

Veterinarski fakultet
Sveučilište u Zagrebu

NINA GEMBAROVSKI i MARTINA ĐURČEVIĆ

**Analiza srodnosti dinarske populacije
euroazijskog risa (*Lynx lynx*) pomoću mikrosatelitskih markera**

Zagreb, 2012.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Magde Sindičić i doc. dr. sc. Tomislava Gomerčića, u sklopu znanstvenog projekta Zdravstveni nadzor divljači (053-0532400-2398) voditelja prof. dr. sc. Alena Slavice i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2011./2012.

Popis kratica

SSRs - simple sequence repeats

STRs - short tandem repeats

ID – oznaka jedinke

Sadržaj

Uvod	1
Hipoteza	3
Materijali i metode	4
Rezultati	5
Rasprava	13
Zaključak:.....	14
Popis literature.....	15
Sažetak	18
Summary	19

Uvod

Euroazijski ris (*Lynx lynx*, Linnaeus 1758) po sistematici spada u razred sisavaca (*Mammalia*), red zvijeri (*Carnivora*), porodicu mačaka (*Felidae*), potporodicu pravih mačaka (*Felinae*). Risovi su teritorijalne životinje, žive samostalno te kontakt s drugim jedinkama svoje vrste ostvaruju samo za vrijeme parenja. Parenje euroazijskih risova odvija se od veljače do travnja, a nakon 69 dana gravidnosti ženka okoti od jedan do četiri slijepa mladunca. Ženke su spolno zrele s 10 do 20 mjeseci, a mužjaci s 30 mjeseci života. Životni vijek risova je do 18 godina ali u prirodi većina jedinki nastrada u prvoj ili drugoj godini života (KVAM, 1990., KVAM, 1991.).

Autohtone populacije euroazijskog risa u Europi nastanjuju područje Fenoskandinavije, Baltika, Karpata i jugoistok Balkanskog poluotoka, te postoji nekoliko izoliranih, reintroduciranih populacija u zapadnoj i jugozapadnoj Europi (LINNELL i sur., 2007.). Populacija risa u Dinaridima također je nastala reintrodukcijom. Krajem 19. stoljeća ris je izumro iz većeg dijela zapadne Europe, te je posljednja jedinka iz autohtone populacije risova u Hrvatskoj odstrijeljena 1903. godine (KORITNIK, 1974.). Današnja populacija razvila se iz šest jedinki koje su 1973. godine naseljene iz slovačkih Karpata u Sloveniju, odakle se populacija proširila u Hrvatske te Bosnu i Hercegovinu (FRKOVIĆ, 1998.). Danas u Hrvatskoj stanište euroazijskog risa sačinjavaju šumovita brdsko-planinska područja Dinarida, od hrvatsko - slovenske granice na sjeverozapadu do granice s Bosnom i Hercegovinom na jugoistoku. Područje stalne rasprostranjenosti risa u Hrvatskoj iznosi 9573.4 km², a povremenog 1748.9 km² (SINDIČIĆ i sur., 2010.).

Euroazijski ris pripada u skupinu najugroženijih sisavaca Republike Hrvatske, te je zaštićen Zakonom o zaštiti prirode (NN 70/05), Pravilnikom o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 7/06), te nekoliko međunarodnih ugovora i konvencija. Smatra se da današnju populaciju euroazijskog risa u Hrvatskoj čini najviše 40 do 60 jedinki čime je populacija opet dovedena na sam rub opstanka (SINDIČIĆ i sur., 2010.). Uz krivolov, nedostatak plijena te fragmentaciju staništa, niska genska raznolikost smatra se najvažnijim uzrokom pada brojnosti risa u Dinaridima (SINDIČIĆ i sur., 2010.; SINDIČIĆ, 2011.).

Genska raznolikost se opisuje kao udio heterozigotnih lokusa ili alela na svakom lokusu (HEDRICK, 2000.). Ovisna je o broju novih mutacija po nukleotidnom lokusu i o

efektivnoj veličini populacije odnosno o broju jedinki koje se razmnožavaju u populaciji. S obzirom na to populacije koje imaju male efektivne veličine imaju i nisku gensku raznolikost (ELLEGGREN, 2009a.; ELLEGGREN, 2009b.). Genetski markeri su osnovni alat za istraživanje genske raznolikosti, te pomoću njih određujemo prisutnost određenih alela u populaciji (CONNER i HARTL, 2004.). Jedan od neutralnih markera koji se najčešće koriste za istraživanje genske raznolikosti, a ujedno služe i za identifikaciju jedinki te određivanje roditeljstva su mikrosateliti. Mikrosatelitski lokusi (na engleskom se još nazivaju i simple sequence repeats – SSRs i short tandem repeats - STRs) su dijelovi jezgrine DNA u kojima se uzastopce ponavljaju od jedan do šest parova baza. Aleli različitih dužina, odnosno različiti broj ponavljanja nukleotida posljedica su raznolikosti mikrosatelita (GOODWIN i sur., 2007.). Mikrosateliti čine veliki dio nekodirajuće DNA, odnosno vrlo ih rijetko pronalazimo u regijama koje kodiraju sintezu proteina (LI i sur., 2002.). Izuzetno su korisni u određivanju srodstva među jedinkama jer su zbog čestih mutacija na lokusima jako polimorfni, ne kodiraju proteine i kodominantni su, odnosno možemo razlikovati heterozigote od homozigota (JEFFREYS i sur., 1985.; NAKAMURA i sur., 1987.; WEISSENBACH i sur., 1992.; FREDHOLM i WINTERØ, 1996a.; FREDHOLM i WINTERØ, 1996b.; ASHWORTH i sur., 1998.; SIGNER i sur., 1998.; KASHI i SOLLER, 1999.). Kraći mikrosateliti, niski polimorfizam i heterozigotnost karakteristični su za vrste s visokom razinom parenja u srodstvu i niskom brojnošću populacije (DEWOODY i AVISE, 2000.; NEFF i GROSS, 2001.). Populacije proizašle iz malog broja osnivača (poput Dinarske populacije) karakterizirane su velikim gubitkom genske raznolikosti te posljedičnim padom sposobnosti preživljavanja zbog parenja u srodstvu (HEDRICK, 2000.; FRANKHAM i sur., 2002.). Genska raznolikost je važna za sposobnost prilagodbe na promjene u okolišu i ona u biti predstavlja evolucijski potencijal vrste.

