

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

OPTIMIZACIJA METODE IZOLACIJE IN  
POMNOŽEVANJA DNA IZ KOSTNIH TKIV  
PARKLJARJEV:  
VKLJUČEVANJE PRINCIPOV ODGOVORNE  
ZNANOSTI V RAZISKAVE POPULACIJSKE  
GENETIKE

SANDRA POTUŠEK

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Optimizacija metode izolacije in pomnoževanja DNA iz kostnih  
tkiv parkljarjev: vključevanje principov odgovorne znanosti v  
raziskave populacijske genetike**

(Optimization of DNA extraction and amplification from ungulates bones  
tissue: responsible research approach to population genetics research)

Ime in priimek: Sandra Potušek

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentorica: izr. prof. dr. Elena Bužan

Somentorica: asist. Felicita Urzi

Koper, maj 2019

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Sandra POTUŠEK

Naslov magistrskega dela: Optimizacija metode izolacije in pomnoževanja DNA iz kostnih tkiv parkljarjev: vključevanje principov odgovorne znanosti v raziskave populacijske genetike

Kraj: Koper

Leto: 2019

Število listov: 56

Število slik: 6

Število tabel: 4

Število prilog: 4

Št. strani prilog: 5

Število referenc: 71

Mentor:izr. prof. dr. Elena Bužan

Somentor: asist. Felicita Urzi

UDK: 575.17(043.2)

Ključne besede: izolacija DNA, kosti, mikrosateliti, odgovorno raziskovanje in inovacije.

Izveček: Kost je rastoče tkivo, sestavljeno predvsem iz anorganskih mineralnih soli in kolagena, ki vsebujejo sorazmerno majhno število celic. Tovrstni biološki material predstavlja izziv za molekularne biologe zaradi težavnosti izolacije kakovostne DNA ter časovne potratnosti izolacije in visokih stroškov. Delo s kostmi zahteva prilagoditev postopkov izolacije z uvedbo predpriprave vzorcev, uporabo ustreznih postopkov razgradnje tkiva in postopkov izolacije DNA. Razvoj metod molekularne ekologije, ki temelji na principih odgovorne znanosti, pomeni, da rezultate raziskav povezujemo z vrednotami, potrebami in pričakovanji družbe. Sodobni pristopi na področju molekularne ekologije v luči odgovornega raziskovanja in inovacij (RRI) predstavljajo možnost za vključevanje rezultatov populacijske genetike v strategije ohranjanja in trajnostnega upravljanja z divjadjo. Posebno, kadar govorimo o lovnih vrstah, je sodelovanje med različnimi deležniki, kot so upravljavci, znanstveniki, odločevalci in tudi javnost, ključ do trajnostnega upravljanja s populacijami. Namen magistrskega dela je razviti in optimizirati metodo za uspešno izolacijo DNA iz starih in svežih kosti z uporabo kemikalij in opreme, ki so na voljo v večini molekularnih laboratorijev. V magistrskem delu smo uporabili 108 vzorcev svežih in starih kosti štirih različnih vrst parkljarjev. Pred izolacijo molekule DNA iz kosti smo optimizirali demineralizacijski postopek s ciljem zvišanja količine in kakovosti izolirane DNA. Količino in kakovost izolirane DNA smo ocenili z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času na osnovi SYBR Green barvila. Z opravljenimi analizami smo pokazali, da so lahko vzorci kostnega tkiva dober vir DNA, če uporabimo optimizirano metodo izolacije DNA, ki vključuje demineralizacijski postopek.

### Key words documentation

Name and SURNAME: Sandra POTUŠEK

Title of the thesis: Optimization of DNA extraction and amplification from ungulates bones tissue: responsible research approach to population genetics research

Place: Koper

Year: 2019

Number of pages: 56                      Number of figures: 6                      Number of tables: 4

Number of appendix: 4                      Number of appendix pages: 5

Number of references: 71

Mentor: Assoc. Prof. Elena Bužan, PhD

Co-Mentor: Assist. Felicita Urzi

UDK: 575.17(043.2)

Keywords: DNA isolation, bones, microsatellites, responsible research and innovation

Abstract: Bone tissue is composed primarily of inorganic mineral salts and collagen, which contain a relatively low number of cells. Such biological material has been so far a challenge for molecular biologists, due to the difficulty of high-quality DNA isolation, the time-consumption and high costs. Working with bones requires adaptation of isolation procedures by introducing pre-preparation of samples, using appropriate tissue degradation and DNA isolation protocols. The development of molecular ecology methods based on the principles of responsible science means that the results of research are linked to the values, needs and expectations of society. Modern approaches in the field of molecular ecology in the light of responsible research and innovation (RRI) provide an opportunity to integrate the results of population genetics into strategies for conservation and sustainable management of game species. Especially in this case, cooperation between different stakeholders such as managers, scientists, decision makers and the public represent key issues to sustainable management of populations. The purpose of the master's thesis is to develop and optimize the method for successful DNA isolation from old and fresh bones, using the laboratory chemicals and tools available in most molecular laboratories. For the analysis, we used 108 samples of fresh and old bones of four different ungulates. The demineralization process was developed prior to the isolation of the DNA molecule from the bones, with the aim to increase the isolated DNA amount and quality. Quantity and quality of isolated DNA was evaluated using Sybergreen chemistry by qPCR reaction. The analyzes carried out showed that bone tissue samples can be a good source of DNA if an optimized DNA isolation method is used with a demineralization process. The results of analyzes of DNA concentrations show that, in order to achieve sufficiently high DNA concentrations of sufficient quality for further analysis, it is essential to use the demineralization process.

## ZAHVALA

*...Tam, kjer se križajo potrebe sveta in tvoji talenti, tam je mesto tvojega poklica ...*

(Aristotel)

Ob iskanju svoje poti sem imela neprecenljivi vodnici, ki sta mi kazali pot, mi pomagali, ko sem zašla, me spodbujali in s svojim zgledom navdihovali. Zato hvala mentorici in vzornici izr. prof. dr. Eleni Bužan ter somentorici in prijateljici asist. Feliciti Urzi za ves vložen trud in znanje ter vse lepe trenutke v laboratoriju in izven njega. Zaradi vaju si želim postati več.

Hvala sodelavcem in članom konzorcija projekta StarBios2, ki so mi pokazali pomen odgovorne znanosti, ki bo moje vodilo tudi v nadaljnji karieri. Naloga je bila opravljena v okviru projekta StarBios 2, financiranega iz programa Obzorja 2020 pod št. 709517.

Brez vzorcev bi bila ta naloga zelo kratka, zato se zahvaljujem Lovski zvezi Slovenije, predvsem pa izr. prof. dr. Boštjanu Pokornemu in izr. prof. dr. Nikici Špremu iz Fakultete za agronomijo, Univerze v Zagrebu, za vzorce starih in svežih kosti, ki so bili temelj te naloge.

Iskrena zahvala gre tudi članoma komisije, izr. prof. dr. Ireni Maček in doc. dr. Matjažu Hladniku, ki sta magistrsko delo pregledala in ga s svojimi komentarji še izpopolnila.

Urška in Tanja, hvala za vse debate in izzive predvsem pa moralno podporo in spodbudo pri zaključku študija. Vsa zamujena druženja nadomestimo v kratkem.

Predvsem pa hvala moji družini in soprogu Mateju za neskončno potrpežljivost, vse spodbudne besede in podporo ob moji študijski Odisejadi.

Sandra (Hasić) Potušek

*Delo posvečam soprogu Mateju. Včasih nam zmanjka zgolj en dan!*

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1	ODGOVORNO RAZISKOVANJE IN INOVACIJE.....	1
1.1.1	<b>Strategija razvoja RRI na področju bioznanosti na UP .....</b>	<b>2</b>
1.2	IZOLACIJA MOLEKULE DNA IZ KOSTI.....	4
1.2.1	<b>Problematika izolacije molekule DNA iz kosti .....</b>	<b>5</b>
1.2.2	<b>Ocena kakovosti izolirane DNA iz kostnega tkiva.....</b>	<b>5</b>
1.3	MOLEKULARNA EKOLOGIJA .....	7
1.3.1	<b>Molekularna ekologija in monitoring prostoživečih živali .....</b>	<b>7</b>
1.3.2	<b>Uporaba molekularnih genetskih markerjev pri strategijah upravljanja z vrsto .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE .....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>13</b>
3.1	VZORCI .....	13
3.2	DEMINERALIZACIJSKI POSTOPEK.....	14
3.3	IZOLACIJA MOLEKULE DNA .....	15
3.4	DNA KONCENTRACIJA IN KVANTIFIKACIJA .....	17
3.5	ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV .....	19
3.6	STATISTIČNA ANALIZA.....	20
3.6.1	<b>Koncentracija DNA .....</b>	<b>20</b>
3.6.2	<b>Učinkovitost pomnoževanja DNA .....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>21</b>
4.1	ANALIZA KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNA.....	21
4.1.1	<b>Primerjava koncentracije DNA med kiti in vrsto biološkega vzorca .....</b>	<b>22</b>
4.2	FRAGMENTNA ANALIZA MIKROSATELITOV .....	26

<b>5</b>	<b>DISKUSIJA</b> .....	<b>27</b>
5.1	KONCENTRACIJE DNA.....	28
5.2	USPEŠNOST POMNOŽEVANJA FRAGMENTOV DNA.....	29
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČEK</b> .....	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA IN VIRI</b> .....	<b>33</b>

## **KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Število in tip vzorcev uporabljenih v različnih metodah izolacije DNA.....	17
Preglednica 2: Temperaturni pogoji za qPCR .....	18
Preglednica 3: Izbrani mikrosatelitni lokusi analizirani s qPCR na napravi Lightcycler 96 in s fragmentno analizo na sekventarju SeqStudio .....	19
Preglednica 4: Koncentracije DNA, Cq vrednosti in njihovo razmerje ter uspešnost pomnoževanja fragmentov Cq200.....	25



## KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Shematski prikaz osnovnih ključev, ki opisujejo osnovne cilje projekta StarBios2	4
Slika 2: Prikaz uporabe genetskega monitoringa za določitev opredelitev uporabe v študijah populacijske dinamike .....	11
Slika 3: Primerki uporabljenih vzorcev. ....	13
Slika 4: Prikaz vzorčnega mesta za odvzem tkiva na primeru trofeje, lobanja gamsa.....	14
Slika 5: Priprava kostnih vzorcev za izolacijo .....	15
Slika 6: Uporabljena izolacijska kita PeqLab (levo) in QIAmp (desno).....	16

## **KAZALO PRILOG**

- PRILOGA A**            Rezultati meritev koncentracije in čistoče DNA na spektrofotometru Epoch.
- PRILOGA B**            Prikaz spektralnih krivulj na primeru vzorcev divjega prašiča (tkivo, sveža kost, stara kost)
- PRILOGA C**            Grafični prikaz analize talilne temperature in kvantifikacijskih krivulj qPCR reakcije na primeru fragmenta OarFCR304 za vrsto Rupicapra rupicapra.
- PRILOGA D**            Enačba in grafični prikaz standardne krivulje izpeljanih verižnih reakcij s polimerazo v realnem času

## SEZNAM KRATIC

<b>RRI</b>	odgovorna znanost (raziskovanje) in inovacije (angl. Responsible research and innovation)
<b>ERC</b>	Evropski raziskovalni svet (angl. European Research Council)
<b>UP</b>	Univerza na Primorskem
<b>STARBIOS2</b>	strukturno preoblikovanje za odgovorne bioznanosti (angl. Structural Transformation to Attain Responsible BIOSciences)
<b>UP FAMNIT</b>	Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>OSLIS</b>	osrednji slovenski lovsko-informacijski sistem
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>EDTA</b>	etilendiamin tetraacetna kislina
<b>Mg</b>	magnezij
<b>Ca</b>	kalcij
<b>DTT</b>	ditiotieol
<b>qPCR</b>	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. Quantitative polymerase chain reaction)
<b>SNP</b>	polimorfizem posameznih nukleotidov
<b>mtDNA</b>	mitohondrijska DNK
<b>MSAT</b>	mikrosateliti
<b>Cq</b>	kvantifikacijski cikel, kjer reakcija doseže mejo detekcije
<b>AFLP</b>	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov
<b>He</b>	pričakovana heterozigotnost
<b>Ho</b>	opažena heterozigotnost
<b>bp</b>	bazni par
<b>A260</b>	absorbanca pri valovni dolžini 260 nm
<b>A280</b>	absorbanca pri valovni dolžini 280 nm
<b><math>\chi^2</math></b>	test hi-kvadrat

## 1 UVOD

### 1.1 ODGOVORNO RAZISKOVANJE IN INOVACIJE

Odgovorno raziskovanje in inovacije (angl. Responsible Research and Innovation – RRI) je medsektorska tema v okvirnem programu Evropske komisije Obzorje 2020. Cilj RRI je nasloviti največje izzive našega časa na področju znanosti in pričeti s spodbujanjem pametne, trajnostne tehnološke rasti v Evropi. Na poti odgovornega razvoja družbeni akterji sodelujejo skozi celoten proces raziskav in inovacij z namenom usklajevanja procesa raziskovanja z vrednotami, potrebami in pričakovanji evropske družbe. RRI je ambiciozen izziv, ki temelji na potrebah družbe in vključuje vse družbene akterje z vključujočimi udeleženi pristopi. Na področju bioznanosti se RRI dotika izzivov, povezanih z raziskavama in tehnološkim razvojem na področju zdravja, hrane, ohranjanja in rabe biotske raznovrstnosti, razvojem zdravil itd.

Razvoj znanosti in tehnologije lahko bistveno vpliva na družbo in kakovost življenja, hkrati pa ustvarja nove etične dileme in nova tveganja, povezana z uporabo inovacij. Usmeritve za izvajanje odgovornega raziskovalnega dela in inovacij postavljajo v ospredje tudi etična vprašanja, povezana s temeljnimi protislovji v razumevanju vloge znanosti – naj bo znanost cilj ali sredstvo, naj ima prednost dobrobit posameznika ali družbe (Owen in sod., 2013).

Von Schomberg je leta 2011 RRI definiral kot: »Odgovorno raziskovanje in inovacije je pregleden, interaktiven proces, pri katerem so različni družbeni akterji, raziskovalci in inovatorji medsebojno odvisni ter v svoje delo vključujejo etična pravila in dileme, pri čemer vključujejo družbeno vpletenost inovacijskega procesa in znanosti (da bi omogočili ustrezno vključitev znanstvenega in tehnološkega napredka v naši družbi)« (Von Schomberg, 2011).

V raziskovalni praksi bi moral RRI vključevati družbene akterje kot končne porabnike, kar dolgoročno zagotavlja lažji dostop do znanstvenih rezultatov in podpira področje enakih možnosti med spoloma, kakor tudi etična načela, povezana z raziskovalno poštenostjo. Evropski raziskovalni svet (angl. European Research Council – ERC) je za odgovorno raziskovanje izpostavil pet ključnih točk, in sicer: izobraževanje, etiko, odprti dostop do podatkov in raziskav, enake možnosti med spoloma ter vpetost raziskovalnih inštitucij v okolje, ki so nujne pri razvoju RRI.

ERC je zaznal potrebo po vključitvi principov RRI tudi na področje bioznanosti, ki se od ostalih znanstvenih disciplin loči po svoji specifičnosti (npr. delo z občutljivimi podatki pacientov, etični vidiki odvzema živali iz okolja za namene raziskav, dostop do genetskih podatkov posameznikov, farmakološke in biotehnološke raziskave itd.). Koncept odgovorne bioznanosti je tako nastal kot odgovor na številne pereče izzive, s katerimi se sooča današnja

družba na področju bioloških ved. Na področju varovanja narave naj bi bila odgovornost družbe z etičnih vidikov usmerjena predvsem v reševanje posledic človeških dejavnosti na obstoj in življenje prostoživečih rastlin in živali in upad biotske raznovrstnosti, kot so drobljenje in izguba habitatov, vnos tujerodnih in invazivnih vrst, onesnaževanje in prekomerna raba naravnih virov (Hautier in sod., 2015). Naraščanje zavedanja o pomenu ohranjanja biotske raznovrstnosti za obstoj človeštva spodbuja vlade držav in civilno družbo k ukrepanju.

