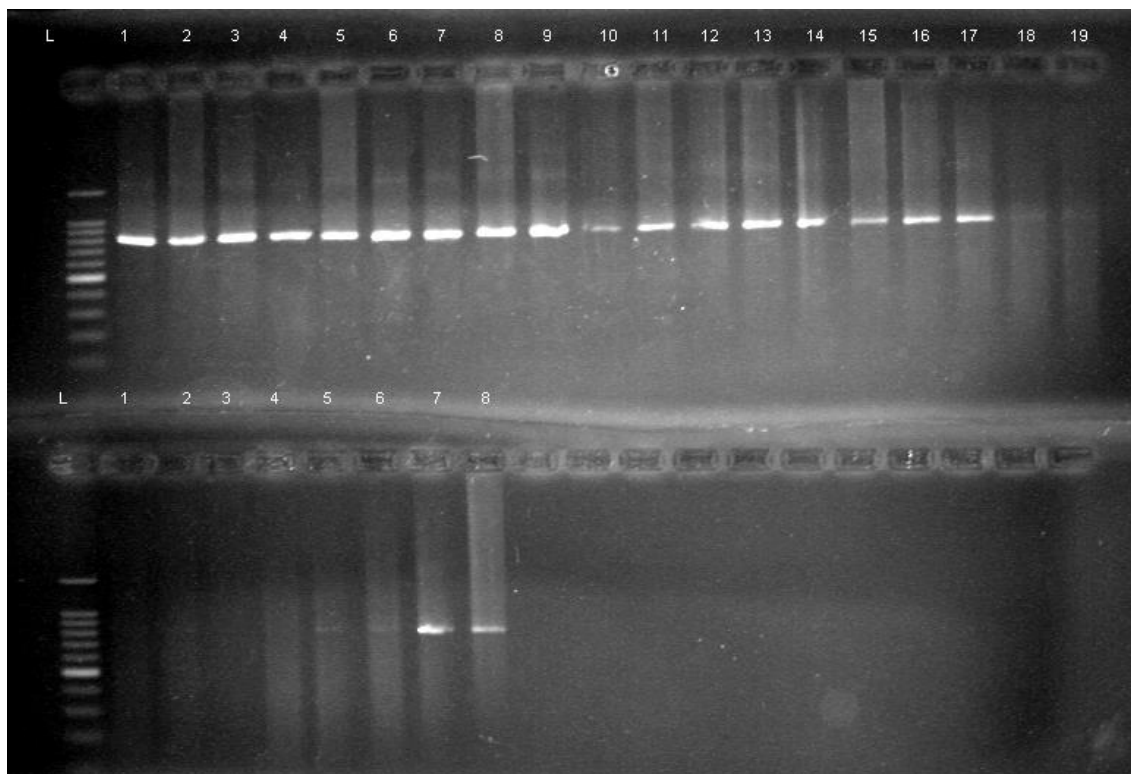
### 3.2 Uspešnost reakcije PCR

Uspešnost pomnoževanja DNA iz čeljusti je odvisna od številnih faktorjev kot so npr. količina obnovljive DNA, stopnja poškodovanosti DNA in prisotnost inhibicijskih agentov (Polanc in sod. 2011). Eden od pristopov za povečanje uspešnosti tipizacije degradirane DNA je pomnoževanje krajših odsekov DNA. Krajši kot je fragment, večja je verjetnost, da bo zaporedje nepoškodovano in se bo pravilno pomnožilo. Pri močno degradiranih DNA, se lahko pri genotipizaciji zgodi, da se DNA fragmentira na manjše lokuse. To pa najbolj prizadene velike lokuse (>200bp), ki se pri močno degradirani DNA po navadi izgubijo. Pri močno degradiranih vzorcih so uporabno orodje miniSTR, ki zmanjšajo dolžino fragmentov s tem, da pomaknejo začetne oligonukleotide bližje tarčni regiji (70-280bp) (Hughes-Stamm 2012). Posledica tega so izpadli aleli (angl. allele drop out) in izpadli lokusi (angl. locus drop out) (Hughes-Stamm 2012). Uspešnost posameznih vzorcev pri pomnožitvi mikrosatelitnih lokusov je bila tako pri vzorcih svežega tkiva kot pri vzorcih čeljusti dobra, kljub pričakovani močno degradirani DNA pri vzorcih čeljusti. Primer mikrosatelitnih lokusov je prikazan na sliki 4.