Istraživanje srodnosti divljih životinja nam daje uvid u odnos jedinki u populaciji, te objašnjava njihovo ponašanje i socijalnu strukturu (RALLS i sur., 2001). Međusobna povezanost životinja u srodstvu ima veliki utjecaj na društvenu strukturu koja zatim utječe na teritorijalnost, socijalno ponašanje i rasprostranjenost (GOMPPER i sur., 1998.).

Najranija i konceptualno najlakše izvediva metoda analize srodnosti je metoda isključenja koja se temelji na Mendelovom pravilu nasljeđivanja. U primjeru majke homozigota AA i oca koji je heterozigot AC, zaključujemo da ovaj par ne može biti roditelj potomku koji ima genotip AB, dok potencijalne očeve koji imaju genotip BC ne možemo

isključiti. Ova metoda je najkorisnija kada imamo nekoliko roditeljskih kandidata i kada su dostupni visoko polimorfni genetski markeri. Stoga se rijetko koristi kod većeg broja roditeljskih kandidata jer je potreban veći broj lokusa da bi se potencijalni pojedinačni roditelj dodijelio potomku (JONES i ARDREN, 2003.). Mana ove metode jest da zbog pogrešaka genotipizacije može dati lažne rezultate (JONES i ARDREN, 2003.).

Metoda nazvana kategorična distribucija (alokacija) koristi pristup temeljen na vjerojatnosti selekcije najvjerojatnijeg roditelja iz skupine neisključenih roditelja (roditelji se isključuju na temelju Mendelovih pravila). Metoda uključuje izračun logaritma vjerojatnosti (LOD). LOD se računa tako da se vjerojatnost da je jedinka (ili par jedinki) roditelj određenom potomku podijeli s vjerojatnosti da te jedinice (potencijalni roditelj i potomak) nisu u srodstvu. Nakon procjene svih genetski mogućih roditelja, roditeljima se smatraju oni s najvišim LOD-om (JONES i ARDREN, 2003.).

Rekonstrukcija roditeljstva je metoda koja se koristi za određivanje genotipa nepoznatog roditelja pri čemu je genotip jednog roditelja poznat. Određuje se minimalan broj mogućih roditeljskih genotipova koji se poklapaju s genotipom potomka (JONES, 2001.).

Hipoteza

Cilj našeg istraživanja je utvrditi da li se mikrosatelitski lokusi mogu koristiti za istraživanje srodnosti kod Dinarske populacije euroazijskog risa. Naime to je populacija koja se pari u srodstvu, očituje nisku gensku raznolikost te nizak polimorfizam alela mikrosatelitskih lokusa. Zbog toga je za utvrđivanje roditeljstva potrebna analiza velikog broja lokusa, te kombinacija različitih metoda koje osim genotipova u obzir uzimaju i biološke podatke o vrsti. Također cilj ovog rada je istražiti koji od dostupnih kompjuterskih programa je najprikladniji za analizu srodnosti kod Dinarske populacije risa.

Materijali i metode

U istraživanju smo koristile genotipove 19 mikrosatelitskih lokusa 91 jedinke euroazijskog risa iz Dinarske populacije (Hrvatska, Slovenija, Bosna i Hercegovina). Genotipove smo preuzele uz odobrenje autora iz doktorskih disertacija SINDIČIĆ (2011.) i POLANC (2012.). Na temelju podataka dobivenih praćenjem jedinki pomoću radiotelemetrijskih ogrlica bilo nam je poznato da su jedinke Ivan i Ana brat i sestra, da je L06 majka L05, da je 435Y majka H002 i 600Y, te da je 594Y majka jedinkama CC0J3E i CC0J3C (KROFEL i sur., 2006.; SLIJEPČEVIĆ, 2008.; SLIJEPČEVIĆ i sur., 2009.; POLANC, 2012.). Uzorci potječu iz razdoblja od 1974. do 2010. godine, dok smo istraživanje potencijalnih roditelja i srodnosti napravile za 29 životinja čiji uzorci su prikupljeni u razdoblju od 2000. do 2010. godine. Istraživanje smo provele upotrebom tri računalna programa, te smo usporedile dobivene rezultate.

Prvi program koji smo koristile je GIMLET v 1.3.3 (VALIERE, 2002.) koji na temelju Mendelovih zakona o nasljeđivanju alela određuje srodnost jedinki. GIMLET parove potomak-roditelj spaja na temelju podudarnosti alela i demografskih podataka. Program za svakog potomka pregledava sve potencijalne roditelje, te ukoliko istraživani potomak i potencijalni roditelj imaju jedan zajednički alel na svakom genotipiziranom mikrosatelitu, mogućnost roditeljstva se dodatno provjerava pomoću podataka o spolu i dobi jedinke, te podataka o reprodukciji vrste. Kao ulazne podatke koristile smo GENPOP dokument s genotipovima 91 risa. U postavkama programa kao pozitivan rezultat prihvatile smo i parove roditelj – potomak s jednim nekompatibilnim lokusom. Za lokuse koji nisu uspješno genotipizirani, tj. kada u genotipu jedinke nedostaju aleli za određeni lokus, odredile smo da se program prema tim lokusima odnosi kao da imaju bilo koji alel. Za svaki od 91 genotipova naveli smo da li je određena jedinka potomak (jedinke rođene nakon 2000. godine), roditelj (jedinke rođene prije 2000. godine) ili može biti oboje (npr. za jedinke rođene 2000. smo istraživali potencijalne roditelje, no one su ujedno mogle biti roditelj jedinkama rođenim 2008. godine). Također smo u program unijele dokument koji sadrži godinu rođenja i smrti (ukoliko su poznati), te spol svih istraživanih jedinki. U programu smo definirale da mužjaci postaju spolno zreli s tri, a ženke s dvije godine, uz varijaciju od šest mjeseci.