Reševanje problematike gre predvsem v smer oblikovanja novih naravovarstvenih strategij, ki bi morale poleg opredelitve, kako pristopiti k ohranjanju biotske raznovrstnosti, trajnostni rabi njenih sestavin ter poštenu in pravični delitvi koristi genskih virov, vključevati principe odgovorne znanosti na področju varstvene biologije. Varstvena biologija, kot veja bioznanosti, ki vključuje tudi molekularno ekologijo, je znanost o biodiverziteti in o njeni trajnostni rabi za potrebe človeštva. Zato morajo cilj odgovornega raziskovanja v varstveni biologiji zajemati razvoj ustreznih orodij, ki temeljijo na etičnosti v raziskovanju, spodbujajo enake možnosti in družbeno vpetost, izboljšujejo izobraževalne procese in prenos znanja ter omogočajo odprt dostop do raziskav in podatkov ter s tem pripomorejo k temeljitejšemu reševanju problematike (Colizzi in sod., 2018).

### **1.1.1 Strategija razvoja RRI na področju bioznanosti na Univerzi na Primorskem**

Univerza na Primorskem kot aktiven partner projekta StarBios 2, financiranega znotraj Obzorja 2020 – Integracija družbe v znanost in inovacije, pripravlja in izvaja akcijski načrt za doseganje strukturne spremembe odgovornega raziskovanja na področju bioznanosti (v največji meri na področju molekularne ekologije). Akcijski načrt sledi smernicam ERC in si s prepletom prej naštetih točk prizadeva za izboljšanje znanstvenoraziskovalnega in pedagoškega dela na Fakulteti za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije (UP FAMNIT), ki vključuje oddelke s področja bioloških ved.

Aktivnosti, predvidene v projektu, vključujejo intenzivno sodelovanje med raziskovalnimi oddelki in različnimi družbenimi akterji (kot so nevladne organizacije, gospodarstvo, oblikovalci politik, javnost ...), kar bo pripomoglo k boljši prepoznavnosti vloge odgovornega raziskovanja na področju molekularne ekologije, varstvene biologije, naravovarstva in okoljevarstva (npr. varovanje ogroženih vrst, vplivi divjih odlagališč ...). O pomenu RRI se izobražujejo in usposabljujejo študenti, raziskovalci kakor tudi lokalno prebivalstvo in ostali pomembni deležniki, kar zagotavlja boljšo dostopnost do podatkov, raziskav in vsebin z aktivnim izvajanjem politike odprtega dostopa in obenem skrbi za enake možnosti med spoloma ter temelji na etiki raziskovalnega in pedagoškega dela. Magistrsko delo v vsa poglavja vključuje odgovorno raziskovanje z omembo RRI za področje molekularne ekologije predvsem s prepletom ključnih točk, ki se nanašajo na etiko

izobraževanja, odprtega dostopa do podatkov in vključitve različnih deležnikov v proces, uporabe molekularno-genetskih študij. S pregledom dosedanjih raziskav bomo prikazali uporabnost molekularno genetskih podatkov (rezultatov) pri delu z biološkim materialom, pridobljenim z rednim letnim odstrelom divjadi.

Izboljšava metode izolacije molekule DNA iz kostnih vzorcev (spodnje čeljustnice parkljarjev) omogoča uporabo materiala, ki ga lovske družine zbirajo pri rednem letnem odstrelu divjadi kot dokazilo o pravilnem odlovi. Ti vzorci so pridobljeni po načelih trajnostnega upravljanja z dovoljenjem Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS.

Zelo dobro preteklo in sedanje sodelovanje z upravljavci populacij in lovskimi organizacijami zagotavlja dostopnost velikega vzorca čeljustnic zaradi intenzivnega upravljanja v sklopu rednih aktivnosti, predpisanih s strani pristojnih vladnih institucij Republike Slovenije. Osrednji slovenski lovsko-informacijski sistem (OSLIS) zagotavlja takojšen in stalen dostop do velike količine podatkov + >600.000 osebkov prostoživečih parkljarjev in zveri, ki so bili odstreljeni oz. so izgubili življenje zaradi drugih vzrokov (npr. povozi) v Sloveniji po letu 2006. V informacijskem sistemu je za vsak vzorec zabeleženo poreklo in dopolnilni podatki (kot so starost, spol, lokacija, prisotnost bolezni itd).

Vsa navedena dejstva zagotavljajo možnost uporabe večje količine biološkega materiala, vključno z enostavno dostopnostjo vzorcev, ki so sicer praviloma skoraj nedostopni za raziskovalce. Uporaba takšnih vzorcev zmanjša potrebo po odvzemu vzorcev samo za namene raziskav, po drugi strani pa bodo podatki, pridobljeni z molekularno genetsko analizo, lahko dostopni različnim deležnikom, ki so pomembni pri upravljanju z lovnimi vrstami, kot sta npr. Lovska zveza Slovenije in Zavod za gozdove Slovenije. Tako se lahko raziskave molekularne ekologije vključujejo v družbeno pomembne procese po načelih etičnosti, družbene vpetosti, odprtega dostopa in tudi izobraževanja.



Slika 1: Shematski prikaz osnovnih ključev, ki opisujejo osnovne cilje projekta StarBios2

## 1.2 IZOLACIJA MOLEKULE DNA IZ KOSTI

Kost je rastoče tkivo, sestavljeno predvsem iz anorganskih mineralnih soli (70 %) in kolagena. Kosti vsebujejo sorazmerno majhno število celic (npr. osteoblasti, osteociti, osteogene celice in osteoklasti), zamreženih v matriko kolagenskih vlaken. Kolagenska vlakna zagotavljajo površino, potrebno za vezanje kristalov anorganskih soli, ki dajejo kostem značilno strukturo (Martini in Bartholomew, 2010). Ti kristali soli nastajajo v procesu kristalizacije ali kalcinacije na kolagenskih vlaknih, ko se kalcijev fosfat in kalcijev karbonat združita v hidroksiapatit. Kristali hidroksiapatita v svojo strukturo vežejo še druge anorganske soli, kot so magnezijev hidroksid, fluorid in sulfat, in dajejo kostem trdnost, skupaj s kolagenskimi vlakni, ki vzdržujejo prožnost, pa omogočajo kostem zaščito pred krhkostjo (Martini in Bartholomew, 2010).

Zaradi njihove specifične strukture zahteva uporaba kosti kot biološkega vzorca za genetske analize posebno obravnavo. Majhno število kostnih celic in njihova zamreženost v kostno strukturo omejujeta dostopnost DNA za izolacijo iz njih. Območja obsežne mineralizacije znotraj kosti predstavljajo fizične ovire za dostopnost reagentov in tako otežujejo izolacijo molekul DNA (Pääbo in sod., 2004, Loreille in sod., 2007). Po drugi strani kosti ravno zaradi svoje strukture ohranjajo DNA razmeroma dolgo časa in zaradi tega predstavljajo atraktiven vzorec, ki nam omogoča analize tudi več tisoč let starih primerkov (Kumar in sod., 2014).

Tovrstni biološki material predstavlja izziv za molekularne biologe zaradi težavnosti izolacije kakovostne DNA ter časovne potratnosti izolacije in visokih stroškov. Delo s kostmi zahteva prilagoditev postopkov izolacije z uvedbo predpriprave vzorcev, uporabo ustreznih postopkov razgradnje tkiva in postopkov izolacije DNA (Alonso in sod., 2001).

### 1.2.1 Problematika izolacije molekule DNA iz kosti

Na kakovost in količino izolirane DNA lahko vplivajo številni dejavniki, kot so struktura kosti, stanje okolja, v katerem so bile shranjene kosti, procesi razgradnje med diagenozo kosti in prisotnost inhibitorjev iz okolja. Zaradi teh dejavnikov lahko izoliramo DNA z manjšim številom kopij (Loreille in sod., 2007), nepopolno ali fragmentirano DNA (Rohland in sod., 2007) ali DNA, ki je kontaminirana z inhibitorji PCR (Chilvers in sod., 2008).

Znotraj živih celic se celovitost DNA molekule stalno vzdržuje z encimskimi popravljivimi popravnimi mehanizmi (Lindahl, 1993). Po smrti organizma zaradi spremembe v pH-vrednosti, pričnejo lizosomi celic sproščati prebavne encime v citoplazmo. Posledično se prične tudi razgradnja DNA z encimi, kot so lizosomske nukleaze. Poleg naravnih procesov celične avtolize lahko molekulo DNA dodatno razgradijo in uničijo še bakterije, glive in žuželke, ki se prehranjujejo z biološkim materialom in dodatno razgrajujejo makromolekule (Eglinton in sod., 1991).

Poleg nizke ravni endogene DNA moramo upoštevati dejstvo, da je večina kosti mineralizirana matrica, ki predstavlja fizično oviro za izolacijo DNA molekule. Cilj večine postopkov za izolacijo DNA iz kosti je zaradi tega usmerjen v raztapljanje mineralne matrice (demineralizacija), da bi bila DNA dostopna za izolacijo. Izolacijski postopki predvidevajo različne čase raztapljanja mineralne matrice, odvisno predvsem od vrste, ohranjenosti in starosti kosti. Večina trenutnih postopkov za izolacijo DNA iz kosti in zobovja temelji na inkubaciji predhodno zdrobljenega materiala v etilen diamin tetraacetni kislini (EDTA), ki vsebuje izolacijski pufer. EDTA demineralizira kost (v obsegu, odvisno od koncentracije EDTA in volumna pufra) in inaktivira DNA s keliranjem dvovalentnih kationov, kot sta  $Mg^{2+}$  ali  $Ca^{2+}$  (Loreille in sod., 2007).

Raziskava Jakubowske, Maciejewske in Pawłowskega (2012) je pokazala, da pri svežih in dobro ohranjenih kosteh demineralizacijska dolžina ne igra pomembne vloge, vendar je treba degradirane stare kosti demineralizirati vsaj tri dni za ustrezno izolacijo (Jakubowska in sod., 2012). Dodatno Rohland in Hofreiter (2007) navajata, da se lahko za boljšo demineralizacijo izolacijski pufer prilagodi značilnostim tipa vzorca. V pripravljen vzorec lahko dodamo reducente (npr. 50 mM ditiotreitrol – DTT) in detergente, ki uničijo beljakovine in nepoškodovane celične membrane tako v primeru uporabe svežih kakor starodavnih kostnih vzorcev (Rohland in sod., 2007).

### 1.2.2 Ocena kakovosti izolirane DNA iz kostnega tkiva

Število bioloških raziskav, v katerih se uporablja DNA, pridobljeno iz slabo ohranjenih, razgrajenih ali starih tkivnih virov, v zadnjem času narašča. Primeri so ekološke študije z uporabo genskega materiala, kjer je DNA težje dostopna za izolacijo, kot so fekalni vzorci



(Morin in sod., 2001, Deagle in sod., 2006), genetske raziskave prostoživečih živali, za katere se navadno uporabljajo kostna tkiva ali dlaka trofejskih primerkov (Šprem in sod., 2016) in evolucijske študije z uporabo DNA iz muzejskih zbirk (Nielsen in sod., 2017) ali fosiliziranih kosti (Shapiro in sod., 2004). Pogosto se lahko iz teh vzorcev izolira le majhno količino DNA in ta je večinoma močno poškodovana. Določitev kakovosti DNA je pri delu s takšnimi vzorci zaželeno, če ne celo nujna (Handt in sod., 1996, Pääbo in sod., 2004, Mitchell in sod., 2005).

Kakovost in količina izolirane DNA vplivata na nadaljnje genetske analize. Zlasti na občutljivost in učinkovitost pomnoževanja fragmentov DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Učinkovitost reakcije PCR je lahko slabša zaradi prisotnosti nečistoč v izolatih DNA, premajhne količine začetne DNA ali zaradi njene večje razdrobljenosti (Kaestle in sod., 2002, Yang in sod., 2003, Loreille in sod., 2007).

Ocena poškodb izolirane DNA je obratno sorazmerna z velikostjo produkta PCR (dolžino pomnoženega fragmenta) in uspehom reakcije verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR). Uspešnost reakcije PCR se lahko preprosto izmeri s prisotnostjo ali odsotnostjo produkta PCR, vizualiziranega na elektroforeznem gelu (Handt in sod., 1994, 1996). Ta pristop je preprost, vendar ima omejeno občutljivost, saj razen informacije o uspešnosti pomnoževanja in grobe ocene količine namnoženega produkta ne pridobimo drugih informacij.

Iz verižne reakcije s polimerazo, delovno in časovno potratne tehnike določanja uspešnosti pomnoževanja na osnovi elektroforeznega gela se je razvila hitro in visoko zmogljiva kvantitativna tehnologija. Kvantitativni PCR v realnem času (angl. quantitative PCR ali skrajšano qPCR) je postala referenčna tehnologija za detekcijo in kvantifikacijo nukleinskih kislin v raziskovalni, diagnostični, forenzični in biotehnoški panogi (Bustin, 2010).

Z razvojem tehnologije reakcije PCR v realnem času se za ocenjevanje kakovosti vedno bolj uveljavlja metoda na osnovi fluorescentnega barvila SYBR Green (Bustin, 2010). SYBR Green je cianinsko barvilo, ki se vgrajuje in obarva nukleinske kisline (Zipper in sod., 2004). Prednostno se veže na dvovijačno DNA. Nastali DNA barvni kompleks absorbira modro svetlobo ( $\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$ ) in oddaja zeleno svetlobo ( $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$ ). Optični merilec zazna spremembo v oddani zeleni svetlobi po vsakem izvedenem ciklu PCR, saj se količina oddane zelene svetlobe povečuje s povečevanjem količine produkta PCR (Zipper in sod., 2004, Stephenson, 2016). Tako lahko ob popolnem pomnoževanju iz ene vijačnice DNA pričakujemo  $2^n$  kopij iskanega fragmenta, pri čemer je  $n = \text{št. ciklov reakcije PCR}$  (Brown, 2008). qPCR tako predstavlja hitro in enostavno metodo za detekcijo PCR-produkta brez dodatnih laboratorijskih postopkov.

Uporaba qPCR je močno izboljšala analizo težavnih vzorcev DNA z dodajanjem kvantitativne komponente uspešnemu pomnoževanju PCR, hkrati pa zagotavlja vpogled v občutljivost in učinkovitost same reakcije (King in sod., 2009). Kljub očitnim prednostim pa se qPCR še vedno le malo uporablja pri genetskih analizah in oceni kakovosti izolirane DNA, ker je to še vedno cenovno draga metoda. qPCR zagotavlja kakovostno oceno vzorcev glede na vsebnost izolirane DNA in njeno razgradnjo (Poinar in sod., 2006, King in sod., 2009), pojasnjuje morebitno kontaminacijo endogene in eksogene DNA in omogoča retrospektivno analizo fragmentacije DNA glede na starost vzorca (Deagle in sod., 2006). Uporaba qPCR nam omogoča tudi razumevanje procesov degradacije DNA v različnih časovnih okvirjih (Nielsen in sod., 2017).

## 1. 3 MOLEKULARNA EKOLOGIJA

### 1.3.1 Molekularna ekologija in monitoring prostoživečih živali

Različne prakse upravljanja (selektiven odvzem, translokacija, vzgoja v ujetništvu, uvajanje tujerodnih vrst) lahko vodijo do sprememb v genskem skladu parkljarjev znotraj populacij (Randi, 2005, Niedziałkowska in sod., 2014). Posledice takšnih sprememb lahko vključujejo zmanjšanje genetske variabilnosti, povečanje parjenja v ožjem sorodstvu, zmanjšanje sposobnosti preživetja populacije in izgubo lokalnih adaptacij (Zachos in Hartl, 2011; Zachos in sod., 2007).

Podatke o genetski variabilnosti lahko uporabimo pri oblikovanju načrtov upravljanja in načrtovanja razvoja infrastrukture za ohranjanje ugodnega stanja vrst in populacij. Hitre spremembe v lovsko-upravljaljskih praksah ali dodatna fragmentacija krajine in drugi vplivi človeških dejavnosti lahko dramatično vplivajo na povezljivost prostora in disperzijo živali ter tako zmanjšajo pretok genov znotraj in med populacijami. (S)poznavanje vpliva sprememb v prostoru na genetsko strukturo je pomembno za identifikacijo potrebne velikosti upravljaljskih ali pa varstvenih enot, za razumevanje potenciala vrst za lokalno prilagajanje in je lahko dragoceno napovedno orodje za modeliranje vpliva prostorskih in okoljskih vplivov na prostoživeče živali v prihodnosti (Schwartz in sod., 2007).