Slika 4: Prikaz mikrosatelitnih lokusov

Pomnožitev zaporedja gena za citokrom b je bila pri nekaterih vzorcih čeljusti neuspešna (slika 5), zaradi prevelike degradiranosti vzorcev, da bi se lahko pomnožili daljši fragmenti. Mikrosatelitni markerji so bili uspešnejši od citokroma b, saj pomnožujemo krajše fragmente zato je manj verjetnosti, da je na pomnoženem delu DNA degradirana. Za regijo D-loop smo dobili le dve delni sekvenci, zato je treba optimizacijo pomnoževanja ponoviti.



Slika 5: Agarozni gel citokroma b (prvih 16 vzorcev so tkivni vzorci, drugih enajst so trofejni vzorci)

### 3.3 Analiza mikrosatelitov in zaporedja gena citokroma b

Vse mikrosatelitne lokuse smo določili za vse testirane vzorce tkiva, pri vzorcih čeljusti pa je bil manj uspešen le vzorec 7 v setu 4. Poleg tega je najverjetneje pri sedmem vzorcu pri setu 1 in mešanici 5 ter pri vzorcu 9 v setu 4 prišlo do napake pri postopku, zato teh lokusov nismo uspeli amplificirati. Genotipizacija je bila uspešna tudi pri vzorcih čeljusti z nizko koncentracijo DNA in nizko absorbanco, kar kaže na uporabnost mikrosatelitov tudi pri nizkih količinah DNA. Genotipizacija je bila uspešna v 89 % vzorcev, kar kaže na uporabnost čeljusti kor vira DNA za genetske študije. Rezultati uspešnosti mikrosatelitnih markerjev so podrobneje prikazani v prilogi C. Primer mikrosatelitnih lokusov je prikazan na sliki 5. Za raziskave genetske strukture na rodu *Sus* so že v preteklosti uporabili trofeje kot vir DNA. Larson in sod. (2007) so za izolacijo DNA uporabili 57 vzorcev kosti in zobovja. Določali so zaporedje kontrolne regije mtDNA. Uspešno so pomnožili 23 vzorcev (40 %). Veliko večjo uspešnost so dobili pri vzorcih tkiva, dlak in krvi, kjer je bilo uspešno pomnoženih 243 vzorcev od 254 (96 %). Uspešnost pomnoževanja v naši raziskavi je bila znatno višja zaradi uporabe mikrosatelitnih markerjev, ki so uporabni tudi pri zelo degradiranih tkivih medtem, ko za analizo kontrolne regije potrebujemo daljše pomnožene fragmente.

Podobne raziskave z mikrosatelitnimi lokusi na degradiranih tkivih so bile v preteklosti že opravljene. Polanc in sod. (2012) so opravili genotipizacijo na muzejskih vzorcih Evrazijskega risa (*Lynx lynx*). Za izolacijo so uporabili tako vzorce strojenih kož, kot vzorce lobanj. Za genotipizacijo so avtorji uporabili 20 mikrosatelitnih lokusov, pri vzorcih lobanj so DNA izolirali iz nosne votline. Uspeh pomnoževanja pri vzorcih lobanje je bil 44 %. Razliko v uspešnosti lahko razložimo s tem, da je nosna votlina pod večjih vplivom zunanjih dejavnikov, ki lahko vplivajo na kontaminacijo in degradacijo DNA, kot pa zobna korenina, ki je pritrjena čvrsto v čeljusti. Naši rezultati potrjujejo, da je genotipizacija z mikrosateliti uspešna tudi pri močno degradiranem tkivu. Rezultati kažejo tudi na uporabnost čeljusti pri genetskih analizah. Določanje zaporedja gena za citokrom b je bilo uspešno pri enajstih vzorcih svežega tkiva od šestnajstih, pri vzorcih čeljusti pa je bil uspešen le en vzorec od šestih. Vsa pridobljena zaporedja so bila z orodjem BLAST identificirana kot vrsta divji prašič *Sus scrofa*. Rezultati pomnoževanje gena za citokrom b potrjujejo, da pri izolaciji ni prišlo do kontaminacije. Slabi rezultati pri sekvenciranju DNA čeljusti kažejo, da degradirana DNA ni primerna za pomnoževanje daljših fragmentov.