Analizu srodnosti smo provele i pomoću programa CERVUS v 3.0.3 (MARSHALL i sur., 1998.; KALINOWSKI i sur., 2007.) koji koristi metodu kategorične distribucije. Prvi

korak je simulacija analize roditelja kojom se dobije granična vrijednost za vjerojatnost roditeljstva (LOD). Program na temelju podataka o frekvencijama alela našeg uzorka, generira genotipove jednog zamišljenog para roditelja, njihove potomke, te nasumične genotipove jedinki. U postavkama programa za simulaciju analize roditelja koristile smo slijedeće parametre: broj simuliranih potomaka 100 000, broj potencijalnih majki tj. očeva 30, pri čemu smo postavili da je uzorkovano 10% potencijalnih majki/očeva. Za svakog zamišljenog potomka program računa vjerojatnost roditeljstva (LOD) za stvarne roditelje te vjerojatnost roditeljstva za nasumične jedinke. Potom odredi koje jedinke imaju najveću vjerojatnost roditeljstva (to mogu biti stvarni roditelji ili neki od nasumičnih) te zabilježi LOD. Usporedbom LOD za potomke kod kojih su stvarni roditelji imali najviši LOD i za potomke kod kojih su neki od nasumičnih kandidata (koji nisu stvarni roditelji) imali najviši LOD, dobije se granica pouzdanosti za LOD. Programom smo zatim napravile analizu za 29 istraživanih jedinki, s time da smo u ulaznim podacima definirale spol potencijalnih roditelja.

Treći program koji smo koristile u analizi srodnosti je COLONY (JONES i WANG, 2010.). Program osim analize roditelja, radi i analizu moguće braće i sestara koji dijele jednog ili oba roditelja. Tijekom analize program istraživane potomke, te potencijalne majke i očeve, spaja u obiteljske skupine. Pretpostavlja se da potomci unutar obitelji dijele jednog ili oba roditelja, dok potomci iz dvije obitelji nisu u srodstvu. Programski algoritam zatim računa vjerojatnost pedigreea unutar obitelji, te ga uspoređuje s vjerojatnosti drugog pedigreea, da bi utvrdio skupinu s najvećom vjerojatnošću. Kao ulazne podatke u program smo unijele genotipove i spol svih jedinki, grešku genotipiziranja svakog lokusa (preuzeto iz SINDIČIĆ (2011.) te POLANC (2012.)), poznate parove roditelj - potomak, brat - sestra, te za svakog potomka popis jedinki koje na temelju podataka o godini rođenja i smrti isključujemo kao potencijalne roditelje.

Rezultati

Pomoću programa GIMLET dobile smo potencijalnog roditelja za deset (34,5 %) od 29 istraživanih jedinki risa, dok je program za njih šestero pronašao i potencijalni par roditelja (Tablica 1).

Tablica 1. Rezultati analize pomoću programa GIMLET; potomci i potencijalni roditeljima te par roditelja

Potomak	Potencijalni roditelji (podudarnost u broju mikrosatelita)	Potencijalni par roditelja
037Y	436Y (19/19)	436Y / R48
	592Y (18/19)	
	CX.11H3 (18/19)	
	R44 (19/19)	
	R48 (19/19)	
039Y	086Y (19/19)	086Y / CX.11H3
	AJ.04LC (18/19)	BiH01 / AJ.04LC
	BiH01 (18/19)	H002 / AJ.04LC
	CC.013E (18/19)	BiH01 / CC.0J3E
	CX.11H3 (18/19)	BiH01 / H004
	H002 (18/19)	H002 / CX.11H3
	H004 (19/19)	H002 / H004
	L01 (18/19)	H002 / LO7
	LCRO11 (18/19)	
	LO7 (19/19)	
	R48 (18/19)	
	L06 (18/19)	
600Y	435Y (19/19)	435Y / H004
	AJ.04LC (18/19)	H002 / AJ.04LC
	CX.11H3 (18/19)	H002 / CX.11H3
	H002 (19/19)	H002 / H004
	H004 (19/19)	
	L06 (18/19)	
Ana	436Y (18/19)	
	AJ.04LC (18/19)	
	CX.11H3 (18/19)	
	LCRO11 (19/19)	
Ivan	CX.11H3 (18/19)	
	H002 (18/19)	
	LCRO11 (18/19)	
	LO5 (18/19)	
	LS82 (19/19)	
L01	086Y (19/19)	
	436Y (18/19)	
	AJ.04LC (18/19)	
	H002 (19/19)	
	H004 (18/19)	
	LCRO11 (18/19)	
	LCRO6 (19/19)	
	LO5 (19/19)	
L06 (19/19)		
L03	592Y (19/19)	L06 / 592Y