Ena najpomembnejših nalog sodobnega upravljanja populacij in prostorskega načrtovanja je preprečiti nadaljnjo fragmentacijo habitatov oz. ponovno vzpostaviti povezavo med razdrobljenimi populacijami, ki so nekoč naseljevale sklenjen prostor. Potreba po boljšem poznavanju ekoloških in genetskih vplivov razdrobljenosti habitatov na populacijsko strukturo je privedla do razvoja prostorskih genetskih raziskav, ki pomagajo pri identifikaciji glavnih ovir za prost genski pretok v krajini. Genetske analize/podatki zagotavljajo ključne informacije o strukturiranju populacij in skupaj z ekološkimi študijami (npr. ugotavljanje

potencialnih učinkov ovir na vitalnost osebkov in na nekatere najpomembnejše znake življenjskih strategij) omogočajo oceno vitalnosti in dolgoživosti izpostavljenih populacij ter prispevajo k evalvaciji učinkovitosti že izvedenih protiukrepov (npr. že zgrajeni podhodi in nadhodi), ki omogočajo prehajanje živali med (sub)populacijami (Hedrick, 2011).

V populacijskih študijah se največ uporabljajo nevtralni mikrosatelitni lokusi, ki nimajo nobenega vpliva (ali pa je le-ta zelo majhen) na fitnes živali, zato ustrezno odražajo vzorec genskega pretoka in genetskega zdrsa v neki krajini (Ellegreen, 2004). Posebej so uporabni za proučevanje hitrega odziva genetske variacije na spremembe v krajini (Wang, 2011). Polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP-ji) se običajno uporabljajo kot nevtralni označevalci, lahko pa tudi kot adaptivni označevalci, ko se nahajajo v bližini lokusov, ki so pod vplivom selekcije vzdolž okoljskega gradienta (Holderegger in sod., 2006). Primerjava nevtralnih in adaptivnih lokusov je lahko še posebej koristna za razčlenjevanje učinkov selekcije zaradi genskega pretoka in genetskega zdrsa. Ti procesi med drugim vplivajo tudi na razmnoževalno sposobnost, ki je ena najpomembnejših lastnosti osebkov in eden glavnih kazalnikov fitnesa populacij (Flajšman in sod., 2017), zato je zelo dobrodošlo celostno povezovanje dognanj o razmnoževalni sposobnosti z ugotovitvami genetskih analiz. Vplive prostorskega spreminjanja genetskih in drugih bioloških značilnosti ter vrstno-specifične potrebe po vzpostavitvi povezav med habitatami glede na različno prostorsko vedenje vrst je mogoče oceniti z določitvijo genetske strukture in najpomembnejših ekoloških značilnosti populacij vzdolž neke prepreke (Emaresi in sod., 2011).

Genetska teorija razlaga, da zmanjšanje genskega pretoka med subpopulacijami vodi v bolj pogosto parjenje v ožjem sorodstvu in izgubo genetske raznolikosti znotraj fragmentiranih območij; slednje namreč omogoča populacijam, da se lahko razvijajo in odzivajo na okoljske spremembe (Coulon in sod., 2004a). Minimalno število osebkov, ki je potrebno za ohranitev genskega pretoka, je vrstno specifično in določeno z velikostjo prejemne subpopulacije ter velikostjo okoliških subpopulacij (Allendorf in sod., 2013). Izjemnega pomena za prostorsko-časovno dinamiko premikov so tudi demografska struktura populacije, preživetje migrantov in stopnja genskega pretoka znotraj subpopulacije, iz katere izvirajo migranti (Palsboll in sod., 2007, Allendorf in sod., 2013).

Celovito vrednotenje/spremljanje vpliva fragmentacije in degradacije habitata zahteva vključitev različnih spremenljivk, kot so značilnosti prostora in krajinske matrice, ki obkroža strukturo (npr. človeške motnje, prisotnost drugih cest v bližini, gostota in demografska struktura populacij simpatičnih vrst, relief, struktura vegetacije in značilnosti habitata/krajine na obeh straneh ceste) (Coulon in sod., 2004, Anderson in sod., 2010). Danes, v času hitrih sprememb okolja, so nujni hitri odzivi znanosti, ki lahko zagotovijo hitro in učinkovito ukrepanje v procesu varovanja in upravljanja s populacijami.

Z uporabo genetike je narejen precejšen napredek pri razumevanju relativne vloge adaptivnih in neadaptivnih procesov pri oblikovanju vzorcev biotske raznovrstnosti in vplivov okoljskih spremenljivk na adaptivno diferenciacijo na genski ravni (Holderegger in sod., 2006). Za razumevanje vplivov človeških dejavnosti je potrebno celostno poznavanje in vrednotenje stopnje vpliva na populacije, pa tudi prostorskega vedenja proučevanih vrst in spreminjanja le-tega, seveda pa tudi izbranih populacijskih parametrov (npr. velikost, demografska struktura), selitvene intenzitete znotraj populacij in med njimi ter preživetja migrantov, za kar nam molekularna biologija ponuja primerna orodja.

V Sloveniji že 12 let opravljajo redni genetski monitoring volka in medveda, ki zagotavlja ustrezne informacije za razvoj učinkovitih upravljalnih strategij varovanja in upravljanja z vrstami (Skrbinšek in sod., 2012, Jerina in sod., 2013a). Vendar je v tem kontekstu Slovenija prej izjema kot pravilo, saj druge evropske države nimajo vzpostavljenega rednega genetskega monitoringa ogroženih zveri. Za še vedno negativno dojemanje uporabe genetike pri upravljanju z vrstami so Bernatchez in sodelavci (2017) izpostavili več dejavnikov, in sicer: splošno pomanjkanje razumevanja potencialne vrednosti genetskih informacij, dojemanje, da so genske študije drage, pomanjkanje doslednosti v interpretacijah rezultatov s strani stroke, dosedanja zanemarjenost genetskih informacij v primerjavi z drugimi monitoringi pri upravljalnih odločitvah. Zaradi tega sta pomen in uporabnost genetskega monitoringa pri upravljanju s populacijami še vedno dokaj nejasna in neraziskana, kljub morebitnim gospodarskim in varstvenim posledicam nepravilnega upravljanja (Garner in sod., 2016).

Toda kljub neustreznemu dojemanju stroke je treba trenutno pomanjkljivost na področju genetskega monitoringa obravnavati kot izziv in zaenkrat z raziskovalnim delom dodatno prispevati k integraciji genetskih informacij v pripravo upravljalnih strategij. Smernice RRI narekujejo potrebo po boljši komunikaciji med raziskovalci in ostalimi deležniki, ki sodelujejo pri upravljalnih odločitvah. Komunikacija bi morala potekati v smeri boljšega razumevanja uporabnosti genetskih metod s strani končnih uporabnikov in večjo dostopnost upravljalcev do rezultatov in interpretacije genetskega monitoringa

Metodologija vzorčenja bi morala biti neposredno usmerjena k etičnosti zbiranja genetskega materiala z uporabo obstoječih vzorcev, zbranih zaradi letnega poročanja lovskih družin (kot je na primer zbiranje spodnjih čeljustnic ali trofej). Na takšen način bi se izognili nepotrebnemu dodatnemu in časovno zamudnemu zbiranju vzorcev in odpravili kakršne koli etične zadržke na področju raziskovalnega dela. Obenem bi za raziskave splošno razširjene in pogoste vrste divjadi ta način zagotovil večje količine vzorcev v sklopu rednega upravljanja/odvzema, tako da nobena žival ne bi izgubila življenja zaradi izvajanja genetskih študij.

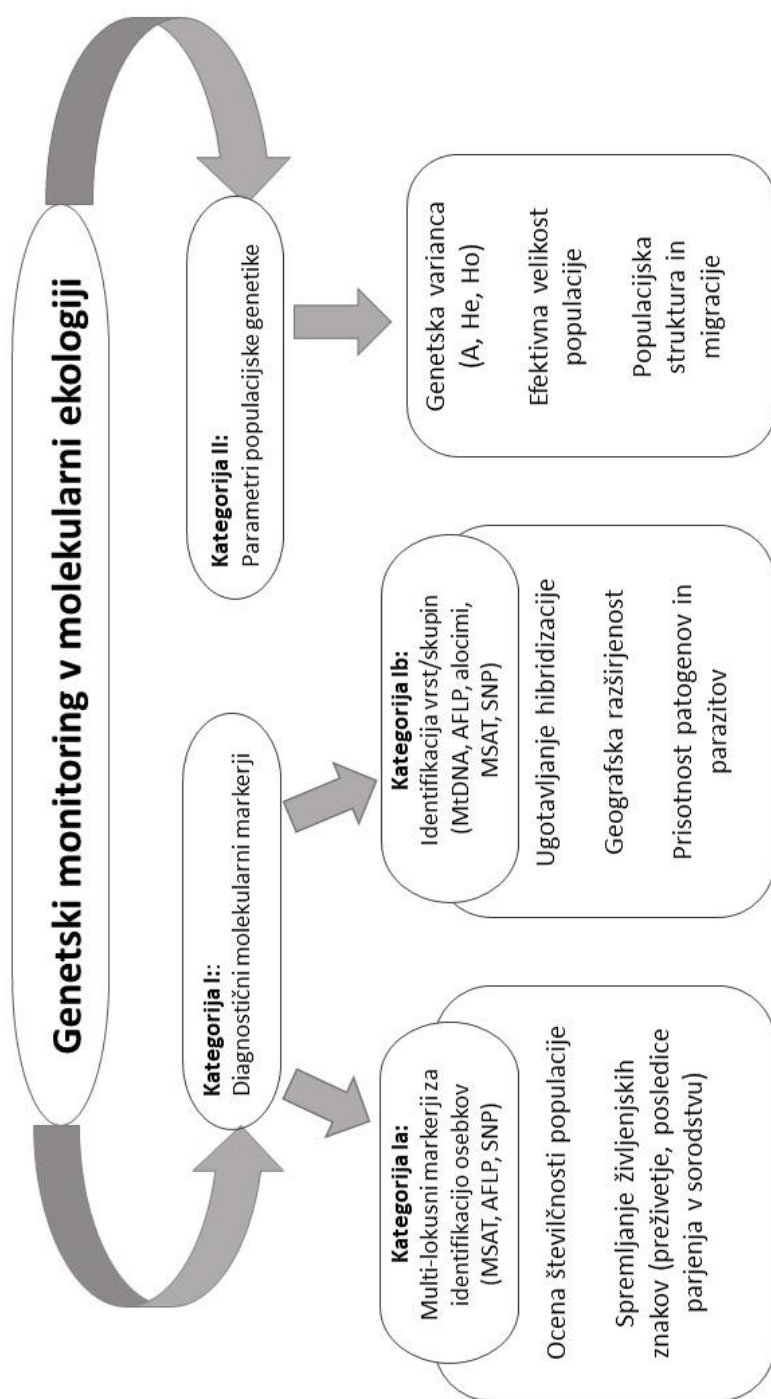
S tega vidika so spodnje čeljustnice prostoživečih parkljarjev (najpomembnejše lovsko-upravljavsko skupine divjadi) vzorec, ki lahko nudi številne nove, uporabne, lahko merljive in relevantne kazalnike stanja v populaciji (Jerina in sod., 2013 b). Dolžnost vsake lovske družine v Sloveniji je zbrati levo stran spodnje čeljustnice ulovljene divjadi zaradi spremljanja pravilnosti podatkov in ustreznosti odvzema živali (Pravilnik o sprejemu letnih načrtov lovsko upravljavskih območij v Republiki Sloveniji za leto 2010, Ur. l. RS, št. 41/2010).

### **1.3.2 Uporaba molekularnih genetskih markerjev pri strategijah upravljanja z vrsto**

Molekularni markerji, ki se pogosto uporabljajo v populacijski genetiki, so mitohondrijska DNA (mtDNA) in mikrosateliti (jedrna DNA). Najpogosteje uporabljeni enostarševski marker za filogeografske študije in za raziskave hibridizacije (parjenje genetsko različnih vrst (ali filogeografskih linij), tudi različnih fenotipov) je mitohondrijska DNA. Prednost mitohondrijske DNA je njena večja nagnjenost k introgresiji (prenos genov z ene vrste na drugo zaradi hibridizacije čez delno vzpostavljeno reproduktivno izolacijo) v primerjavi z jedrnim genomom. Visoka variabilnost, povezana z mikrosateliti, zagotavlja ustrezen označevalni sistem za zaznavanje populacijske strukture, nedavnega genskega pretoka in hibridizacije med posamezniki iz različnih populacij (Zane in sod., 2002). Takšni podatki nam lahko zagotovijo hitrejšo in učinkovitejšo odzive na morebitne spremembe v populaciji in v okolju (npr. drastičen upad števila osebkov v populaciji, vpliv zmanjšanja oz. drobljenja habitata na vrsto in populacije ...).

Genetska struktura populacije se lahko skozi čas spreminja zaradi posledic človekovega vpliva. Določitev genetske različice, prisotne v populaciji pred in po določeni spremembi v življenjskem okolju, nam zagotavlja retrospektiven vpogled v pretekli in obstoječi genski sklad populacije. Iz preteklih časovnih obdobj so nam na razpolago bodisi trofeje (rogovja/roglji, lobanje, suhe kože), zbrane čeljustnice ali zgodovinski primerki vrst (Wandeler in sod., 2007) v lasti javnih (muzejskih) ali zasebnih zbirk (Wisely in sod., 2004). Ker so roglji/rogovi pri samcih že več stoletij ohranjeni kot lovske trofeje, so nam na razpolago obsežne zbirke vzorcev (zbirke trofej) iz različnih regij in različnih starosti, pogosto z

natančno znano starostjo in izvorom. Genetska analiza vzorcev iz različnih časovnih obdobj nam tako omogoča primerjavo med zgodovinskimi in obstoječimi procesi, ki so v tem obdobju oblikovali gensko strukturo populacij (Pertoldi in sod., 2001, Flagstad in sod., 2003).



Slika 2: Prikaz uporabe genetskega monitoringa za določitev, opredelitev uporabe v študijah populacijske dinamike (povzeto po Schwarz in sod. 2007)

## 2 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE

Namen magistrskega dela je razviti in optimizirati metodo za uspešno izolacijo DNA iz starih in svežih kosti vzorcev divjadi, ki je bila legalno odstreljena skladno z lovsko-upravljavskimi načrti v sklopu rednega upravljanja s populacijami ali povežena zaradi kolizije v prometu.

Cilj magistrskega dela je razviti ekonomično in učinkovito metodo za izolacijo DNA za različne vzorce kosti divjadi z uporabo kemikalij in orodij, ki so na voljo v večini molekularnih laboratorijev, opraviti kvantitativne in kvalitativne analize za primerjavo med uspešnostjo izolacije in pomnoževanjem DNA iz kosti različnih starosti in iz vzorcev tkiva ter predstaviti možnosti za vključitev principov odgovorne znanosti (RRI) na področje molekularne ekologije.