#### **4 ZAKLJUČEK**

Obdelane čeljusti so lahko pomemben vir genetskih informacij. Izolirano DNA iz čeljusti lahko uporabimo za analize z mikrosatelitnimi markerji, saj je analiza uspešna kljub nizkim koncentracijam in nečistosti vzorcev. Z mikrosatelitnimi markerji lahko analiziramo genetsko strukturo populacij, prav tako pa lahko posmrtno ugotavljamo spol odstreljenih živali. Vzorci lovskih trofej so manj primerni za analize zaporedja gena za citokroma b, saj zaradi močne degradiranosti DNA dobimo zelo slabe ter kratke odseke nukleotidnih zaporedij. Možnost uspešne izolacije DNA iz lovskih trofej je pomemben del varstvene genetike, saj je na voljo veliko materiala za analizo v zbirkah lovskih društev, lovcev in muzejev. S pomočjo genetskih analiz lahko pridobimo pomembne informacije s katerimi bodo lovci lažje upravljali z divjadjo.

## 5 LITERATURA

Albarella U. 2010. The Wild Boar in Extinctions and Invasions. V: A Social History of British Fauna. Windgather Press, Oxford:59-67.

Allendorf F.W., England P.R., Luikart G., Ritchie P.A., Ryman N. 2008. Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in ecology & evolution* 23: 327–37.

Barker JSF., Hill WG., Bradley D., Nei M., Fries R., Wayne RK. 1998. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Original Working Group Report. FAO, Rome.

Brown T.A. 2007. *Genomes 3*. Garland Science Publising. New york.

Castresana, J. 2001. "Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals". *Molecular Biology and Evolution* 18: 465–471.

Castro J.A., Picornell A., Ramon M. 1998. Mitochondrial DNA: a toll for populational genetics studies. *International Microbiology* 1: 327-332.

Chambers G.K., MacAvoy, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative biochemistry and physiology* 126: 455–76.

Chistiakov D.A., Hellemans B., Volckaert F.A.M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1–29.

Coltman D.W., O'Donoghue P., Jorgensson J.T., Hogg J.T., Strobeck C., Festa-Bianchet M. 2003. Undesirable evolutionary consequences of trophy hunting. *Nature* 426: 655-658.

Coltman D.W. 2008. Molecular ecological approaches to studying the evolutionary impact of selective harvesting in wildlife. *Molecular ecology* 17: 221–35.

Douzery E., Randi E. 1997. The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Mol Biol Evol.* 14: 1154–1166.

Esposti M.D., Devries S., Orimi M., Ghelli A. Patarnello T., Meyer A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et biophysica acta* 1143: 243-271.

Festa-bianchet M. 2003. Exploitative Wildlife Management as a Selective Pressure for Life-History Evolution of Large Mammals: 191–207.

Frankham R, Ballou JD and Briscoe DA. 2010. Introduction to conservation genetics, second edition. Cambridge University Press: Cambridge.

Frantz A.C., Zachos F. E., Kirschning J., Cellina S., Bertouille S., Mamuris Z., Koutsogiannouli E. A., Burke T. 2013. Genetic evidence for introgression between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Belgium and Luxembourg: a comparative

approach with multiple marker systems. *Biological Journal of the Linnean Society* 110: 104–115.

Gaytmenn, R., Sweet D. 2003. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *J Forensic Sci*: 48: 622-625.

Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll S.B. 2008. Introduction to genetic analysis. W.H. Freeman and Company. New York.

Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Leger P., Lepais O., Lepoittevin., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular ecology resources* 11: 591–611.

Harris R.B., Wall W.A., Allendorf F.W., 2002. Genetic consequences of hunting: what do we know and what should we do? *Wildlife Society Bulletin* 30: 634–643.

Hughes-Stamm S.R. 2012. DNA Typing Methods for Highly Degraded Samples. ePublications@bond, Faculty of Health Sciences and Medicine.

Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C. 1991. Evolution of the Cytochrome b Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128–144.

Jaarola M., Searle J.B. 2002. Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 11: 2613-2621.

Jaarola M., Martínková N., Gündüz I., Brunhoff C., Zima J., Nadachowski A., Amori G., Bulatova N.S., Chondropoulos B., Fraguadakis-Tsolis S., González-Esteban J., López-Fuster M.J., Kandaurov A.S., Kefelioglu H., Mathias M.D., Villate I., Searle J.B. 2004. Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae, Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 33: 647–663.

Jerina K. 2006. Vplivi okoljskih dejavnikov na prostorsko razporeditev divjega prašiča (*Sus scrofa* L.) v Sloveniji. *Zbornik gozdarstva in lesarstva* 81: 3-20.

Kalia K.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A K. 2010. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309–334

Kryštufek B. 1991. Sesalci Slovenije. Prirodoslovni muzej Slovenije. Ljubljana.