	594Y (18/19)	
	AJ.04LC (18/19)	
	CC.013E (18/19)	
	CX.11H3 (19/19)	
	EJE (18/19)	
	LCRO11 (18/19)	
	LCRO6 (18/19)	
	L06 (18/19)	
LCRO5	LO7 (18/19)	
	LS70 (18/19)	
	R30 (18/19)	
	S26 (19/19)	
	S58 (18/19)	
LCRO9	592Y (18/19)	H002 / 592Y
	594Y (19/19)	594Y / CC.0J3E
	AJ.04LC (19/19)	594Y / EJE
	CC.013E (19/19)	594Y / H004
	CX.11H3 (18/19)	H002 / AJ.04LC
	EJE (18/19)	H002 / CC.0J3E
	H002 (18/19)	H002 / CX.11H3
	H004 (18/19)	H002 / EJE
LO5	CC.0J3E (18/19)	L06 / CC.0J3E
	H002 (18/19)	L06 / H004
	H004 (18/19)	L06 / LO7
	Ivan (18/19)	L06 / LS82
	L01 (19/19)	
	LCRO11 (18/19)	
	LO7 (19/19)	
	LS70 (19/19)	
	LS82 (19/19)	
	L06 (19/19)	

Simulacijom analize roditeljstva u programu CERVUS dobile smo vrijednost LOD za naš set podataka. U Tablici 2. navedene su granične vrijednosti za potencijalne majke, očeve i par roditelja s postotkom pouzdanosti 80 i 95 %.

Tablica 2. Granične vrijednosti LOD

	LOD 95%	LOD 80%
samo majka	2,92	-0,34
samo otac	2,79	-0,483
par roditelja poznatog spola	11,00	7,25

Nakon analize granične vrijednosti LOD za istraživanu populaciju (Tablica 2.) u programu CERVUS, analizirale smo potencijalne majke, očeve te par roditelja za 29 istraživanih jedinki.

Tablica 3. Rezultati analize pomoću programa CERVUS. Sivom bojom označeni su potencijalni roditelji čiji LOD je iznad granične vrijednosti 95% pouzdanosti.

potomak	Majka		otac		par roditelja
	ID	LOD	ID	LOD	
039Y	R09	1.68	L07	1.38	3.21
L01	436Y	1.58	LCRO6	1.81	2.88
R44	436Y	1.96	R47	1.96	3.76
R19	594Y	2.16	R44	1.71	3.87
086Y	L01	1.50	R19	1.74	3.41
037Y	436Y	2.24	R48	2.08	4.30
R48	LCRO2	1.85	R14	1.56	3.24
LCRO5	L05	7.80	S26	1.44	2.12
EJE	H002	1.25	LS69	2.10	3.31
Ana	LCRO11	1.50	LS69	1.54	3.23
Ivan	LCRO11	1.00	LS69	2.10	3.30
LCRO6	L06	1.57	R13	1.78	3.14
436Y	LS81	1.56	R40	1.83	3.46
592Y	R20	2.10	L03	2.33	4.51
L03	LCRO4	2.33	CX.11H3	2.31	4.01
H004	H002	1.58	CC.0J3C	1.85	3.73
435Y	LCRO2	1.48	600Y	2.92	4.12
LO5	L01	1.40	R42	1.58	2.64
H002	435Y	2.23	CC.0J3E	1.46	3.74
LO7	BiH01	9.76	R08	1.56	2.59
594Y	086Y	1.42	AJ.04LC	2.15	3.51
600Y	435Y	2.92	H004	1.80	5.00
LCRO9	594Y	2.24	CC.0J3E	2.26	4.43
LCRO11	Ana	1.50	LS82	1.53	2.88
AJ.04LC	594Y	2.15	CX.11H3	1.98	4.21
CX.11H3	S58	1.46	L03	2.31	3.68
CC.0J3C	594Y	2.12	H004	1.85	4.10
CC.0J3E	R01	1.66	CC.0J3C	1.82	3.78
L06	R01	1.25	LCRO6	1.57	2.58

ID – oznaka jedinke

Program COLONY s najvećom vjerojatnošću (1.00) povezo je osam potomaka i majki, od toga je jedna ženka (594Y) majka pet jedinki (Tablica 4.). Analiza je pokazala 95% vjerojatnost da je jedinka H004 otac jedinkama H002 i H006 (Tablica 5.), koje također imaju

zajedničku majku - 435Y. Za sedam parova potomaka (Tablica 6.) utvrđeno je da imaju zajedničke roditelje, dok je za ukupno 25 parova potomaka s vjerojatnošću iznad 0.95 utvrđeno da imaju jednog zajedničkog roditelja (Tablica 7.). Na Slici 1. prikazani je dijagram s rezultatima Tablica 4, 5, 6, tj. obiteljsko stablo potomaka koji dijele oba roditelja.