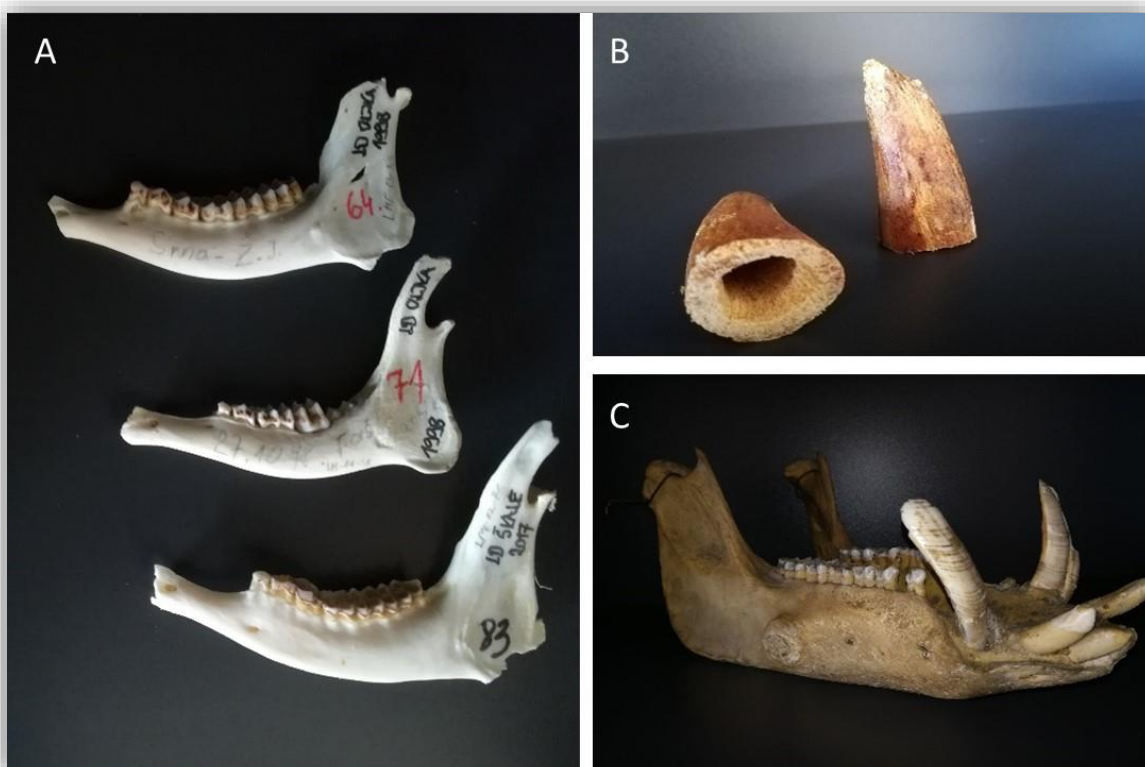
Glavne hipoteze predvidevajo, da:

- uporaba demineralizacijskega postopka pri svežih in starih kosteh bistveno vpliva na koncentracijo izolirane DNA;
- izolacija DNA iz kostnega tkiva z uporabo demineralizacijskega postopka je enako uspešna v primeru uporabe cenovno dostopnega kita (PeqLab) kot dražjega in bolj specifičnega kita za izolacijo (QIAmp);
- uspešnost pomnoževanja izolirane DNA se razlikuje glede na starost kosti.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 VZORCI

V magistrskem delu smo uporabili 108 vzorcev štirih različnih vrst parkljarjev: *Rupicapra rupicapra*, *Capreolus capreolus*, *Sus scrofa* in *Capra Ibex*. Za vsako vrsto smo izbrali vzorce svežega kostnega in tkivnega vzorca ter star kostni vzorec v razponu 20–100 let.



Slika 3: Primerki uporabljenih vzorcev.

A) Spodnje čeljustnice različnih starosti srne

B) Vzorčno mesto za pridobitev DNA iz roglja gamsa

C) Vzorec spodnje čeljustnice divjega prašiča (*Sus scrofa*), starosti 100 let (desno spodaj)

Vzorci kosti so odvzeti iz baze roglja/roga ali leve strani spodnje čeljustnice od legalno odstreljenih osebkov, skladno z lovsko-upravljavskimi načrti v sklopu rednega upravljanja s populacijami, poleg njih so med vzorci tudi poveženi osebki iz Slovenije in Hrvaške.



### 3.2 DEMINERALIZACIJSKI POSTOPEK

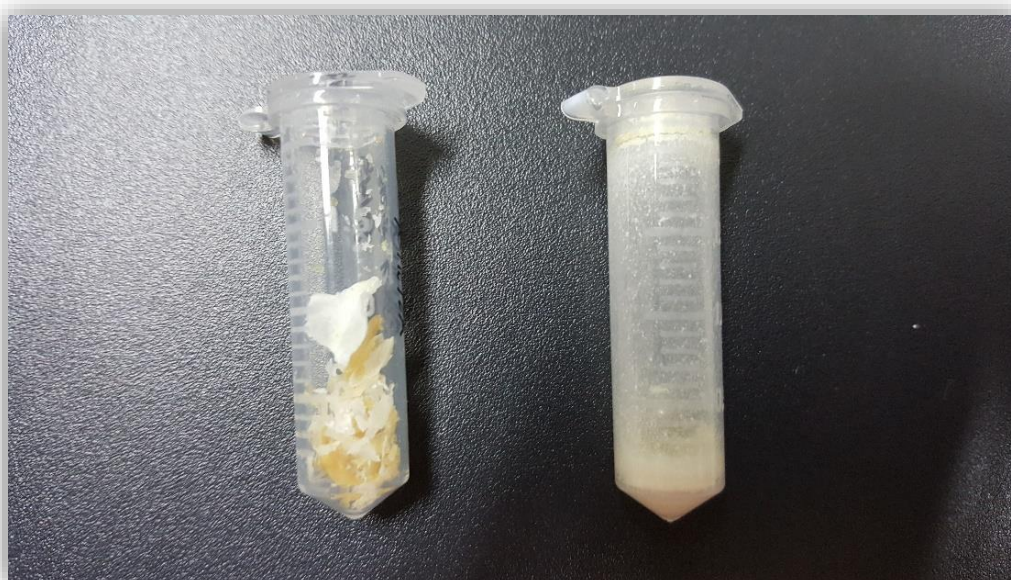
Da bi preprečili morebitno kontaminacijo, je laboratorijsko delo na vzorcih starih kosti (>100 let) potekalo v namenskem, fizično izoliranem laboratoriju za delo s starodavno DNA. Da bi zmanjšali možnost kontaminacije s človeško DNA, smo vpeljali stroge postopke glede prenosa materiala in prehoda ljudi iz post-PCR laboratorija (za pomnoževanje DNA) v laboratorij za izolacijo starodavne DNA. Vse površine v laboratoriju smo rutinsko očistili dvakrat z raztopino 1% natrijevega hipoklorita, čemur je sledilo dvojno spiranje z absolutnim etanolom (Ballantyne in sod. 2015). Laboratorij smo čez noč obsevali z ultravijolično svetlobo vsaj dve uri. Ves potrošni material, pripomočke za enkratno uporabo in instrumente smo od zunaj temeljito obrisali z 1% raztopino natrijevega hipoklorita in obsevali z UV-lučjo, nato pa jih še redno čistili pred, med in po uporabi.

Pred izolacijo molekule DNA iz kosti smo izvedli demineralizacijski postopek s ciljem zvišanja količine in kakovosti izolirane DNA. Starim in svežim kostnim vzorcem smo zelo previdno zbrusili 3 mm površine in odvzeli vzorec tkiva 2 x 2 mm z uporabo sterilnega orodja za brušenje in uporabo skalpelnega rezila. Posebno smo pazili, da nismo uničili videza trofeje.



Slika 4: Prikaz vzorčnega mesta za odvzem tkiva na primeru trofeje, lobanja gamsa

Natehtali smo približno 0,3 g ( $\pm 0,05$  g) kostnega prahu v 50 ml sterilno centrifugirko, temu smo dodali 10 ml 0,5 M EDTA in temeljito pretresli na mehanskem stresalniku. Vzorce smo nato inkubirali čez noč pri 37 °C ob neprekinjenem rahlem stresanju (rotaciji). Ob vsaki izolaciji smo pripravili tudi negativno kontrolo, za katero smo uporabili iste reagente, vendar brez dodanega kostnega prahu. Inkubirane vzorce smo 15 minut centrifugirali pri  $1300 \times g$ , pri čemer je bil običajno viden pelet rezidualnega praha. Supernatant smo previdno odpipetirali iz centrifugirke in ga zavrgli. Pri izolaciji negativne kontrole smo pustili približno 100  $\mu$ l supernatanta. Pelet smo sprali z 10 ml sterilne bi-deionizirane vode in 10 s mešali pri visoki hitrosti na rotacijskem mešalu. Temu je sledilo ponovno centrifugiranje pri  $1300 \times g$  za 15 minut. Supernatant smo ponovno previdno odpipetirali in nadaljevali z izolacijskim postopkom.



Slika 5: Priprava kostnih vzorcev za izolacijo

### 3.3 IZOLACIJA MOLEKULE DNA

Po demineralizaciji vzorcev smo nadaljevali z izolacijo DNA. K peletu smo dodali 100  $\mu$ L liznega pufra (ATL Qiagen), 60  $\mu$ L proteinaze K (Qiagen) in 20  $\mu$ L 50 mM ditioneitol (DTT) ter nato inkubirali vzorce pri 56 °C dve do tri ure. Po tem koraku smo v skladu z navodili proizvajalca sledili izolacijskemu postopku z uporabo kompleta izolacijskih reagentov QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Nemčija; v nadaljevanju: QIAamp), ki je običajno označen kot zlati standard pri pridobivanju DNA iz kosti, čeprav je eden izmed dražjih izolacijskih kitov na trgu. Uporaba različnih metod je opisana v Tabeli 2. DNA smo raztopili v 100  $\mu$ L elucijskega pufra. Nato smo koncentracije vzorcev normalizirali in shranili v hladilniku pri +4 °C.



Slika 6: Uporabljeni izolacijski kiti PeqLab (levo) in QIAmp (desno)

Za pozitivno kontrolo smo uporabili sveže mišično tkivo, saj so mišice in ostala mehka tkiva najprimernejša vrsta vzorcev za genetske študije. Tkivne vzorce, velikosti 2 x 2 mm, smo v sterilnih pogojih posušili na zraku, da smo odstranili etanol, v katerem so bili shranjeni. DNA smo iz tkivnih vzorcev izolirali s kompletom reagentov peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (VWR International, Leuven, Belgium) v skladu z navodili proizvajalca. Da bi testirali učinkovitost naše metode, smo sveže in stare kostne vzorce izolirali tudi z uporabo nizkocenovnega peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (v nadaljevanju: PeqLab) s postopkom demineralizacije in brez postopka demineralizacije. Izolacijo DNA iz kostnega tkiva smo izvedli tudi z uporabo kiti QIAmp, ravno tako s postopkom demineralizacije in brez njega.

Preglednica 1: Število in tip vzorcev, uporabljenih v različnih metodah izolacije DNA

<i>Vrsta vzorca</i>	<i>Izolacijska metoda</i>	<i>N</i>
Tkivo	Standardni postopek	18
Sveže kosti	Kit PeqLab brez demineralizacije	18
Sveže kosti	Kit PeqLab z demineralizacijo	12
Sveže kosti	Kit QIAamp brez demineralizacije	8
Sveže kosti	Kit QIAamp z demineralizacijo	12
Stare kosti	Kit PeqLab brez demineralizacije	8
Stare kosti	Kit PeqLab z demineralizacijo	8
Stare kosti	Kit QIAamp brez demineralizacije	12
Stare kosti	Kit QIAamp z demineralizacijo	12

N – število vzorcev

\* Za standardni postopek smo uporabili sveže vzorce tkiva, ki smo jih izolirali s peqGOLD Tissue DNA mini kitom v skladu z navodili proizvajalca

### 3.4 DNA-KONCENTRACIJA IN KVANTIFIKACIJA

Koncentracijo in čistočo izolirane DNA v končnem volumnu smo izmerili z uporabo reagenta Qubit® dsDNA BR za merjenje koncentracije (Invitrogen) na fluorimetru Qubit 3,0 (Life Technologies). Za analizo smo uporabili 2  $\mu$ l izolirane DNA. Za preverjanje morebitnih nečistoč smo dodatno izmerili spektralno krivuljo na Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTeck) z uporabo Gene5 v.1 programske opreme. Dobljeno DNA smo izrazili kot količino DNA v ng na  $\mu$ L končnega volumna.

Količino in kakovost izolirane DNA smo ocenili z uporabo barvila SYBR Green v verižni reakciji s polimerazo v realnem času. Za vsako reakcijo je bila potrebna mešanica reagentov s končnim volumnom 10  $\mu$ l, ki smo jo pripravili z mešanjem 5  $\mu$ l Master mix reagenta, 1,5

$\mu\text{l}$  vode, primerne za molekularno analizo, ter 2 x 0,5  $\mu\text{l}$  10 mM raztopine oligonukleotidnih začetnikov. Reakcijski mešanici smo dodali še 2,5  $\mu\text{l}$  DNAnormalizirane koncentracije na 1 ng/ $\mu\text{l}$ . Vse reakcije qPCR so bile opravljene na sistemu Roche LightCycler® 96 (Roche Diagnostic GmbH, Nemčija) pod pogoji, kot so prikazani v Preglednici 2.

Preglednica 2: Temperaturni pogoji za qPCR

		<i>Št. ciklov</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Čas (s)</i>	<i>Ramp (°C/s)</i>	
amplifikacija	Tristopenjska	Predinkubacija	95	600	4,4	
		Denaturacija	95	10	4,4	
		Prileganje	45 (0,5)/cikel	60-	10	2,2
		Elongacija		72	10	4,4
reakcija	talilna	Denaturacija	95	10	4,4	
		Prileganje	1	65	60	2,2
		Elongacija		97	1	/

Vzorci smo analizirali v treh ponovitvah. Izolirana negativna kontrola je bila vključena poleg vsake serije obdelanih vzorcev.

Za določitev stopnje uspešnosti pomnoževanja smo za vsako izbrano vrsto izbrali približno 100 bp in 200 bp dolg mikrosatelitni lokus (glej preglednico 3). Degradacijo vzorcev DNA smo določili z izračunom razmerja uspešnosti pomnoževanja produkta, dolgega 100 bp, in produkta, dolgega 200 bp (količnik med Cq100/Cq200), po postopku, opisanem v Nielsen in sod., 2016. Izbrani količnik nam poda stopnjo degradiranosti DNA molekule v vzorcu. V skladu s smernicami MIQE (Priloga A) je Cq < 40 predstavljal spodnjo mejo za uspešno pomnoževanje fragmenta (Bustin in sod., 2009).

Za vsak par primerjav smo naredili tudi analizo temperature tališča, da smo izločili morebitne nespecifične fragmente ali prisotnost, primer dimerov (priloga C). Po smernicah MIQE smo izračunali tudi enačbo standardne krivulje in R<sup>2</sup>, ki so prikazani v prilogi D.

### 3.5 ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV

Za končno validacijo postopka smo genotipizirali mikrosatelitne lokuse (msat) različnih dolžin (približno dolgi 80, 150 in več kot 200 bp; Preglednica 4). Mikrosatelitne lokuse smo pomnožili z uporabo reagentov Alltaq PCR Core kit (Qiagen) v skladu z navodili proizvajalca, pri čemer smo uporabili 3  $\mu$ L izolirane DNA pod naslednjimi pogoji: začetna aktivacija PCR 2 min. 95 °C, temu je sledilo 40 ciklov: Denaturacija 10 s 95 °C, prileganje oligonukleotidnih začetnikov 30 s 55 °C, podaljševanje fragmentov 20 s 72 °C in končna ekstenzija za 72 °C 10 min.

Preglednica 3: Izbrani fragmenti mikrosatelitnih lokusov kratkih, srednjih in dolgih dolžin, ki so bili pomnoženi v reakciji qPCR ali PCR za fragmentno analizo

<i>Uporabljen par</i>			<i>Dolžina</i>
<i>začetnih</i>			
<i>oligonukleotidov</i>	<i>Sekvenca 5'–3'</i>	<i>Vrsta</i>	<i>fragmenta</i>
<b>Roe8*</b>	AAGCCGCGCTTGAAGGAG ATCAAGCTCCCCTCTTCG		80–100 bp
<b>ETH225</b>	GATCACCTTGCCACTATTTCT ACATGACAGCCAAGCTGCTACT	<i>C. capreolus</i>	128–150 bp
<b>BM1818**</b>	AGCTGGGAATATAACCAAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC		200–250 bp
<b>So26*</b>	AACCTTCCCTTCCCAATCAC CACAGACTGCTTTTTACTCC		100 bp
<b>S355**</b>	TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	<i>S. scrofa</i>	200–220 bp
<b>OarFCB20*</b>	GGAAAACCCCCATATATACCTATAC AAATGTGTTTAAGATTCCATACATGTG		80–102 bp
<b>ETH225</b>	GATCACCTTGCCACTATTTCT ACATGACAGCCAAGCTGCTACT	<i>R. rupicapra</i>	128–150 bp
<b>ETH10**</b>	GTTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC		200–208 bp
<b>OarFCB304*</b>	CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	<i>C. ibex</i>	100 bp
<b>BM1258**</b>	GTATGTATTTTTCCACCCCTGC		200 bp

\* Kratki (100 bp) in \*\*dolgi (200 bp) fragmenti so bili uporabljeni v reakciji qPCR in detektirani z uporabo naprave LightCycler 96 (Roche). Vsi mikrosatelitni lokusi, opisani v preglednici, so bili analizirani tudi na sekvenatorju SeqStudio (ThermoFischer Scientific).

