

Veterinarski fakultet
Sveučilište u Zagrebu

MARINA HABAZIN i NIKA KONSTANTINOVIĆ

Razlikovanje pripadnika roda *Canis* iz Hrvatske
na temelju Y kromosoma

Zagreb, 2012.

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

Popis kratica

COI - (cytochrome c oxidase subunit I) citokrom C oksidaza podjedinica 1

DNK - deksiribonukleinska kiselina

mtDNK - mitohondijska deoksiribonukleinska kiselina

pb - parovi baza

PCR – (polymerase chain reaction) lančana reakcija polimerazom

Sadržaj

Uvod	1
Hipoteza	3
Materijal i metode	3
Rezultati	5
Rasprava	7
Zaključci	8
Popis literature	9
Sažetak	12
Summary	13

Uvod

Predstavnici roda *Canis* u Hrvatskoj su vuk (*Canis lupus*), pas (*Canis lupus familiaris*) i čagalj (*Canis aureus*).

Evolucija kanida počinje prije otprilike 55 milijuna godina u paleocenu, pojavom porodice *Miacyda* iz koje nastaju sve današnje zvijeri (VAUGHAN, 1985.). *Miacyda* se pred oko 50 milijuna godina dijele u dvije skupine *Caniformia* - psolike zvijeri i *Feliformia* - mačkolike zvijeri. Svi kanidi potječu s tla današnje Sjeverne Amerike odakle su se tijekom i nakon kasnog miocena proširili na ostale kontinente, kao podloga za razvoj brojnih vrsta (MARTIN, 1989.). Evolucijskim temeljem uspjeha kanida smatra se razvoj donjih derača, koji služe za deranje kože i kidanje mesa (TEDFORD, 1978.). Vuk se u potpunosti razvio u kasnom pleistocenu, na sjeveru Euroazije i odatle se proširio Europom, Azijom i Sjevernom Amerikom. Smatra se da se čagalj razvio u Aziji te je zatim tijekom ranog pleistocena vrsta naselila Europu. Svi psi potječu od zajedničkog divljeg pretka, vuka (WAYNE, 1993.; VILA i sur., 1997.), te se danas vuk i pas smatraju istom vrstom. Najnovija istraživanja ukazuju da se proces udomaćivanja psa nije odvijao na više mjesta istovremeno već da je potekao iz jednog središta i to na prostoru Azije, južno od rijeke Yangtze (PANG i sur., 2009.). Zbog ove tijesne evolucijske povezanosti te slične ekološke niše koju zauzimaju, vuk i čagalj morfološki su vrlo slični. Morfološko razlikovanje vuka i psa gotovo je nemoguće, dok je razlikovanje na temelju DNK predmet brojnih istraživanja (VILA i sur., 2003.; VERARDI i sur., 2006.; RUTLEDGE i sur., 2010.; GODINHO i sur., 2011.).

Mogućnost identifikacije vrsta na temelju DNK značajna je zbog provedbe istraživanja, zaštite ugroženih vrsta, forenzičkih slučajeva, upravljanja populacijama i dr.. Dlaka, izmet, perje i ostaci kostiju ili tkiva često su jedini znakovi prisutnosti životinja na nekom staništu, što je posebno važno kod ugroženih vrsta koje je teško opaziti u prirodi zbog malih populacija ili vrsta koje zaziru od ljudi. Identifikacija na temelju DNK također je važna kod razlikovanja vrsta koje su morfološki slične (HEBERT i sur., 2004.), te kod identifikacije hibrida. Razlikovanje vrsta pomoću DNK temelji se na usporedbi slijedova koji imaju polimorfna mjesta karakteristična za određenu vrstu. Pri tome se mogu koristiti različita područja DNK, no najčešće korišteni markeri su kontrolna regija mitohondrijske DNK (mtDNK) i COI gen koji je također smješten na mtDNK. Mikrosatelitni lokusi se također mogu koristiti pri razlikovanju vrsta, no njihovo je istraživanje zahtjevnije i znatno skuplje. Upotreba Y kromosoma za razlikovanje vrsta nije uobičajna, budući Y kromosom ima manje

polimorfnih mjesta nego ostatak genoma (HELLBORG i ELLEGREN, 2004.; LINDGREN i sur., 2004.; SHEN i sur., 2000.; WALLNER i sur., 2003.).