Tablica 4. Rezultati programa COLONY, potomci i dodijeljene majke

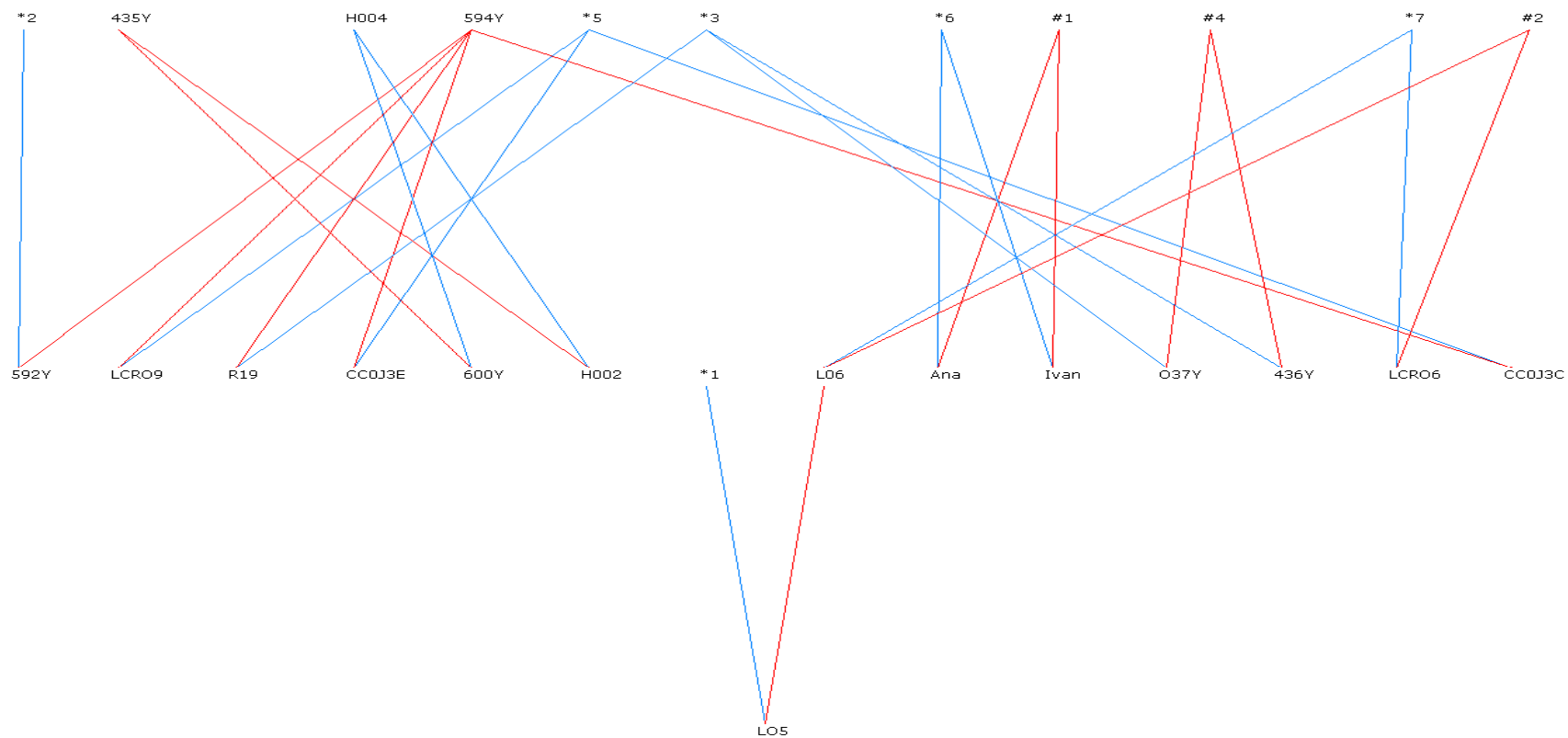
	Potomak	Majka	Vjerojatnost
1	LO5	L06	1.000
2	592Y	594Y	1.000
3	LCRO9	594Y	1.000
4	CC0J3C	594Y	1.000
5	CC0J3E	594Y	1.000
6	R19	594Y	1.000
7	H002	435Y	1.000
8	600Y	435Y	1.000

Tablica 5. Rezultati programa COLONY, potomci i dodijeljeni očevi

	Potomak	Otac	Vjerojatnost
1	H002	H004	0.951
2	600Y	H004	0.951

Tablica 6. Rezultati programa COLONY, potomci kojima su oba roditelja isti

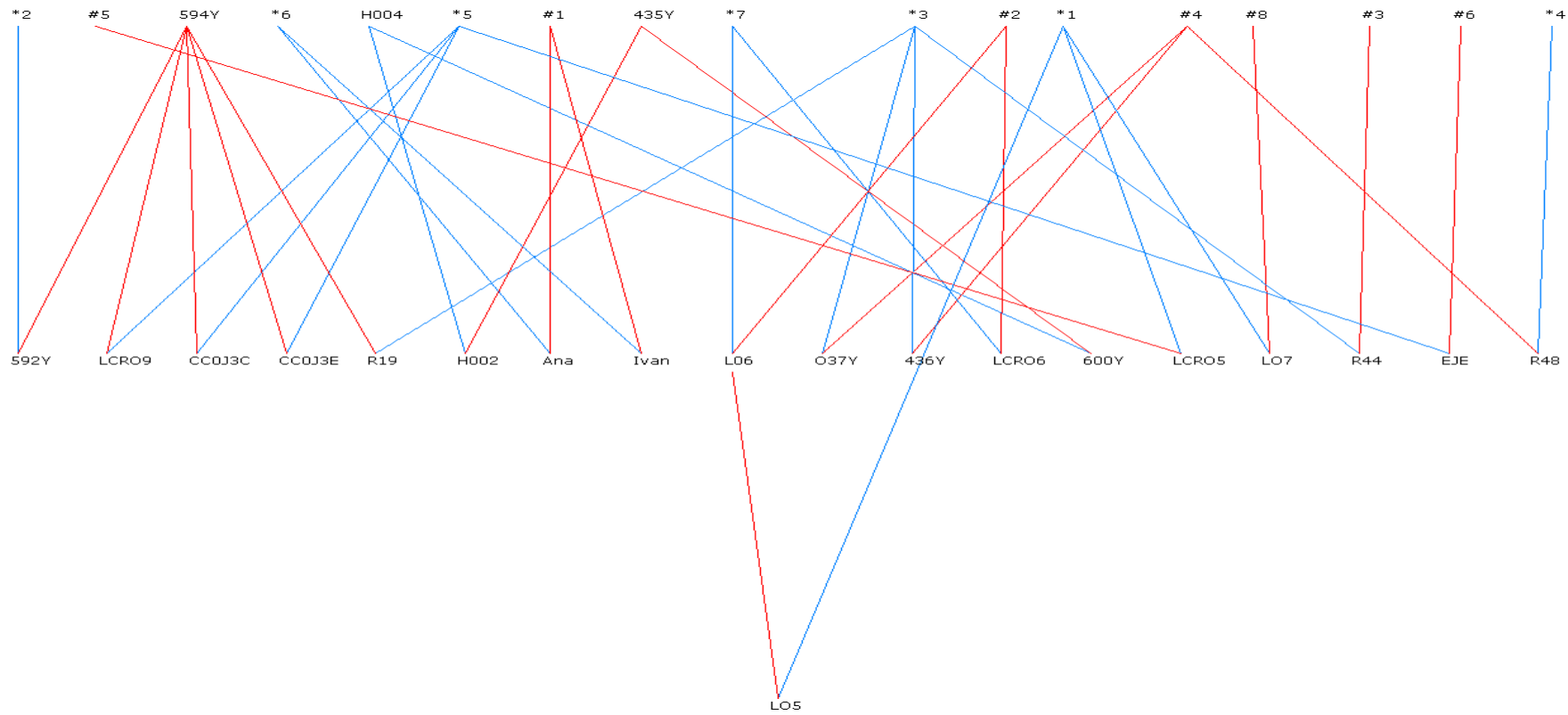
	Potomci		Vjerojatnost
1	Ana	Ivan	1.000
2	037Y	436Y	1.000
3	H002	600Y	1.000
4	LCRO9	CC0J3C	1.000
5	LCRO9	CC0J3E	1.000
6	CC0J3C	CC0J3E	1.000
7	LCRO6	L06	0.970