Krže B. 1982. Divji prašič. Lovska zveza Slovenije. Ljubljana.

Krže B. 2005. Vid divjega prašiča je boljši kot si mislimo! *Lovec* 88: 468-469.

Leskovic B., Pičulin I. 2012. Divjad in lovstvo. Lovska zveza Slovenije. Ljubljana.

Meyer A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. 2: 1–38.



Milner J.M., Nilsen E.B., Andreassen H.P. 2007. Demographic side effects of selective hunting in ungulates and carnivores. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology* 21: 36–47.

Oliver, W., Leus, K. 2008. *Sus scrofa*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 17 May 2014.

Polanc P., Sindičić M., Jelenčič M., Gomerčič T., Kos I., Huber Đ. 2012. Genotyping success of historical Eurasian lynx (*Lynx lynx* L.) samples. *molecular Ecology Resources* 12: 293-298.

Pokorny B., Savinek K., Zaluberšek M., Poličnik H., Kink C., Konjević D., Severin K., Slavica A., Jerina K., Jelenko I. 2011. Čeljusti divjih prašičev kot dragocen vir informacij o biologiji vrste. V: Poličnik H., Pokorny B. (ur.). *Divji prašič: zbornik prispevkov 2. slovensko-hrvaškega posveta z mednarodno udeležbo o upravljanju z divjadjo*. Velenje, ERICo: 12-24.

Pokorny B., Jelenko I. 2013. Ekosistemska vloga, pomen in vplivi divjega prašiča (*Sus scrofa* L.). *Zlatorogov zbornik* 2: 2-30

Poličnik H., Pokorny B., Bužan V.E., Kryštufek B. 2011. Spreminjanje spola uplenjenih/izločenih parklarjev-le čemu? *Lovec* 94: 75-76.

Promega: Wizard genomic DNA purification kit technical manual: [www.promega.com](http://www.promega.com). (4.7.2014).

Scandura M., Iacolina L., Crestanello B., Pecchioli E., Di Benedetto M.F., Russo V., Davoli R., Apollonio M., Bertorelle G. 2008. Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable? *Molecular ecology* 17: 1745–62.

Scandura M., Iacolina L., Apollonio M. 2011. Genetic diversity in the European wild boar *Sus scrofa*: phylogeography, population structure and wild x domestic hybridization. *Mammal Review* 41: 125–137.

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

Vernesi C., Crestanello B., Pecchioli E., Tartari D., Caramelli D., Hauffe H., Bertorelle G. 2003. The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): A microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12: 585-59.

# PRILOGE

**Priloga A:** Podrobni podatki o izoliranih vzorcih

ŠT.VZORCA	IDENT. ŠT.	LOVIŠČE	DATUM ODVZEMA	LOVSKO UPRAVLJALNO OBMOČJE	KRAJ	STRUKTURNI RAZRED	STAROST (v letih)	TEŽA BRUTO (kg)	LOKACIJA TKIVA
SUS 1		Fajti hrib	8.6.2011	Primorsko lovsko upravljalno območje		merjasec		73	mišica
SUS2		Gabrovec	17.11.2012			svinje	2+		mišica
SUS3		Fajti hrib	1.6.2011	Primorsko lovsko upravljalno območje	Renče	mladiči moškega spola	0+	27	mišica
SUS4		Tabor-Sežana	10.6.2011	Primorsko lovsko upravljalno območje	Gropada	merjasec	3+	48	mišica
SUS5		Fajti hrib	9.6.2011	Primorsko lovsko upravljalno območje		merjasec		66	mišica
SUS6		Fajti hrib	1.6.2011	Primorsko lovsko upravljalno območje		merjasec	2+	59	mišica
SUS7		Gaberk-Divača	2011	Primorsko lovsko upravljalno območje					mišica
SUS8		Gaberk-Divača	2011	Primorsko lovsko upravljalno območje					mišica
SUS9		Gaberk-Divača	2011	Primorsko lovsko upravljalno območje					mišica
SUS10	brez podatkov								mišica
SUS11	brez podatkov								mišica
SUS12	EL 1AYH	Oljka-Šmartno	21.12.2013	Savinjsko-Kozjansko lovsko upravljalno območje		mladiči ženskega spola	0+	44	mišica
SUS13	EL 1AYC	Oljka-Šmartno	21.12.2013	Savinjsko-Kozjansko lovsko upravljalno območje		svinje	3+	98	mišica
SUS14	EL 1AYE	Oljka-Šmartno	21.12.2013	Savinjsko-Kozjansko lovsko upravljalno območje		lanščaki ženskega spola	1+	66	mišica