Analiza fragmentov je bila izvedena na sekvenatorju SeqStudio (Thermo Fisher Scientific) z uporabo standarda GeneScan LIZ500 (-250) (Applied Biosystems). Rezultati so bili obdelani z uporabo programske opreme GeneMapper v.5.0 (Applied Biosystems).

### 3.6 STATISTIČNA ANALIZA

Statistične analize smo izvedli s programsko opremo SPSS, različice 25 (SPSS Inc., Chicago IL). Za preverjanje normalne porazdelitve podatkov smo uporabili Shapiro-Wilkov test (za meritve koncentracije in učinkovitosti pomnoževanja DNA, izražena kot količnik med Cq100/Cq200). Podatki so predstavljeni s povprečnimi vrednostmi in standardnim odklonom, medtem ko so kategorični podatki prikazani kot številke in odstotki. Podatki (koncentracija DNA in učinkovitost) niso bili normalno porazdeljeni.

#### 3.6.1 Koncentracija DNA

Najprej smo testirali razlike v koncentraciji DNA, izolirane z in brez uporabe demineralizacijskega postopka, ter jih primerjali s standardnim postopkom izolacije iz tkiva. Analizo smo izvedli z dvema različnima kompletoma reagentov (visoko cenovni kit QIAamp DNA Micro kit in cenejši kit peqGOLD Tissue DNA Mini kit) in dvema različnima tipoma kosti (stare in sveže). Za testiranje pomembnosti razlik v koncentracijah DNA smo uporabili neparametrični Kruskal-Wallisov test. Za analizo razlik med koncentracijami ob uporabi demineralizacijskega postopka in brez njega smo uporabili Mann-Whitneyjev test.

#### 3.6.2 Učinkovitost pomnoževanja DNA

Naslednji parameter kakovosti in donosa izolirane DNA smo dobili iz rezultatov testa qPCR za različne tipe kosti, ki so bili izolirani z različnima kompletoma reagentov in različnimi postopki (glej preglednico 1). Za testiranje pomembnosti razlik v uspešnosti pomnoževanja DNA smo uporabili neparametrični Kruskal-Wallisov test. Razlike v uspešnosti metode amplifikacije za različne vrste izolacije DNA smo testirali s testom  $\chi^2$ . Za ugotavljanje razlik med posameznimi postopki smo uporabili post-hoc test z uporabo standardiziranih ostankov.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ANALIZA KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNA

Vse uporabljene izolacijske metode so pokazale visoke in variabilne meritve koncentracije DNA (med 0,23 in 82,4 ng/ $\mu$ L, povprečno  $16,4 \pm 20,0$  ng/ $\mu$ L DNA).

Koncentracije DNA, izolirane iz svežih kosti, so se gibale med 1,40 in 82,4 ng/ $\mu$ L, v povprečju  $28,6 \pm 20,9$  ng/ $\mu$ L. Iz starih kosti smo izolirali DNA s koncentracijami med 0,23 in 50,3 ng/ $\mu$ L, v povprečju  $5,41 \pm 10,7$  ng/ $\mu$ L, iz tkiva pa smo pridobili med 18,8 in 52,7 ng/ $\mu$ L, povprečno  $36,3$  ng/ $\mu$ L  $\pm 13,9$  ng/ $\mu$ L DNA.

Pri izolaciji DNA iz različnih bioloških vzorcev (stare kosti, sveže kosti, tkivo) smo opazili statistično značilne razlike v izmerjenih koncentracijah. Ugotovili smo, da so bile povprečne vrednosti koncentracij izmerjene pri izolaciji iz starih vzorcev kosti (>100 let) nižje v primerjavi s koncentracijami DNA, izolirane iz svežih vzorcev kosti ( $p < 0,001$ ), ter da so bile koncentracije izolirane DNA iz kosti v povprečju nižje od koncentracije DNA, izolirane iz tkiva ( $p < 0,001$ ), če upoštevamo rezultate vseh izolacijskih metod skupaj.

#### **Analiza koncentracij DNA iz svežih kosti**

Rezultati Kruskal-Wallisovega testa so pokazali, da ni statistično značilnih razlik v koncentraciji DNA ( $p = 0,060$ ) med različnimi izolacijskimi metodami. Primerjali smo koncentracije DNA, izolirane s standardno metodo iz tkivnih vzorcev, in koncentracije DNA, izolirane s kitom PeqLab z in brez uporabe demineralizacijskega postopka ter izolacijskim kitom QIAmp z in brez uporabe demineralizacijskega postopka.

#### **Analiza koncentracij DNA iz starih kosti**

Koncentracije DNA iz starih kosti so bile nekoliko bolj variabilne glede na uporabljeno metodo izolacije. Statistična analiza je pokazala značilne razlike med posameznimi metodami ( $H = 25,050$ ;  $p < 0,001$ ). V parni primerjavi sta se značilno razlikovali izolacijska metoda s kitom PeqLab brez uporabe demineralizacijskega postopka in metoda s standardnim izolacijskim postopkom ( $p = 0,010$ ) ter izolacijska metoda s kitom QIAmp brez uporabe demineralizacijskega postopka in metoda s standardnim izolacijskim postopkom ( $p < 0,001$ ).



#### **4.1.1 Primerjava koncentracije DNA med kiti in vrsto biološkega vzorca**

##### **Sveže kosti, izolirane s kitom QIAmp**

Statistično značilnih razlik v povprečni vrednosti koncentracij DNA nismo opazili med tremi izolacijskimi metodami (pri postopku z demineralizacijo in brez nje ter izolaciji iz tkiva).

##### **Sveže kosti, izolirane s kitom PeqLab**

Statistično značilnih razlik v povprečni vrednosti koncentracij DNA nismo opazili med tremi izolacijskimi metodami (postopek z demineralizacijo in brez nje ter izolacija iz tkiva).

##### **Sveže kosti, izolirane s postopkom demineralizacije**

Primerjava koncentracij DNA svežih kosti, izoliranih z uporabo demineralizacijskega postopka z dvema različnima komercialnima kitoma in izolacijo iz tkiva, kaže statistično značilne razlike ( $p = 0,049$ ). Vendar pa je post-hoc test pokazal da ni razlike med izolacijo s kitom QIamp in kompletom reagentov izolacijskega kita PeqLab ( $p = 0,051$ ) ter med izolacijo iz tkiva. Najvišje vrednosti koncentracij izolirane DNA so bile izmerjene s postopkom demineralizacije in uporabo kita PeqLab ( $45,3 \pm 20,6$ ).

##### **Stare kosti, izolirane s kitom QIAmp**

Za stare kosti, izolirane s kitom QIAmp, smo ugotovili statistično pomembne razlike v koncentraciji DNA med izolacijskimi metodami, torej z in brez demineralizacijskega postopka ( $p = 0,037$ ), ter med izolacijo brez postopka demineralizacije in izolacijo iz tkiva ( $p < 0,001$ ). Najnižje povprečne koncentracije DNA so bile izmerjene za postopek izolacije brez demineralizacije ( $1,06 \pm 0,76$  ng/ $\mu$ L).

##### **Stare kosti, izolirane s kitom PeqLab**

Najnižja koncentracija DNA je bila dobljena z metodo izolacije s kitom PeqLab brez postopka demineralizacije ( $1,90 \pm 1,69$  ng/ $\mu$ L). Povprečna vrednost koncentracije DNA je bila statistično značilno različna od koncentracije, izmerjene pri izolaciji iz tkiva ( $p = 0,003$ ).

### **Stare kosti, izolirane s postopkom demineralizacije**

Metode izolacije iz starih kosti z uporabo kita QIAmp in kita PeqLab s postopkom demineralizacije ter izolacije iz tkiva kažejo statistično pomembne razlike v koncentraciji DNA ( $p = 0,007$ ). V tem primeru je koncentracija DNA najnižja z uporabo kita QIAmp in postopkom demineralizacije ( $5,1 \pm 5,61 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), kar je tudi statistično značilno nižje od izolacije iz tkiva ( $p = 0,05$ ).

#### **4.2 ANALIZA KAKOVOSTI IZOLIRANE DNA**

Kakovost izolirane DNA smo analizirali z izračunom uspešnosti pomnoževanja (Nielsen in sod., 2017), ki je definiran kot količnik med  $Cq_{100}$  (krajši fragment)/ $Cq_{200}$  (daljši fragment). To razmerje nam lahko pove stopnjo degradacije oz. fragmentacije DNA, saj bolj kot je DNA fragmentirana, slabše se pomnožujejo daljši fragmenti, rezultat pa se izkaže v izgubi uspešnosti pomnoževanja.

Analize smo izvajali ločeno za sveže in stare kosti.

#### **Sveže kosti**

Pri analizi svežih kosti smo opazili najvišjo uspešnost pomnoževanja v primeru, ko so bili vzorci izolirani s kitom QIAmp z demineralizacijskim postopkom ( $0,90 \pm 0,11$ ), najnižjo pa s kitom PeqLab s postopkom demineralizacije ( $0,75 \pm 0,05$ ).

Učinkovitost pomnoževanja DNA iz svežih kostnih vzorcev se bistveno razlikuje glede na uporabo kita QIAmp z demineralizacijskim postopkom in ekonomsko primernejšim kitom PeqLab z demineralizacijo in brez nje.

Uspešnost pomnoževanja DNA iz kosti z uporabo kita QIAmp z demineralizacijo je bila primerljiva z uspešnostjo pomnoževanja DNA iz tkivnih vzorcev s standardnim izolacijskim postopkom (Preglednica 5). Glede na testirane izolacijske metode je kakovost izolirane DNA najvišja pri uporabi kita QIAmp z demineralizacijo. Post-hoc test kaže statistično značilne razlike v kakovosti DNA, izolirane z uporabo kita PeqLab z demineralizacijskim postopkom v primerjavi s postopkom izolacije brez demineralizacijskega postopka ( $p < 0,001$ ). Ravno tako se statistično značilne razlike kažejo med standardno metodo in metodo izolacije z uporabo kita QIAmp brez postopka demineralizacije ( $p < 0,001$ ).

## Stare kosti

Podobno je bila za stare kosti najvišja uspešnost pomnoževanja dokazana za izolacijsko metodo s kitom QIAmp z demineralizacijskim postopkom ( $0,93 \pm 0,13$ ), najnižja pa za komplet QIAmp brez postopka demineralizacije ( $0,74 \pm 0,09$ ).

Uporabljeni Kruskal-Wallisov test je pokazal razlike v uspešnosti pomnoževanja DNA, izolirane s štirimi različnimi metodami ( $p < 0,001$ ). V primerjavi s kontrolno metodo post-hoc test kaže statistično značilne razlike uspešnosti pomnožene DNA, izolirane s kitom PeqLab z in brez demineralizacijskega postopka ( $p < 0,001$ ), ter za DNA, izolirano s kitom QIAmp brez postopka demineralizacije ( $p < 0,001$ ).

Rezultati testa  $\chi^2$  so pokazali statistično značilne razlike, ko smo testirali povezavo med uspehom pomnoževanja kratkega in dolgega fragmenta med različnimi metodami izolacije. Za prag uspešne pomnožitve smo določili vrednost  $Cq < 40$ , kot je opisano v smernicah MIQE (Bustin in sod., 2009). Med metodami izolacije ni bilo bistvenih razlik v pomnoževanju kratkih fragmentov. Post-hoc test je pokazal statistično značilno razliko v stopnji uspešnosti pomnoževanja med izolacijskim postopkom s kitom PeqLab brez demineralizacije in ostalimi izolacijskimi postopki tako v primeru svežih kosti ( $p < 0,001$ ) kakor tudi v primeru starih kosti ( $p < 0,001$ ).

Preglednica 4: Koncentracije DNA, vrednosti C<sub>q</sub> in njihovo razmerje ter uspešnost pomnoževanja fragmentov C<sub>q</sub>200

<i>Vrsta vzorca</i>	<i>Izolacijska metoda</i>	<i>N</i>	<i>Koncentracija (ng/μL)</i>	<i>Razmerje C<sub>q</sub>100/C<sub>q</sub>200</i>	<i>C<sub>q</sub>100</i>	<i>C<sub>q</sub>200</i>	<i>Stopnja uspešnosti C<sub>q</sub>200 (%)</i>	<i>p-vrednost – post-hoc test</i>
Tkivo	Standardni postopek	18	36,30 ± 13,91	1,04 ± 0,19	26,51 ± 6,27	25,15 ± 4,32	94,7	0,19
Sveže kosti	Kit PeqLab demineralizacije	18	25,43 ± 26,89	0,79 ± 0,05	28,54 ± 2,71	36,20 ± 3,69	61,1	0,00
Sveže kosti	Kit PeqLab demineralizacije	12	45,31 ± 20,59	0,75 ± 0,05	28,01 ± 2,17	37,03 ± 1,19	91,7	0,84
Sveže kosti	Kit QIAamp demineralizacije	8	16,15 ± 19,05	0,77 ± 0,03	27,80 ± 1,22	36,08 ± 2,52	87,5	0,48
Sveže kosti	Kit QIAamp demineralizacije	12	25,29 ± 15,39	0,90 ± 0,11	24,29 ± 2,46	26,94 ± 1,41	100	0,11
Stare kosti	Kit PeqLab demineralizacije	8	1,90 ± 1,69	0,80 ± 0,10	29,44 ± 3,41	35,56 ± 0,94	25	0,01
Stare kosti	Kit PeqLab demineralizacije	8	17,04 ± 19,84	0,74 ± 0,17	28,81 ± 7,56	37,45 ± 5,08	37,5	0,09
Stare kosti	Kit QIAamp demineralizacije	12	1,05 ± 0,76	0,74 ± 0,09	27,27 ± 5,58	35,25 ± 4,03	58,3	0,62
Stare kosti	Kit QIAamp demineralizacije	12	5,11 ± 5,61	0,93 ± 0,13	26,79 ± 3,31	31,22 ± 5,72	66,7	0,84

*N* – število vzorcev; *C<sub>q</sub>* – kvantifikacijski cikel, kjer reakcija doseže mejo detekcije

Opomba: za ugotavljanje razlik med posameznimi pari spremenljivk ( $\chi^2$  post-hoc test) smo upoštevali Bonferronijev popravek za večkratno testiranje, meja statistične značilnosti je bila postavljena na vrednost  $p < 0,01$ .

## 4.2 FRAGMENTNA ANALIZA MIKROSATELITOV

Za končni preizkus kakovosti izolirane DNA smo opravili fragmentno analizo na Sanger sekvenatorju SeqStudio. Za to analizo smo uporabili samo vzorce, izolirane z obema kitoma z in brez demineralizacijskega postopka. Opazili smo, da so se pri vzorcih DNA iz mišičnih tkiv in iz svežih kosti, izoliranih z demineralizacijskim postopkom (ob uporabi obeh kompletov reagentov), uspešno pomnožili vsi štiri krajši (80 do 100 bp, srednje (približno 150 bp) in dolgi fragmenti. Kakovostni parametri, kot sta višina vrhov (intenziteta signalov fluorescence) in prisotnost nespecifičnih signalov, so bili primerljivi med obema kitoma, vendar z manj opaženimi nespecifikami ob uporabi demineralizacijskega postopka. Pomnožitev starih vzorcev DNA je uspela le ob uporabi demineralizacijskega postopka za kratke in srednje fragmente, vendar pa pomnožitev fragmentov, daljših od 200 bp, ni bila uspešna. Vseeno smo opazili boljše pomnoževanje DNA pri uporabi izolacijskega kita QIAmp. Pomnožitev mikrosatelitnih lokusov za stare vzorce brez postopka demineralizacije je bila neuspešna v vseh treh kategorijah.

## 5 DISKUSIJA

Molekularni pristopi so postali pomemben del ekoloških in evolucijskih raziskav populacij prostoživečih živali. Orodja, ki temeljijo na analizi molekule DNA, so pomembno prispevala k našemu razumevanju biologije vse od identifikacije vrst in odkrivanja hibridizacije med vrstami (oz. filogenetskimi linijami) (Russello in sod., 2005) do iskanja genov, odgovornih za prilagoditve živali na heterogena okolja. Kljub številnim izboljšavam in aplikacijam pa genetika doslej ni aktivno vključena kot orodje za vrednotenje in izboljšanje upravljanja s populacijami tudi zaradi prepričanja, da so genetske študije drage in da je zbiranje vzorcev dolgotrajno in zahtevno.