Slika 1. Dijagram obiteljskog stabla istraživanih jedinki euroazijskog risa koje dijele oba roditelja. Nepoznati očevi označeni su * i brojkom, a nepoznate majke # i brojkom. Plavom bojom označene su očinske linije, a crvenom majčinske.

Tablica 7. Rezultati programa COLONY, potomci koji dijele jednog zajedničkog roditelja

	Potomci		Vjerojatnost
1	LCRO5	LO5	1.000
2	LCRO5	LO7	1.000
3	R19	CC0J3C	1.000
4	R19	CC0J3E	1.000
5	R19	LCRO9	1.000
6	R19	592Y	1.000
7	R44	436Y	1.000
8	R44	037Y	1.000
9	592Y	LCRO9	1.000
10	592Y	CC0J3C	1.000
11	592Y	CC0J3E	1.000
12	R44	R19	0.999
13	R19	037Y	0.998
14	R19	436Y	0.998
15	EJE	LCRO9	0.998
16	EJE	CC0J3C	0.998
17	EJE	CC0J3E	0.998
18	LO5	LO7	0.993
19	037Y	R48	0.986
20	R48	436Y	0.986
21	435Y	LO7	0.984



Slika 2. Dijagram obiteljskog stabla istraživanih jedinki euroazijskog risa koje dijele barem jednog roditelja. Nepoznati očevi označeni su * i brojkom, a nepoznate majke # i brojkom. Plavom bojom označene su očinske linije, a crvenom majčinske.

Rasprava

Analiza roditeljstva je metoda kojom se određuje roditelj pojedinca ili skupine pojedinaca koristeći genetske informacije kombinirane sa statističkim metodama (MANEL i sur., 2005.). U našem istraživanju analizirale smo genotipove 91 jedinke euroazijskog risa da bi dobile precizno i pouzdano obiteljsko stablo Dinarske populacije. Dinarska populacija risova ima nisku gensku raznolikost i nizak polimorfizam alela mikrosatelitskih markera (SINDIČIĆ, 2011.; POLANC, 2012.) što otežava analize srodnosti. Zbog povećane srodnosti među roditeljima proizlaze višestruka dodjeljivanja potencijalnih roditelja potomcima, te se time smanjuje stupanj pouzdanosti dodjeljivanja (JONES i ARDREN, 2003). Stoga smo analize napravile pomoću tri različita računalna programa da bi utvrdile koja metoda daje rezultate s najvećom pouzdanošću. Izabrale smo programe koji osim različitih statističkih metoda koje koriste prilikom analize genotipova, imaju i različite mogućnosti za unos dodatnih podataka koji utječu na analizu. Korištenje dodatnih parametara poput demografskih podataka o godini rođenja i smrti istraživanih jedinki te spolu jedinki, i podataka o postotku greške pri genotipizaciji ključni su za pouzdanost analize kod Dinarske populacije risa, zbog niske raznolikosti alela te zbog toga što su u analizi korišteni uzorci prikupljeni kroz duže vremensko razdoblje (1974. – 2010.).

Na temelju analize rezultata ustanovile smo da program GIMLET koji koristi metodu isključenja nije u potpunosti prihvatljiv, jer ta metoda nema dovoljnu moć selekcije potencijalnih roditelja zbog niske raznolikosti alela u istraživanoj populaciji. Čak ni veliki broj korištenih lokusa i provjera srodnosti na temelju demografskih podataka nisu dovoljni da bi metoda bila precizna za istraživani uzorak. Za razliku od GIMLETA koji imaju mogućnost unosa demografskih podataka za istraživani uzorak, sljedeći program koji smo koristili - CERVUS nema mogućnost unosa dodatnih parametara. Tako CERVUS prilikom analize ne uzima u obzir podatke o godini rođenja i smrti jedinki, kao ni postotak greške pri genotipizaciji što je rezultiralo nepravilno spojenim potomcima i roditeljima za koje na temelju telemetrijskih podataka pouzdano znamo da su u srodstvu. Primjerice program je spojio jedinke 435Y i 600Y na način da su jedan drugome majka, odnosno otac, dok na temelju telemetrijskih podataka znamo da je jedinka 435Y majka 600Y. Treći program korišten u analizama je COLONY za koji smo zaključile da je optimalan program za analizu srodnosti u populaciji s visokim postotkom parenja u srodstvu. COLONY nam je dao

pouzdanije rezultate od ostalih programa koje smo koristile jer uzima u obzir i pogrešku kod genotipizacije, te ima mogućnost unosa podataka o poznatim srodstvima među analiziranim jedinkama kao i podatke o srodstvima koja nisu moguća. Također, osim analize roditeljstva, program daje podatke i o obiteljskim skupinama tj. o braći i sestrama koji dijele jednog ili oba roditelja. Program COLONY je s najvećom pouzdanošću spojio roditelje i potomke za koje na temelju radiotelemetrijskih podataka znamo da su u srodstvu, te su sve ostale obiteljske skupine koje je predložio smislene s obzirom na demografske podatke.