SUS15	EC 13LK	Gornji Grad	24.6.2013	Kamniško-Savinjsko lovsko upravljalno območje		mladiči ženskega spola	0+	31	mišica
SUS16	EC 13LJ	Gornji Grad	19.6.2013	Kamniško-Savinjsko lovsko upravljalno območje		mladiči ženskega spola	0+	31	mišica
SUS1 ČELJUST	20/2013	Laze	6.1.2013	Zasavsko lovsko upravljavsko območje	Gostinca	mladiči ženskega spola	0+	35	pod zobom
SUS2_1 ČELJUST	53/2012	Tomišelj	25.9.2012	Notranjsko lovsko upravljavsko območje	Virje	lanščaki moškega spola	1+	71	pod zobom
SUS2_2 ČELJUST	53/2012	Tomišelj	25.9.2012	Notranjsko lovsko upravljavsko območje	Virje	lanščaki moškega spola	1+	71	maščoba v čeljusti
SUS3 ČELJUST	1205/31/08	Anhovo	24.4.2008	Zahodno visoko kraško, lovsko upravljavsko območje	Plave	lanščaki ženskega spola	1+	28	notranjost zoba
SUS4 ČELJUST	1201/69/08	Kanal	9.7.2008	Zahodno visoko kraško, lovsko upravljavsko območje	Drašček	lanščaki moškega spola	1+	34	pod zobom
SUS5 ČELJUST	0519/4/08	Brkini	10.5.2008	Primorsko lovsko upravljavsko območje	Pod Račice	mladiči moškega spola	0+	30	pod zobom
SUS6 ČELJUST	217/2013	Laze	15.12.2013	Zasavsko lovsko upravljavsko območje	gostinca	mladiči ženskega spola	0+	35	pod zobom
SUS7 ČELJUST	1205/99/08	Anhovo	19.7.2008	Zahodno visoko kraško, lovsko upravljavsko območje	Vodice	mladiči ženskega spola	0+	15	pod zobom
SUS8 ČELJUST	0502/90/08	Trstelj-Kostanjevica	2.8.2008	Primorsko lovsko upravljavsko območje	Kostanjevica	mladiči moškega spola	0+	14	pod zobom
SUS9 ČELJUST	225/2013	Laze	25.12.2013	Zahodno visoko kraško, lovsko upravljavsko območje	gostinca	svinje	2+	87	pod zobom
SUS10 ČELJUST	77/2012	Tomišelj	20.10.2012	Notranjsko lovsko upravljavsko območje	Virje	merjasci	2+	127	pod zobom

**Priloga B:** Podatki o mikrosatelitnih lokusih

Začetni oligonukleotid	Multiplex	Kromosom	Barvilo	Alelni razpon (bp)	Smer	Sekvenca začetnega oligonukleotida (5'-3')	Vir	Temperatura (°C)
SW72	3	3	Ned	95-111	F	ATC AGA ACA GTG CGC CGT	FAO	58
					R	TTT GAA AAT GGG GTG TTT CC		
S026		16	Fam	86-120	F	AAC CTT CCC TTC CCA ATC AC	FAO	54
					R	CAC AGA CTG CTT TTT ACT CC		
S355	1	15	Ned	230-270	F	TCT GGC TCC TAC ACT CCT TCT TGA TG	FAO	55
					R	TTG GGT GGG TGC TGA AAA ATA GGA		
S215	3	13	Hex	131-172	F	TAG GCT CAG ACC CTG CTG CAT	FAO	60
					R	TGG GAG GCT GAA GGA TTG GGT		
SW857	4	14	Fam	123-157	F	TGA GAG GTC AGT TAC AGA AGA CC	FAO	58
					R	GAT CCT CCT CCA AAT CCC AT		
SW1492	1	4	Fam	110-128	F	CAG ACA ATG CAA AAG CTT TCC	USDA	52
					R	TAA CCA GGA TTT CAG TGG ATT C		
SW2021	2	3	Hex	94-142	F	GCG ACA CAT GAG ATA AAA CTG C	USDA	65
					R	AAT CCA CAG GCT TAC TCA GAT G		
SW2496	2	14	Hex	182-232	F	TAT AGC ATT TGG ATG TTC CAC G	USDA	52
					R	GCC CAA ATA AAG TGG TCT ATG C		
SW2532	1	3	Hex	174-214	F	TTC GAC ACA CAG GTT TTA GGG	USDA	58
					R	GTG GAG GCT TCT GAA ATG TAC C		
SW461	2	2	Fam	118-154	F	GTC CAG GGC AGT CTT GAG AG	USDA	62
					R	GTC TCT CTC CCT CTC CTC CC		
S090		12	Fam	226-250	F	CCA AGA CTG CCT TGT AGG TGA ATA	FAO	62->55
					R	GCT ATC AAG TAT TGT ACC ATT AGG		
IGF1		5	Fam	185-211	F	GCT TGG ATG GAC CAT GTT G	FAO	58->55
					R	CAT ATT TTT CTG CAT AAC TTG AAC CT		
					R	CAA AAA AGG CAA AAG ATT GAC A		