Ženke sisavaca imaju dva X kromosoma te su homogametičan spol, za razliku od mužjaka koji imaju jedan X i jedan Y kromosom pa se nazivaju heterogametičnim spolom. Dok se mtDNK naslijeđuje samo od majke, Y kromosom se naslijeđuje isključivo preko očeve linije na sinove. Tijekom mejoze samo mali dio Y kromosoma se rekombinira s X kromosomom (LAHN i sur., 2001.). Lokusi na dijelu Y kromosoma koji ne sudjeluje u rekombinaciji, uvijek ostaju vezani i mogu se tretirati kao haplotipovi.

Do danas je manji broj istraživanja bio usmjeren na proučavanje Y kromosoma kanida (BANNASCH i sur., 2005.; NATANAELSSON i sur., 2006.; DING i sur., 2011.). Poznato je da je Y kromosom kod pasa dug oko 14 437 parova baza (pb) (NATANAELSSON i sur., 2006.), što ga čini najmanjim kromosomom u kariotipu kanida (MAYERS-WALLEN, 2006.). NATANAELSSON i sur. (2006.) su proveli istraživanje cjelokupnog Y kromosoma kod deset uzoraka pasa, te su pronašli devet haplotipova definiranih s 14 polimorfnih mjesta. Kod 36 vukova su pronašli sedam puta manje polimorfnih mjesta, no smatrali su da niža raznolikost kod vukova može biti posljedica toga što su vučji uzorci potjecali s geografski ograničenog područja (NATANAELSSON i sur., 2006.). DING i sur. (2011.) su istražili Y kromosom vukova, pasa i kojota (*Canis latrans*) iz cijelog svijeta te su pronašli ukupno 32 haplotipa: 27 specifičnih za pse, jedan haplotip zajednički psima i vukovima, dva vučja haplotipa i dva haplotipa kod kojota. Utvrđivanje polimorfnih mjesta tj. haplotipova specifičnih za određenu vrstu ukazivalo je na mogućnost razlikovanja pripadnika roda *Canis* na temelju Y kromosoma.

Dosadašnjim istraživanjima utvrđene su metode za razlikovanje vuka i psa pomoću kontrolne regije mtDNK, te genotipizacijom većeg broja mikrosatelita (RANDI i LUCCHINI, 2002.; VERARDI i sur. 2006.; GOMERČIĆ, 2009.; SINDIČIĆ i sur., 2011.; GODINHO i sur., 2011.). Ova istraživanja potvrdila su pojavu križanaca između vukova i pasa, te se sumnja na postojanje križanaca između psa i čaglja. Razlikovanje hibrida vuka i psa na temelju mikrosatelitskih lokusa temelji se na statističkoj analizi zastupljenosti alela u pojedinoj populaciji. S obzirom da se mtDNK naslijeđuje samo po majčinskoj liniji, pomoću tog markera možemo identificirati samo vrsnu pripadnost majke istraživane jedinke. Budući se Y kromosom naslijeđuje po očevoj liniji, istraživanje ovog markera otvara mogućnost nove metode pomoću koje bi se mogla utvrditi vrsna pripadnost po očevoj liniji.

Cilj ovog istraživanja je pronaći novi marker na Y kromosomu kojim bi mogli pratiti očevu liniju istraživanog kanida, te tako u kombinaciji s rezultatima dobivenima analizom

mtDNK utvrditi vrsnu pripadnost oba roditelja istraživane jedinke. To bi nam omogućilo pouzdanu identifikaciju vuka, psa, čaglja i njihovih hibrida.

Hipoteza

Na temelju prethodnih istraživanja Y kromosoma kanida, pretpostavljamo da na Y kromosomu kanida postoje polimorfna mjesta na temelju kojih se mogu razlikovati pripadnici roda *Canis* prisutnih u Hrvatskoj, vuk, pas i čaglj. Cilj ovog rada je pronaći ta polimorfna mjesta.

Materijal i metode

Istraživanja su provedena na deset uzoraka tkiva vuka (*Canis lupus*), šest uzoraka tkiva čaglja (*Canis aureus*) i sedam uzoraka krvi pasa (*Canis lupus familiaris*). Uzorci mišićnog tkiva vukova prikupljeni su od životinja stradalih u prometu ili odstrijeljenih u sklopu redovne kvote propisane Planom upravljanja vuka u Hrvatskoj (ŠTRBENAC i sur., 2010.). Mišićno tkivo čaglja je prikupljeno od životinja odstrijeljenih u sklopu redovitog provođenja lovno gospodarskih osnova. Krv pasa prikupljena je u Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, za potrebe izrade doktorske disertacije GOMERČIĆ (2009). Svi uzorci potječu iz Hrvatske, a prikupljeni su u razdoblju od 2007. do 2011. godine. Uzorci su do izolacije čuvani u 96% etanolu na -18°C .