Zaključak:

1. Genotipovi 19 mikrosatelitskih markera mogu se koristiti za analizu roditeljstva kod Dinarske populacije risa.
2. Program GIMLET nije prikladan za analizu roditeljstva Dinarske populacije risa, jer metoda isključenja koju koristi nije dovoljno pouzdana i precizna kod niske raznolikosti alela, pa program pojedinog potomka spaja s velikim brojem potencijalnih roditelja.
3. Program CERVUS nema mogućnost unosa demografskih podataka i podataka o pogreškama genotipizacije, te zbog toga smatramo da program nije odgovarajući za analizu roditeljstva Dinarske populacije risa.
4. Program COLONY je najbolji izbor za analizu roditeljstva Dinarske populacije risa jer kombinira više parametara (podaci o poznatim srodstvima i srodstvima koja nisu moguća, pogreške pri genotipizaciji uzoraka, spol jedinki) te osim analize roditeljstva radi i analizu braće i sestara, kojima smo dobile smislene i precizne obiteljske skupine.

Popis literature

- ASHWORTH, D., M. BISHOP, K. CAMPBELL, A. COLMAN, A. KIND, A. SCHNIEKE, S. BLOTT, H. GRIFFIN, C. HALEY, J. MCWHIR, I. WILMUT (1998): DNA microsatellite analysis of Dolly. *Nature* 394, 329.
- CONNER, J. D., D. L. HARTL (2004) : A primer of ecological genetics, Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- DEWOODY, J. A., J. C. AVISE (2000): Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56, 461–473.
- ELLEGREN, H. (2009a): The different levels of genetic diversity in sex chromosomes and autosomes. *Trends Genet.* 25(6), 278-284.
- ELLEGREN, H. (2009b): Is genetic diversity really higher in large populations? *J. Biol.* 8(41),1-3.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, D. A. BRISCOE (2002): Introduction to Conservation Genetics, Cambridge University Press. Cambridge.
- FRKOVIĆ, A. (1998): Ponovo naseljavanje i ulov risa (*Lynx lynx* L.) u Županiji Primorsko-Goranskoj u razdoblju od 1974.-1996. godine. Zbornik radova Prirodoslovna istraživanja Riječkog područja, Prirodoslovni muzej Rijeka. str. 493 - 500.
- FREDHOLM, M., A. K. WINTERØ (1996a): Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Anim. Genet.* 27, 19-23.
- FREDHOLM, M., A. K. WINTERØ (1996b): Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mamm. Genome.* 6, 11-18.
- GOODWIN, W., A. LINACRE, S. HADI (2007): An introduction to forensic genetics, John Wiley & Sons, Ltd. Hoboken, New York.
- GOMPPER, M. E., J. L. GITTLEMAN, R. K. WAYNE (1998): Dispersal, philopatry, and genetic relatedness in a social carnivore: comparing males and females. *Mol. Ecol.* 7, 157–163.
- HEDRICK, P. W. (2000): Genetics of populations, 2nd ed., Jones and Bartlet Publishers. Sudbury.
- JEFFREYS, A. J., V. WILSON, S. L. THEIN (1985): Individual-specific „fingerprints“ of human DNA. *Nature.* 316, 76-79.

- JONES, A. G. (2001): GERUD 1.0 a computer program for the reconstruction of parental genotypes from progeny arrays using multilocus DNA data. *Mol. Ecol. Notes* 1, 215–218.
- JONES, A. G., W. R. ARDREN (2003): Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.* 12, 2511–2523.
- JONES, O. R., J. WANG (2010): COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Res.* 10, 551–555.
- KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER, T. C. MARSHALL (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1099-1006.
- KASHI, Y., M. SOLLER (1999): Functional roles of microsatellites and minisatellites. U: *Microsatellites: Evolution and Applications* (Goldstein, D. B., C. Schlötterer, urednici). Oxford University Press. Oxford. str. 10-23.
- KORITNIK, M. (1974): Še nekaj o risu. *Lovec* 67, 198-199.
- KROFEL, M., H. POTOČNIK, T. SKRBINŠEK, I. KOS (2006): Spremljanje gibanja in predacije risa (*Lynx lynx*) na območju Menišije in Logaške planote. *Veterinarske novice* 32(1-2), 11-17.
- KVAM, T. (1990): Population biology of the European lynx (*Lynx lynx*) in Norway. Dr. scientific thesis. University of Trondheim. Trondheim, Norway.
- KVAM, T. (1991): Reproduction in the European lynx, *Lynx lynx*. *Z. Säugetierkunde* 56, 146-158.
- LI, Y-C., A. B. KOROL, T. FAHIMA, A. BEILES, E. NEVO (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453-2465.
- LINNELL, J., V. SALVATORI, L. BOITANI (2007): Guidelines for Population Level Management Plans for Large Carnivores, Large Carnivore Initiative for Europe (LCIE) by contract for EC. Rome.
- MARSHALL, T. C, J. SLATE, L. E. B. KRUK, J. M. PEMBERTON (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7, 639-655.
- MANEL, S., O.E. GAGGIOTTI, R.S. WAPLES (2005). Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 136-142.
- NAKAMURA, Y., M. LEPPERT, P. O'CONNELL, R. WOLFF, T. HOLM, M. CULVER, C. MARTIN, E. FUJIMOTO, M. HOFF, E. KUMLIN, R. WHITE (1987): Variable