S155	4	1	Hex	145-162	F	TGT TCT CTG TTT CTC CTC TGT TTG	FAO	55
					R	AAA GTG GAA AGA GTC AAT GGC TAT		
SW24	4	17	Ned	75-117	F	CTT TGG GTG GAG TGT GTG C	FAO	63->55
					R	ATC CAA ATG CTG CAA GCG		
SW951	2	10	Ned	106-133	F	TTT CAC AAC TCT GGC ACC AG	FAO	58
					R	GAT CGT GCC CAA ATG GAC		

**Priloga C:** Rezultati mikrosatelitnih lokusov

OZNAKA VZORCA	KONCENTRACIJA (ng/μL)	ČISTOČA (A260/A280)	SETI	LOKUS	USPEŠNOST LOKUSA	OZNAKA VZORCA	KONCENTRACIJA (ng/μL)	ČISTOČA (A260/A280)	SETI	LOKUS	USPEŠNOST LOKUSA
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET1	SW2532	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET1	SW2532	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET1	SW1492	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET1	SW1492	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET1	S355	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET1	S355	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET2	SW461	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET2	SW461	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET2	SW2496	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET2	SW2496	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET2	SW951	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET2	SW951	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET2	SW2021	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET2	SW2021	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET3	S251	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET3	S251	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET3	SW72	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET3	SW72	uspešen

SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET4	SW857	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET4	SW857	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET4	S155	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET4	S155	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	SET4	SW24	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	SET4	SW24	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	ZMES 5	S090	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	ZMES5	S090	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	ZMES 6	IGF1	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	ZMES6	IGF1	uspešen
SUS2_2 ČELJUST	98,694	1,218	ZMES 7	S026	uspešen	SUS8 ČELJUST	27,418	1,903	ZMES7	S026	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET1	SW2532	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET1	SW2532	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET1	SW1492	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET1	SW1492	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET1	S355	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET1	S355	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET2	SW461	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET2	SW461	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET2	SW2496	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET2	SW2496	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET2	SW951	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET2	SW951	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET2	SW2021	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET2	SW2021	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET3	S251	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET3	S251	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET3	SW72	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET3	SW72	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET4	SW857	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET4	SW857	napaka pri postopku

SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET4	S155	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET4	S155	napaka pri postopku
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	SET4	SW24	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	SET4	SW24	napaka pri postopku
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	ZMES 5	S090	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	ZMES5	S090	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	ZMES 6	IGF1	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	ZMES6	IGF1	uspešen
SUS5 ČELJUST	12,875	1,836	ZMES 7	S026	uspešen	SUS9 ČELJUST	9,482	1,798	ZMES7	S026	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET1	SW2532	napaka pri postopku	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET1	SW2532	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET1	SW1492	napaka pri postopku	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET1	SW1492	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET1	S355	napaka pri postopku	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET1	S355	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET2	SW461	uspešen	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET2	SW461	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET2	SW2496	uspešen	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET2	SW2496	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET2	SW951	uspešen	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET2	SW951	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET2	SW2021	uspešen	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET2	SW2021	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET3	S251	uspešen	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET3	S251	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET3	SW72	uspešen	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET3	SW72	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET4	SW857	slabši	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET4	SW857	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET4	S155	slabši	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET4	S155	uspešen



SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	SET4	SW24	slabši	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	SET4	SW24	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	ZMES 5	S090	napaka pri postopku	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	ZMES5	S090	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	ZMES 6	IGF1	uspešen	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	ZMES6	IGF1	uspešen
SUS7 ČELJUST	6,268	1,449	ZMES 7	S026	uspešen	SUS10 ČELJUST	139,006	1,906	ZMES7	S026	uspešen