Razvijanje in optimizacija molekularnih metod in pristopov v molekularni ekologiji sta v luči odgovornega raziskovanja in inovacij izrednega pomena, saj predstavljata možnost za vključevanje dognanj populacijske genetike v upravljalvske strategije ravnanja z ogroženimi vrstami kakor tudi lovnimi vrstami (Lundmark in sod., 2014). Posebno, kadar govorimo o lovnih vrstah, je sodelovanje med različnimi deležniki, kot so upravljavci, znanstveniki, odločevalci in tudi javnost, ključ do trajnostnega upravljanja s populacijami (Sandström in Lundmark, 2016). Reševanje problematike upravljanja s populacijami gre predvsem v smer oblikovanja novih naravovarstvenih strategij, ki naj bi vključevale tudi rezultate molekularne ekologije (genetskega monitoringa) (Schwartz, 2007). Molekularna ekologija prihodnosti mora vključevati principe odgovorne znanosti na področju varstvene biologije.

Ravno zaradi pomena hitrega in enostavnega vključevanja genetike na področje aktivnega upravljanja s populacijami je nujno treba razviti metodologijo izolacije in pomnoževanja molekule DNA iz dostopnih vzorcev. V magistrskem delu smo predstavili modifikacijo izolacijskega postopka za pridobivanje molekule DNA iz široko dostopnih vzorcev tako svežih kot starih kosti, ki se sistematično zbirajo zaradi interesov lovcev (npr. trofeje, lobanje z rogovji ali roglji) ali obveznosti lovskih družin (oddaja spodnjih čeljustnic odlovljenih parkljarjev za namene dokazovanja pravilnega odlova). Kosti so sestavljene iz strukturnih beljakovin, pretežno kolagena in približno 70 % anorganskih spojin, med katerimi prevladuje hidroksiapatit kalcijevega fosfata, ki predstavlja glavno fizično oviro za izolacijske reagentne in zato preprečuje sproščanje molekul DNA (Collins in sod., 2002; Gotherstrom in sod., 2002).

V nalogi smo testirali tri hipoteze. Potrditev oz. ovržba hipotez sledi v naslednjih podpoglavjih.

## 5. 1 KONCENTRACIJE DNA

Povprečne vrednosti koncentracij izolirane DNA, kot pričakovano, so bile najvišje pri izolaciji iz mišičnega tkiva. Povprečne koncentracije DNA iz svežih kosti so bile primerljive s koncentracijami DNA iz tkiva in bistveno višje kakor koncentracije iz starih kosti.

Uporaba demineralizacijskega postopka se je pri svežih kosteh pokazala kot pomemben dejavnik vpliva, boljši izkoristek in višji donos izolacije. Koncentracije izolirane DNA so bile z uporabo vseh izbranih metod dovolj visoke in primerljive s koncentracijami DNA, izolirane iz svežega tkiva. V povprečju so bile koncentracije DNA s cenovno dostopnejšim kitom nekoliko višje kakor koncentracije DNA, izolirane z dražjim komercialnim kitom, vendar te razlike ne predstavljajo bistvene prednosti, saj so bile vse koncentracije DNA precej višje od 5 ng/ $\mu$ L, kar predstavlja minimalno količino DNA, potrebno za nadaljnje genetske analize. Razlike v koncentraciji DNA pri svežih kosteh so lahko posledica razlike v gostoti kosti (Pinhasi in sod., 2015), mesta vzorčenja (zlasti v trofeji in rogovih), različne porazdelitve ohranjenosti DNA v celicah vzdolž kosti in variabilne posmrtno ohranitve DNA znotraj posameznih kosti. **Prvo hipotezo, ki pravi, da bo uporaba demineralizacijskega postopka pri svežih in starih kosteh bistveno vplivala na koncentracijo izolirane DNA, smo na podlagi rezultatov potrdili.**

Drugo hipotezo, ki pravi, da so metode enako uspešne ne glede na uporabljen izolacijski kit, smo prav tako potrdili, **saj je bil donos izolacije zadosten tako v primeru uporabe cenovno dostopnega kita kot dražjega in bolj specifičnega kita za izolacijo, vendar le v primeru uporabe demineralizacije.**

V povprečju so bile koncentracije izolirane DNA dovolj visoke, ko smo v postopku izolacije uporabili demineralizacijski postopek, tako v primeru cenovno dostopnega kita kakor v primeru uporabe dražjega komercialnega kita. Koncentracije DNA, izolirane iz starih kosti brez postopka demineralizacije, so bile pod sprejemljivo mejo 5 ng/ $\mu$ L, ne glede na uporabljeni izolacijski kit. Pri starih kosteh lahko razloge za razlike v koncentraciji DNA iščemo v majhni količini endogene DNA, ki je posledica razgradnje kostnega tkiva skozi čas.

Če ustrezno ne zaščitimo kosti, so te s časom podvržene mikrobiološki in encimski razgradnji. V tem procesu se večinoma razgrajuje kolagen in drugi nekolagenski proteini. Kljub morebitni zaščiti kosti pred mikrobiološko razgradnjo pa ne moremo vplivati na strukturne spremembe, ki se dogajajo v kosteh. Skozi čas spremembe v mineralni strukturi povzročijo ponovno kristalizacijo in tvorbo večjih mineralnih kristalov v kostnem tkivu ter tesnejše nalaganje mineraliziranega kolagena, ki ni podvržen encimski razgradnji.

Posledično se te spremembe odražajo v trdnejši kostni strukturi in slabši (težji) dostopnosti DNA molekul iz takšnega kostnega tkiva (Buckley in sod., 2014).

Obstajajo dokazi, da se razgradni procesi v starih kosteh razlikujejo in lahko povzročijo lokalizirane razlike v kostni strukturi: na primer kosti so manj kompaktne in bolj porozne na mestih pritrditve mišic (Hawkey in sod., 1995, Rollo in sod., 2002), zato je lahko ta lokacija bolj dovzetna za razpad, ki se s staranjem kosti povečuje, in posledično na koncentracijo DNA. Demineralizacijski postopek, kot pričakovano, zvišuje koncentracijo DNA, saj EDTA demineralizira kosti in inaktivira encim DNazo s keliranjem bivalentnih kationov, kot so magnezijevi in kalcijevi ioni (Loreille in sod., 2007).

Na splošno so naši laboratorijski poskusi pokazali, da so lahko arhivski vzorci kostnega tkiva dober vir DNA, če uporabimo optimizirano metodo izolacije DNA z demineralizacijskim postopkom. Pri starih kosteh z izolacijskimi metodami brez uporabe demineralizacijskega postopka dobimo zelo nizke koncentracije DNA ne glede na vrsto uporabljenega izolacijskega kita. Rezultati analiz koncentracij DNA tako kažejo, da je za doseganje dovolj visokih koncentracij DNA bistvenejšega pomena uporaba demineralizacijskega postopka kakor vrsta uporabljenega kita.

Za genetske analize je bistvenega pomena, da uporabljamo metode izolacije, ki nam omogočajo pridobiti zadostne količine DNA ustrezne čistosti in kakovosti. Za nadaljnje analize (PCR, sekveniranje, SNPs ...) je pomembno, da je koncentracija DNA čim višja in da DNA ni razgrajena na premajhne fragmente. Rezultati učinkovitosti pomnoževanja fragmentov kot tudi analiza mikrosatelitnih lokusov nam dodatno kažejo, da je izbira izolacijske metode pomembna, saj se visoko fragmentirana DNA težje ali pa sploh ne pomnožuje posebej, kadar govorimo o daljših fragmentih pri starih kosteh.

Vrsta uporabljenega vzorca, iz katerega izoliramo DNA, je pomemben dejavnik, ki vpliva na izbiro ustrezne metode izolacije. Mišično tkivo in biološki vzorci krvi so z vidika izolacije najmanj problematični zaradi dostopnosti in zadostne količine kakovostne DNA (Biase in sod., 2002). Medtem ko so neinvazivni viri vzorcev dednega materiala, kot na primer kosti in zobovje, metodološki izziv izolacije DNA, zaradi težje dostopnosti in morebitne razgradnje DNA.

## 5. 2 USPEŠNOST POMNOŽEVANJA FRAGMENTOV DNA

**Zadnja hipoteza, ki smo jo preverjali, se je nanašala na uspešnost pomnoževanja izolirane DNA. Potrdili smo, da se uspešnost pomnoževanja razlikuje glede na starost kosti.**



Za analizo uspešnosti pomnoževanja DNA fragmentov smo izbrali približno 100 bp in 200 bp dolg mikrosatelitni lokus. Razgradnjo vzorcev DNA smo določili z izračunom razmerja Cq za 100 bp/Cq za 200 bp. Za uspešnost pomnoževanja fragmenta smo privzeli minimalno vrednost  $Cq < 40$ .

Za sveže kosti so bile vrednosti razmerja Cq 100/Cq 200 najvišje pri pomnoženih produktih DNA, izoliranih s standardno metodo iz tkiva ter s kitom QIAmp z demineralizacijskim postopkom. Kvocienti so bili pri ostalih treh metodah (PeqLab brez demineralizacijskega postopka, PeqLab z demineralizacijskim postopkom in QIAmp brez demineralizacijskega postopka) bistveno nižji v primerjavi s kvocienti, dobljenimi s standardnim postopkom in kitom QIAmp z demineralizacijskim postopkom. V povprečju so bile pri svežih kosteh vse vrednosti Cq pod 40 tako za pomnožene produkte 100 bp kakor za produkte 200 bp. Kratki produkti 100 bp so se enako uspešno pomnoževali ne glede na uporabljeno metodo izolacije. Medtem ko je bila uspešnost pomnoževanja produktov 200 bp, izoliranih s kitom PeqLab brez postopka demineralizacije, bistveno nižja od uspešnosti pomnoževanja teh fragmentov, izoliranih z ostalimi metodami.

Rezultati za stare kosti so pokazali podobno kakor rezultati za sveže kosti. Vrednosti razmerja Cq 100/Cq 200 so bile znatno višje pri pomnoženih produktih DNA, izoliranih s kitom QIAmp z demineralizacijskim postopkom. Z vidika uspešnosti pomnoževanja fragmentov je bila uspešnost tako 100 bp kakor 200 bp nižja kakor pri svežih kosteh, čeprav so bile vrednosti Cq v povprečju nižje od 40. Na uspešnost pomnoževanja kratkih fragmentov ni bistveno vplivala metoda izolacije DNA. Za uspešnost pomnoževanja daljših fragmentov se je metoda izolacije s kitom PeqLab brez demineralizacijskega postopka izkazala kot neučinkovita. Na splošno je bila uspešnost pomnoževanja daljših fragmentov DNA, izolirane iz starih kosti, manj uspešna kakor pri svežih kosteh.

Glede na starost kosti je primerjava uspešnosti pomnoževanja izolirane DNA za kratke fragmente pokazala značilno razliko med pomnoženimi fragmenti starih kosti, izoliranimi s kitom PeqLab brez demineralizacijskega postopka in vsemi ostalimi pomnoženimi fragmenti. Daljši fragmenti so se najslabše pomnoževali pri starih kosteh s kitom PeqLab in bili v primerjavi z rezultati pomnoževanja daljših fragmentov, izoliranih z vsemi ostalimi metodami, značilno nižji ne glede na starost kosti.

Rezultati, pridobljeni v magistrskem delu, kažejo, da postopek demineralizacije zagotavlja pomembno prednost za uspešno izolacijo DNA iz degradiranih kosti. Poleg tega raziskave kažejo, da lahko že iz primerljivo majhnih količin začetnega materiala izoliramo zadostne količine DNA. Prednosti popolne demineralizacije so bile prvič dokazane v študiji Hagelberg in Clegg (Hagelberg in sod., 1991), kjer so demineralizirali vzorce kostnega prahu s spiranjem v EDTA, vendar so s spiranjem v vsakem koraku izgubili tudi nekaj DNA.

Ena od primarnih prednosti postopka, ki smo ga v našem eksperimentu uporabili, je, da se EDTA uporablja kot komponenta liznega pufra in tako ni izgube DNA s spiranjem z EDTA. Pokazali smo tudi, da je uporaba cenovno dostopnejšega kita z dodanim postopkom demineralizacije enostavna za izvedbo, z minimalno manipulacijo vzorcev in cenovno dostopna, kar je pomembno z vidika zmanjšane možnosti kontaminacije vzorcev in dostopnosti metode.

V nadaljevanju smo opravili kvalitativne analize za primerjavo med uspešnostjo izolacije in pomnoževanjem DNA iz kosti različnih starosti ter iz vzorcev tkiva. Optimizirana metoda izolacije z demineralizacijskim postopkom jasno kaže na povečanje kakovosti izoliranih fragmentov, še posebej v primeru starih trofejskih vzorcev. Izolacija kakovostnejše DNA je po vsej verjetnosti posledica povečane količine izolirane DNA, lahko pa tudi posledica kakovosti izolirane matrice. Popolna razgradnja kostnega tkiva, ki ga dosežemo s postopkom demineralizacije, dovoljuje dostop do večjih, ohranjenih fragmentov endogene DNA, ki so sicer zamrežene v izjemno gostih kristalnih agregatih kostne matrice. Uporaba optimizirane metode z demineralizacijskim postopkom nam tako omogoča pridobivanje zadostne količine kakovostne DNA iz izredno zahtevnih vzorcev, za katere so standardne metode izolacije neučinkovite.

## 6 ZAKLJUČEK

V skladu zastavljenimi cilji magistrskega dela smo na osnovi laboratorijskih poskusov pokazali, da lahko optimizacija postopka izolacije DNA z vpeljavo demineralizacijskega postopka bistveno poveča donos DNA tako iz svežih kakor iz starih kosti, ne glede na to, ali za izolacijo uporabimo cenovno dostopen set reagentov ali dražji komercialni kit. Zaradi pomembnosti izolacije DNA iz arhivskih vzorcev kosti in zobovja je bilo v preteklosti izvedenih kar nekaj raziskav, ki so se osredotočale na pomen razvoja in optimiziranja metod izolacije DNA iz tovrstnih težavnih vzorcev (Loreille in sod., 2007, Rohland in sod., 2007, Seo in sod., 2009, Nielsen in sod., 2017).

Z izboljšanjem izolacijske metode pridobivanja DNA iz kosti so nam tako na voljo poleg svežih široko dostopnih vzorcev tudi vzorci iz muzejskih zbirk, kar odpira dodatne možnosti retrospektivnih raziskav. Genetske analize retrospektivnih vzorcev nam ponujajo jasnejšo in temeljitejšo sliko o pretekli populacijski in vrstni dinamiki, ki lahko vpliva na upravljalne strategije ogroženih in lovnih vrst danes. Tako lahko s pomočjo starih vzorcev ugotavljamo vpliv fragmentacije habitata na genski pretok zaradi urbanizacije in človekove dejavnosti, zaznavamo prisotnost tujerodnih vrst in ugotavljamo hibridizacijo le-teh z avtohtonimi vrstami ali raziskujemo posledice upravljalnih odločitev iz preteklosti, kot so translokacije ali reintrodukcije vrst na določenih območjih.

Izolacijska metoda, opisana v tej nalogi, se lahko nameni tudi na druga raziskovalna področja, kot so raziskave arheozoologije in paleontologije. Tu velja poudariti, da se raziskovalna metodologija teh znanstvenih področij razvija predvsem v smeri sekvenciranja naslednje generacije (NGS-next generation sequencing), kjer je izolacija kakovostne DNA zaradi metodoloških postopkov in cene analize velikega pomena.

V skladu s smernicami odgovorne znanosti z uporabo cenejših in uspešnejših metod lahko genetski podatki postanejo dostopnejši širši javnosti in ravno ključnim odločevalcem in pripravljavcem strategij, po drugi strani pa uporaba vzorcev, ki so že na voljo in se redno zbirajo pod nadzorom pristojnih inštitucij in ministrstva, doprinese k etično smotrni uporabi genetskih virov ter predstavlja možnost boljšega nadzora nad odlovljenimi vrstami (npr. rutinsko določevanje spola in vrste živali).