- number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616-1622.
- NEFF, B. D., M. R. GROSS (2001): Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55, 1717-1733.
- POLANC, P. (2012): Populacijska genetika evrazijskega risa (*Lynx lynx* L.) v Sloveniji. Doktorska disertacija. Biotehniška fakulteta Univerza v Ljubljani.
- RALLS, K., K.L. PILGRIM, P.J. WHITE, E.E. PAXINOS, M.K. SCHWARTZ, R.C. FLEISCHER (2001): Kinship, social relations, and den sharing in kit foxes. *J. Mammal* 82, 858–866.
- SIGNER, E. N., Y. E. DUBROVA, A. J. JEFFREYS, C. WILDE, L. M. B. FINCH, M. WELLS, M. PEAKER (1998): DNA fingerprinting Dolly. *Nature* 394, 329-330.
- SLIJEPČEVIĆ V. (2008): Telemetrijsko istraživanje euroazijskih risova (*Lynx lynx*) u Hrvatskoj. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. (mentori T. Gomerčić i M. Sindičić)
- SLIJEPČEVIĆ, V., T. GOMERČIĆ, M. SINDIČIĆ, J. KUSAK, Đ. HUBER (2009): Telemetry study of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Croatia. 10. Hrvatski biološki kongres, Osijek. pp 188-189.
- SINDIČIĆ, M., A. ŠTRBENAC, P. OKOVIĆ (urednici) (2010): Plan upravljanja risom u Republici Hrvatskoj, za razdoblje od 2010. do 2015. Ministarstvo kulture, Zagreb.
- SINDIČIĆ, M. (2011): Genska raznolikost populacije risa (*Lynx lynx*) iz Hrvatske. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- VALIÈRE, N. (2002): Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Mol. Ecol. Notes*, 2, 377–379.
- WEISSENBACH, J., G. GYAPAY, C. DIB, A. VIGNAL, J. MORISSETTE, P. MILLASSEAU, G. VAYSSEIX, M. LATHROP (1992): A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359, 794-801.

Sažetak

MARTINA ĐURČEVIĆ i NINA GEMBAROVSKI

studentice 4. godine Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Analiza srodnosti dinarske populacije euroazijskog risa (*Lynx lynx*) pomoću mikrosatelitskih markera

Dinarska populacija euroazijskog risa (*Lynx lynx*) razvila se reintrodukcijom šest jedinki koje su 1973. godine naseljene iz slovačkih Karpata u Sloveniju, odakle se populacija proširila u Hrvatsku te Bosnu i Hercegovinu. Danas se smatra da je u Hrvatskoj prisutno najviše 40 do 60 jedinki, te da su uzroci ugroženosti populacije krivolov, nedostatak plijena i niska genska raznolikost uzrokovana parenjem u srodstvu. Istraživanja su dokazala nisku raznolikost alela mikrosatelitnih lokusa kod Dinarske populacije, te je cilj ovog rada bio utvrditi koji od dostupnih kompjuterskih programa je najprikladniji za analizu srodnosti kod Dinarske populacije risa. Analiza roditeljstva je metoda kojom se određuje roditelj pojedinca ili skupine pojedinaca koristeći genetske informacije kombinirane s različitim statističkim metodama. U istraživanju smo koristile genotipove 19 mikrosatelitskih lokusa 91 jedinke risova iz Dinarske populacije, te smo upotrebom tri računalna programa analizirale potencijalne roditelje za 29 životinja čiji uzorci su prikupljeni u razdoblju od 2000. do 2010. godine. Utvrdile smo da su programi GIMLET i CERVUS zbog niske raznolikosti alela neprikladni za upotrebu kod Dinarske populacije, dok su programom COLONY dobiveni rezultati s najvećom pouzdanošću, te smo na temelju tih rezultata uspjele izraditi precizno i pouzdano obiteljsko stablo dinarske populacije risova.

Ključne riječi: euroazijski ris, *Lynx lynx*, mikrosateliti, srodnost, genska raznolikost

Summary

MARTINA ĐURČEVIĆ and NINA GEMBAROVSKI

4th year students at Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

Kinship analysis of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) Dinaric population using microsatellite markers

Eurasian lynx (*Lynx lynx*) Dinaric population was founded in 1973 by reintroduction of six animals from Slovak Carpathians to Slovenia, where from animals spread to Croatia and Bosnia and Herzegovina. Today it is considered that lynx population in Croatia has a maximum of 40 to 60 individuals. Population is threatened by poaching, lack of prey and low genetic diversity due to inbreeding. The goal of this research was to investigate which software is the most suitable for kinship analysis of the Dinaric lynx, as population has low microsatellite variability. Kinship analysis determines parents of an individual or group of individuals using genetic markers and different statistical methods. In this study we used genotypes of 19 microsatellite loci of 91 individual lynx from Dinaric population. Using three different programs we analyzed kinship for 29 individuals sampled in the 2000 – 2010 period. We concluded that methods implemented in programs GIMLET and CERVUS are not suitable for the kinship analysis of the Dinaric lynx population due to the low allelic diversity. Results obtained with program COLONY had the highest reliability, so we managed to reconstruct accurate and reliable pedigree of lynx population in Croatia.

Key words: Eurasian lynx, *Lynx lynx*, microsatellites, kinship, genetic diversity