## 7 LITERATURA IN VIRI

Allendorf, F. W.; Luikart, G.; Aitken, S. N., 2013. Conservation and the genetics of populations. Wiley-Blackwell

Alonso, A.; Anđelinoviae, Š.; Martín, P.; Sutloviae, D.; Erceg, I.; Huffine, E.; Fernández De Simón, L.; Albarrán, C.; Definis-Gojanoviae, M.; Fernández-Rodriguez, A.; García, P.; Drmiae, I.; Reiae, B.; Kuret, S.; Sancho, M.; Primorac, D., 2001. DNA Typing from Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples. *Croatian Medical Journal.*, 42:, 260–266

Anderson, C. D.; Epperson, B. K.; Fortin, M. J.; Holderegger, R.; James, P. M. A.; Rosenberg, M. S.; Scribner, K. T.; Spear, S., 2010. Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. *Molecular Ecology.*, 19:, 3565–3575

Ballantyne K. N., Salemi R., Guarino F., Pearson J. R., Garlepp S. F., van Oorschot R. A.H., 2015. DNA contamination minimisation – finding an effective cleaning method, *Australian Journal of Forensic Sciences*, 47:4, 428-439

Bernatchez, L.; Wellenreuther, M.; Araneda, C.; Ashton, D. T.; Barth, J. M. I.; Beacham, T. D.; Maes, G. E.; Martinsohn, J. T.; Miller, K. M.; Naish, K. A.; Ovenden, J. R.; Primmer, C. R.; Young Suk, H.; Therkildsen, N. O.; Withler, R. E., 2017. Harnessing the Power of Genomics to Secure the Future of Seafood. *Trends in Ecology & Evolution.*, 32:, 665–680

Biase, F. H., Maurício M. F., Luiz R. G., Robson C. A., 2002. Protocol for Extraction of Genomic DNA from Swine Solid Tissues. *Genetics and Molecular Biology* 25(3):313–15.

Brown, T. A., 2018. *Genomes* 4th ed. - New York ; London : Garland Science, cop.

Buckley, M.; Wadsworth, C., 2014. Proteome degradation in ancient bone: Diagenesis and phylogenetic potential. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology.*, 416:, 69–79

Bustin, S. A., 2010. Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE. *Methods.*, 50:, 217–226

Chilvers, E. R.; Bouwman, A. S.; Brown, K. A.; Arnott, R. G.; Prag, A. J. N. W.; Brown, T. A., 2008. Ancient DNA in human bones from Neolithic and Bronze Age sites in Greece and Crete. *Journal of Archaeological Science.*, 35:, 2707–2714

Colizzi, V.; Mezzana, D.; Ovseiko, P.; Caiati, G.; Colonnello, C.; Declich, A.; Alcantara, L. C.; Bielawski, K. P.; Buzan, E.; Djilianov, D.; Edmunds, L.; Elster, D.; Schmidr, E. K., 2018. Structural Transformation to Attain Responsible BIOSciences: Research protocol for a Horizon 2020 funded European multi-centre project to promote Responsible Research and Innovation (RRI), a learning process on RRI-oriented structural change, and an RRI model for biosciences. *Journal of Medical Internet Research*.

Collins, M. J. et al. 2002. "The Survival of Organic Matter in Bone: A Review." *Archaeometry* 44(3):383–94.

Coulon, A.; Cosson, J. F.; Angibault, J. M.; Cargnelutti, B.; Galan, M.; Morellet, N.; Petit, E.; Aulagnier, S.; Hewison, A. J. M., 2004. Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology*, 13:, 2841–2850

Deagle, B. E.; Eveson, J. P.; Jarman, S. N., 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples--a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3:, 11

Ellegren, H., 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Review Genetics*, 5(6): 435-445

Eglinton, G.; Logan, G. A., 1991. Molecular preservation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 333:, 315-27-8

Emaresi, G.; Pellet, J.; Dubey, S.; Hirzel, A. H.; Fumagalli, L., 2011. Landscape genetics of the Alpine newt (*Mesotriton alpestris*) inferred from a strip-based approach. *Conservation Genetics*, 12:, 41–50

Flagstad, Ø.; Røed, K. H., 2003. Refugial origins of reindeer (*Rangifer tarandus* l.) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 57:, 658–670

Flajšman, K.; Jerina, K.; Pokorny, B.; Yoccoz, N.; Adnoy, T.; Bieber, C., 2017. Age-related effects of body mass on fertility and litter size in roe deer. (Festa-Bianchet, M., Ed.) *PLOS ONE*, 12:, e0175579

Garner, B. A.; Hand, B. K.; Amish, S. J.; Bernatchez, L.; Foster, J. T.; Miller, K. M.; Morin, P. A.; Narum, S. R.; O'Brien, S. J.; Roffler, G.; Templin, W. D.; Sunnucks, P.; Strait, J.; Warheit, K. I.; Seamons, T. R.; Wenburg, J.; Olsen, J.; Luikart, G., 2016. Genomics in

Conservation: Case Studies and Bridging the Gap between Data and Application. *Trends in Ecology & Evolution.*, 31:, 81–83

Gotherstrom, A., M. J. Collins, A. Angerbjorn, and K. Liden. 2002. "Bone Preservation and DNA Amplification." *Archaeometry* 44(3):395–404.

Hagelberg, E.; Clegg, J. B., 1991. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.*, 244:, 45–50

Handt, O.; Höss, M.; Krings, M.; Pääbo, S., 1994. Ancient DNA: Methodological challenges. *Experientia.*, 50:, 524–529

Handt, O.; Krings, M.; Ward, R. H.; Pääbo, S., 1996. The retrieval of ancient human DNA sequences. *American journal of human genetics.*, 59:, 368–376

Hautier, Y.; Tilman, D.; Isbell, F.; Seabloom, E. W.; Borer, E. T.; Reich, P. B., 2015. Anthropogenic environmental changes affect ecosystem stability via biodiversity. *Science.*, 348:, 336–340

Hawkey, D. E.; Merbs, C. F., 1995. Activity-induced musculoskeletal stress markers (MSM) and subsistence strategy changes among ancient Hudson Bay Eskimos. *International Journal of Osteoarchaeology.*, 5:, 324–338

Hedric, P.W., 2011, *Genetics of populations*. Boston, Jones and Barllet publishers

Holderegger, R.; Kamm, U.; Gugerli, F., 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology.*, 21:, 797–807

Jakubowska, J.; Maciejewska, A.; Pawłowski, R., 2012. Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *International Journal of Legal Medicine.*, 126:, 173–178

Jerina, K.; Jonozovič, M.; Krofel, M.; Skrbinšek, T., 2013a. Range and local population densities of brown bear *Ursus arctos* in Slovenia. *European Journal of Wildlife Research.*, 59:, 459–467

Jerina, K.; Stergar, M.; Pokorny, B.; Jelenko, I.; Miklavčič, V.; Bartol, M.; Marolt, J., 2013b. določitev najbolj primernih kazalnikov za spremljanje stanja populacij divjadi in njihovega okolja pri adaptivnem upravljanju. zaključno poročilo projekta v4-1146. Ljubljana

Kaestle, F. A.; Horsburgh, K. A., 2002. Ancient DNA in anthropology: Methods, applications, and ethics. *American Journal of Physical Anthropology.*, 119:, 92–130

King, C. E.; Debruyne, R.; Kuch, M.; Schwarz, C.; Poinar, H. N., 2009. A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *BioTechniques.*, 47:, 941–949

Kumar, G.; Narayan, B., 2014. Morbidity at Bone Graft Donor Sites. *Classic Papers in Orthopaedics*. Springer London, London, pp. 503–505

Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.*, 362:, 709–715

Loreille, O. M.; Diegoli, T. M.; Irwin, J. A.; Coble, M. D.; Parsons, T. J., 2007b. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics.*, 1:, 191–195

Lundmark, C., Simon M., Sandström A., 2014. Adaptive Co-Management: How Social Networks, Deliberation and Learning Affect Legitimacy in Carnivore Management. *European Journal of Wildlife Research* 60(4):637–44.

Martini, F.; Bartholomew, E. F., 2010. *Essentials of anatomy & physiology*. Benjamin Cummings

Mitchell, D.; Willerslev, E.; Hansen, A., 2005. Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.*, 571:, 265–276

Morin, P. A.; Chambers, K. E.; Boesch, C.; Vigilant, L., 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology.*, 10:, 1835–1844

Niedziałkowska, M.; Hundertmark, K. J.; Jędrzejewska, B.; Niedziałkowski, K.; Sidorovich, V. E.; Górny, M.; Veeroja, R.; Solberg, E. J.; Laaksonen, S.; Sand, H.; Solovyev, V. A.; Shkvyria, M.; Tiainen, J.; Okhlopkov, I. M.; Juškaitis, R.; Done, G.; Borodulin, V. A.; Tulandin, E. A.; Jędrzejewski, W., 2014. Spatial structure in European moose (*Alces alces*): genetic data reveal a complex population history. (Stewart, J., Ed.) *Journal of Biogeography.*, 41:, 2173–2184

Nielsen, E. E.; Morgan, J. A. T.; Maher, S. L.; Edson, J.; Gauthier, M.; Pepperell, J.; Holmes, B. J.; Bennett, M. B.; Ovenden, J. R., 2017. Extracting DNA from 'jaws': high yield and quality from archived tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) skeletal material. *Molecular Ecology Resources.*, 17:, 431–442

Owen, R. (Richard J. .; Bessant, J. R.; Heintz, M., 2013. Responsible innovation. Managing the Responsible Emergence of Science and Innovation in Society. (Owen, R. (Richard J. ., J. R. Bessant & M. Heintz, Eds.). A John Wiley and Sons Ltd. Publications, Chichester

Pääbo, S.; Poinar, H.; Serre, D.; Jaenicke-Després, V.; Hebler, J.; Rohland, N.; Kuch, M.; Krause, J.; Vigilant, L.; Hofreiter, M., 2004a. Genetic Analyses from Ancient DNA. *Annual Review of Genetics.*, 38:, 645–679

Palsboll, P.; Berube, M.; Allendorf, F., 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution.*, 22:, 11–16

Pertoldi, C.; Hansen, M. M.; Loeschcke, V.; Madsen, A. B.; Jacobsen, L.; Baagoe, H., 2001. Genetic consequences of population decline in the European otter (*Lutra lutra*): an assessment of microsatellite DNA variation in Danish otters from 1883 to 1993. *Proceedings. Biological sciences.*, 268:, 1775–1781

Pinhasi, R.; Fernandes, D.; Sirak, K.; Novak, M.; Connell, S.; Alpaslan-Roodenberg, S.; Gerritsen, F.; Moiseyev, V.; Gromov, A.; Raczky, P.; Anders, A.; Pietruszewsky, M.; Rollefson, G.; Jovanovic, M.; Trinhhoang, H.; Bar-Oz, G.; Oxenham, M.; Matsumura, H.; Hofreiter, M., 2015. Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone. (Petraglia, M. D., Ed.)*PLOS ONE.*, 10:, e0129102

Poinar, H. N.; Schwarz, C.; Qi, J.; Shapiro, B.; Macphee, R. D. E.; Buigues, B.; Tikhonov, A.; Huson, D. H.; Tomsho, L. P.; Auch, A.; Rapp, M.; Miller, W.; Schuster, S. C., 2006. Metagenomics to Paleogenomics: Large-Scale Sequencing of Mammoth DNA. *Science.*, 311:, 392–394

Randi, E., 2005. Management of Wild Ungulate Populations in Italy: Captive-Breeding, Hybridisation and Genetic Consequences of Translocations. *Veterinary Research Communications.*, 29:, 71–75

Rohland, N.; Hofreiter, M., 2007a. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols.*, 2:, 1756–1762



Rohland, N.; Hofreiter, M., 2007c. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques.*, 42:, 343–352

Rollo, F.; Ubaldi, M.; Marota, I.; Luciani, S.; Ermini, L., 2002. DNA Diagenesis: Effect of Environment and Time on Human Bone. *Ancient Biomolecules.*, 4:, 1–7

Russello, M. A.; Glaberman, S.; Gibbs, J. P.; Marquez, C.; Powell, J. R.; Caccone, A., 2005. A cryptic taxon of Galápagos tortoise in conservation peril. *Biology Letters.*, 1:, 287–290

Sandström, A., and Carina, L.; 2016. Network Structure and Perceived Legitimacy in Collaborative Wildlife Management. *Review of Policy Research* 33(4):442–62.

Schwartz, M. K.; Luikart, G.; Waples, R. S., 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology & Evolution.*, 22:, 25–33

Seo, S. B.; Zhang, A.; Kim, H. Y.; Yi, J. A.; Lee, H. Y.; Shin, D. H.; Lee, S. D., 2009. Technical note: Efficiency of total demineralization and ion-exchange column for DNA extraction from bone. *American Journal of Physical Anthropology.*, 141:, NA-NA

Shapiro, B.; Drummond, A. J.; Rambaut, A.; Wilson, M. C.; Matheus, P. E.; Sher, A. V; Pybus, O. G.; Gilbert, M. T. P.; Barnes, I.; Binladen, J.; Willerslev, E.; Hansen, A. J.; Baryshnikov, G. F.; Burns, J. A.; Davydov, S.; Driver, J. C.; Froese, D. G.; Harington, C. R.; Keddie, G. et al., 2004. Rise and fall of the Beringian steppe bison. *Science (New York, N.Y.)*, 306:, 1561–1565

Skrbinšek, T.; Jelenčič, M.; Waits, L.; Kos, I.; Jerina, K.; Trontelj, P., 2012. Monitoring the effective population size of a brown bear (*Ursus arctos*) population using new single-sample approaches. *Molecular Ecology.*, 21:, 862–875

Stephenson, F. H. 2016. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. 3rd ed. London: Elsevier Science.

Šprem, N.; Buzan, E., 2016. The genetic impact of chamois management in the dinarides. *The Journal of Wildlife Management.*, 80:, 783–793

Pravilnik o sprejemu letnih načrtov lovsko upravljavskih območij v Republiki Sloveniji za leto 2010, Ur. l. RS, št. 41/2010

Von Schomberg, R., 2011. Towards Responsible Research and Innovation in the Information and Communication Technologies and Security Technologies Fields. SSRN Electronic Journal.

Wandeler, P.; Hoeck, P. E. A.; Keller, L. F., 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution.*, 22:, 634–642

Wang, I. J., 2011. Choosing appropriate genetic markers and analytical methods for testing landscape genetic hypotheses. *Molecular Ecology.*, 20:, 2480–2482

Wisely, S. M.; Maldonado, J. E.; Fleische, R. C., 2004. A technique for sampling ancient DNA that minimizes damage to museum specimens. *Conservation Genetics.*, 5:, 105–107

Yang, D. Y.; Eng, B.; Saunders, S. R., 2003. Hypersensitive PCR, Ancient Human mtDNA, and Contamination. *Human Biology.*

Zachos, F. E.; Hartl, G. B.; Suchentrunk, F., 2007. Fluctuating asymmetry and genetic variability in the roe deer (*Capreolus capreolus*): a test of the developmental stability hypothesis in mammals using neutral molecular markers. *Heredity.*, 98:, 392–400

Zachos, F. E.; Hartl, G. B., 2011. Phylogeography, population genetics and conservation of the European red deer *Cervus elaphus*. *Mammal Review.*, 41:, 138–150

Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology.*, 11:, 1–16

Zipper, H.; Brunner, H.; Bernhagen, J.; Vitzthum, F., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research.*, 32:, e103–e103

[www.ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/h2020-section/science-and-society](http://www.ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/h2020-section/science-and-society). The European Commission's priorities. Dostopano: 15. 1. 2019

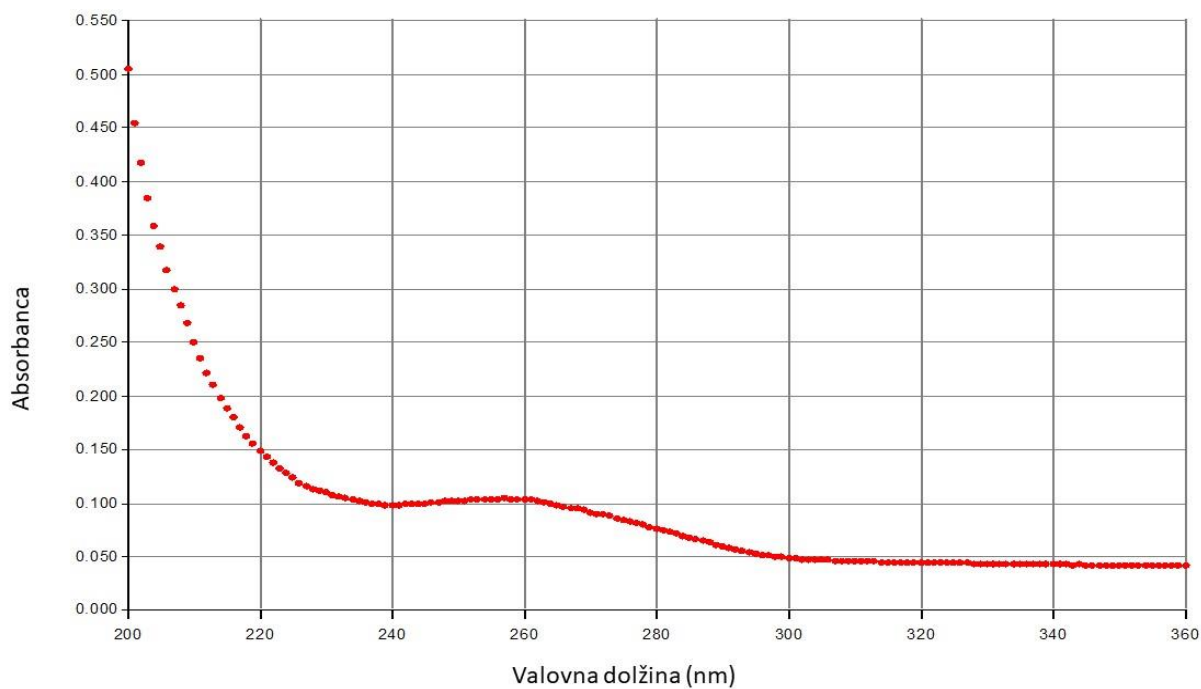
## **PRILOGE**

**PRILOGA A: Rezultati meritev koncentracije in čistoče na spetkofotometru Epoch.**

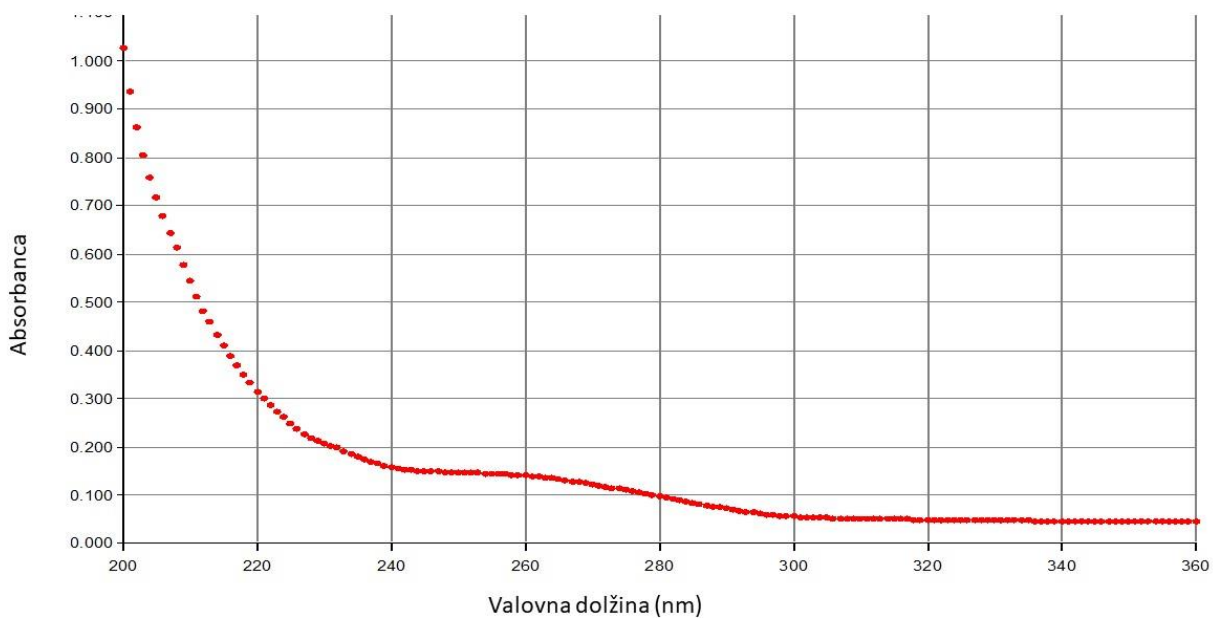
Preglednica 1: Rezultati meritev koncentracije in čistoče a spektrofotometru Epoch (BioTeck)

Vzorec	vrsta	Tip tkiva	surovi podatki 260nm	surovi podatki 280 nm	Surovi podatki 320nm	A260	A280	Čistoča DNA (260/280)	c (ng/μL)
RR1	<i>R. rupicapra</i>	tkivo	0,079	0,066	0,048	0,028	0,016	1,749	18,8
RR2	<i>R. rupicapra</i>	sveža kost	0,11	0,082	0,048	0,062	0,033	1,859	27,8
RR3	<i>R. rupicapra</i>	stara kost (80 let)	0,146	0,101	0,047	0,102	0,055	1,854	1,15
SS1	<i>S. scrofa</i>	Tkivo	0,105	0,078	0,046	0,059	0,032	1,857	33,4
SS2	<i>S. scrofa</i>	sveža kost	0,128	0,105	0,074	0,054	0,031	1,745	17,4
SS3	<i>S. scrofa</i>	stara kost (100 let)	0,112	0,095	0,065	0,046	0,03	1,556	0,66
CC1	<i>C. capreolus</i>	tkivo	0,093	0,076	0,05	0,043	0,026	1,65	51,2
CC2	<i>C. capreolus</i>	sveža kost	0,14	0,096	0,049	0,096	0,049	1,948	25,3
CC3	<i>C. capreolus</i>	stara kost (20 let)	0,098	0,082	0,054	0,045	0,028	1,614	6,73
CI1	<i>Capra ibex</i>	sveža kost	0,117	0,099	0,074	0,043	0,025	1,755	1,58
CI2	<i>Capra ibex</i>	stara kost (30 let)	0,136	0,12	0,088	0,049	0,032	1,509	0,76

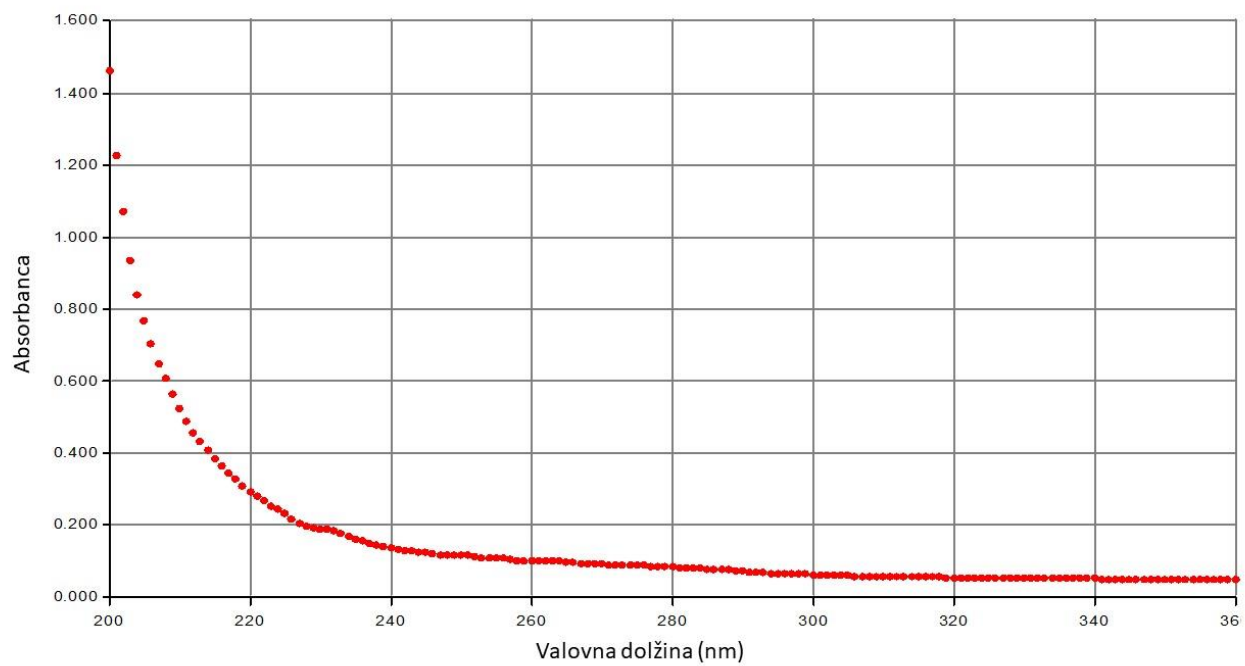
**PRILOGA B: Prikaz spektralnih krivulj na primeru vzorcev divjega prašiča (tkivo, sveža kost, stara kost)**



Slika 1: Spektralna krivulja izolirane DNA iz tkiva divjega prašiča

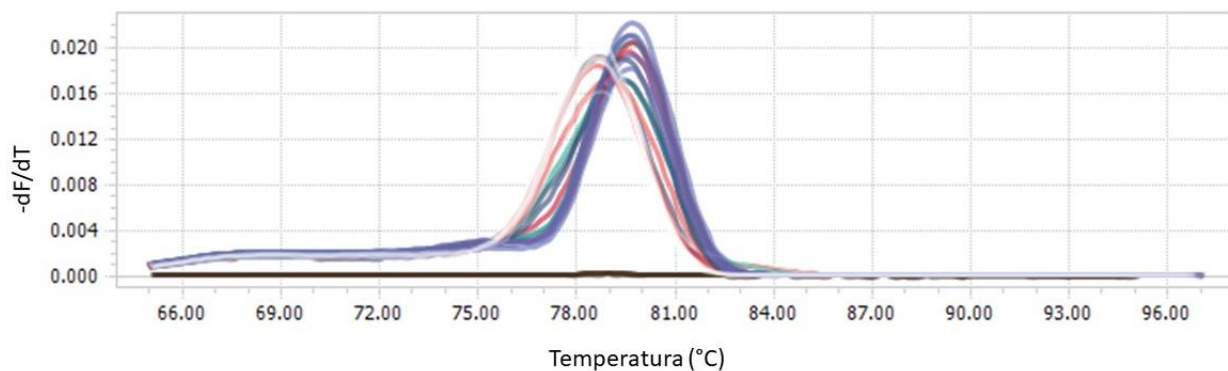


Slika 2: Spektralna krivulja izolirane DNA iz sveže kosti divjega prašiča

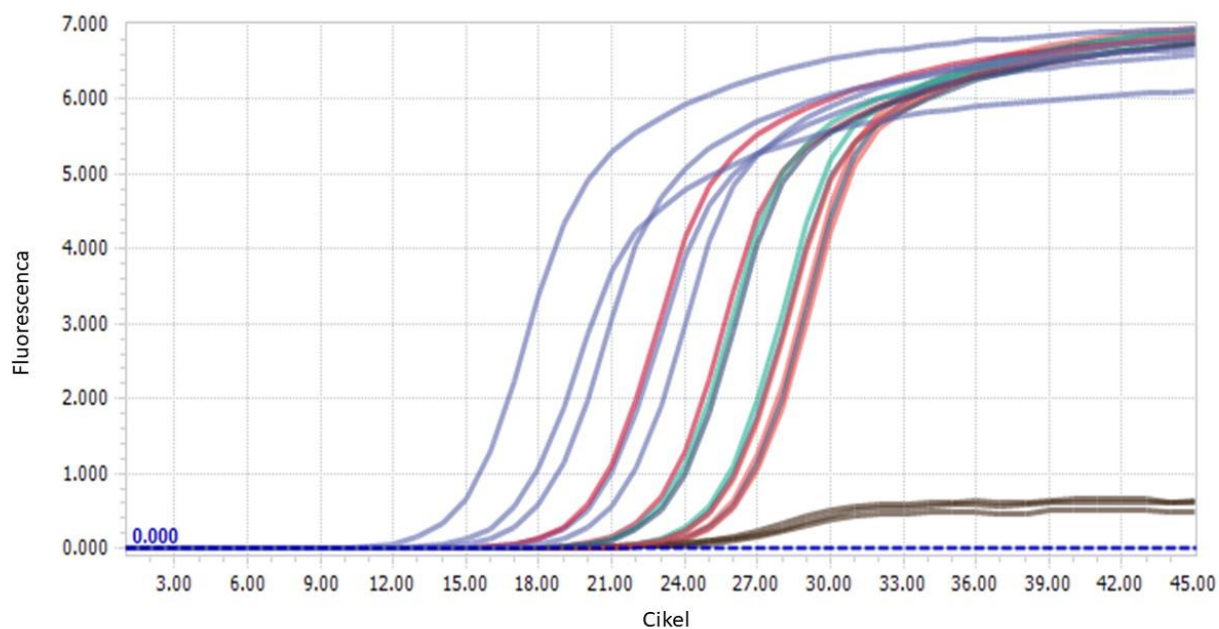


Slika 3: Spektralna krivulja izolirane DNA iz 100 let stare kosti divjega prašiča

**PRILOGA C : Grafični prikaz analize talilne temperature in kvantifikacijskih krivulj qPCR reakcije na primeru fragmenta OarFCR304 za vrsto *Rupicapra rupicapra*.**



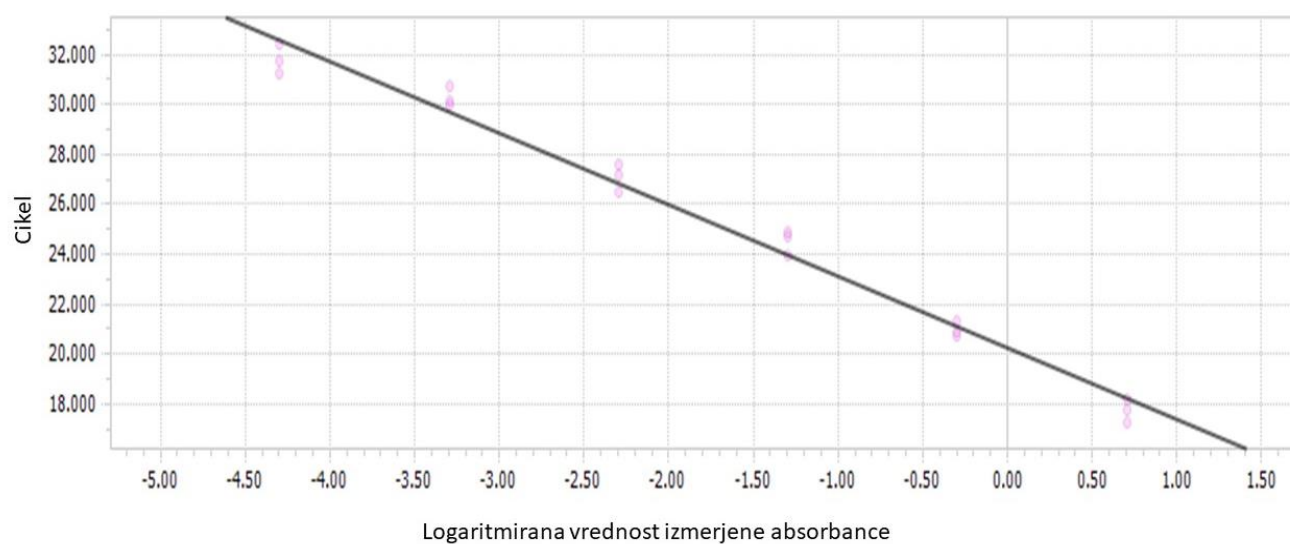
Slika 1: Grafični prikaz analize talilne temperature (angl. Melting temperature analysis). Iz grafa je razvidno, da se je pomnožev samo en tarčni fragment, brez vidnih nespecifičnih ali primer dimerov.



Slika 2: Grafični prikaz kvantifikacijskih krivulj za meritev koncentracije PCR produkta v realnem času na primeru fragmenta Oar FCB304

**PRILOGA D : Enačba in grafični prikaz standardne krivulje izpeljanih verižnih reakcij s polimerazo v realnem času**

Ime gena	OarFCB 304
Naklon	-2,8794
Učinkovitost pomnoževanja po ciklu	2,22
Napaka	0,67
R <sup>2</sup>	0,98
Y-stičišče	20,2
Enačba krivulje	$y = -2,88x + 20,2$



Slika 1: Grafični prikaz standardne krivulje. Krivulja prikazuje logaritmirane izmerjene absorbance treh ponovitev šestih zaporednih redčitev z redčitvijo 1:10. Neredčen standard 1 je vseboval 5ng DNA zaporedne redčitve so si sledile: 0,5ng, 0,05ng, 0,005 ng, 0,0005ng in 0,00005ng.