DNK iz mišićnog tkiva vukova i čagljeva izoliran je pomoću komercijalnog kita Invitrogen ChargeSwitch® gDNA Tissue Kits. Protokol izolacije je pratio uputu proizvođača. DNK iz krvi pasa je izolirana za potrebe disertacije GOMERČIĆ (2009.).

Na temelju rezultata istraživanja Y kromosoma vuka, psa i kojota (NATANAELSSON i sur. 2006.; DING i sur., 2011.) izabran je polimorfni fragment Y kromosoma (označen kao fragment 21 u DING i sur., 2011.) na kojem je utvrđena prisutnost polimorfni mjesta specifičnih za istraživane vrste. Odabrani fragment umnožen je lančanom reakcijom polimerazom (PCR), te su pri tome korištene početnice 21f2

(5'GGATAGAATGCAGGAGAGGG3') i 21r6 (5'GGTGCCCCAAGAATAAT TC3') (NATANAELSSON i sur. 2006.) koje daju proizvod dužine 742 pb. Za pripremu PCR smjese korišten je Platinum® PCR SuperMix, Invitrogen koji sadrži: Taq DNA polimerazu s Platinum® Taq antitijelima, 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl₂, te 220 μM dNTP Mix koji sadrži dGTP, dATP, dTTP, dCTP. PCR reakcija provedena je u smjesi količine 50 μL koja sadrži 4 μl DNA, 1 μl otopine početnica, 45 μl Platinum® PCR SuperMix, Invitrogen. Reakcija je provedena koristeći uređaj Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Optimizirani uvjeti izvođenja PCR (temperatura i trajanje svakog koraka, te broj ciklusa) bili su sljedeći:

1. 94° - 2 min
2. 94° - 30 sec, 55° - 30 sec, 72° - 3 min, 40 ciklusa
3. 72° - 10 min.

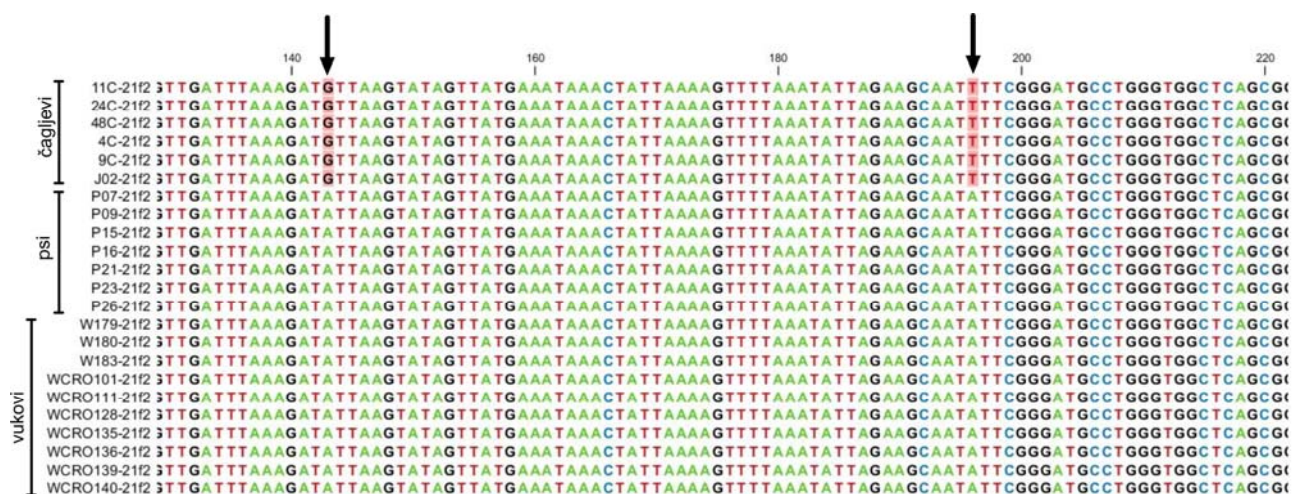
Prisutnost PCR proizvoda provjeravana je elektroforezom na 1,5 %-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem 0,75 g agaroze (Certified™ PCR Agarose, Bio-Rad) u 50 ml 1 X TBE pufera. U agarozu su dodani SYBR Safe Gel stain 5μl. Na parafilmu je izmiješano 5 μl PCR proizvoda i 2 μl pufera (LB pufer, engl. loading buffer), koji sadrži 0,25% bromfenol plavila, 0,25% ksilencijanolo fluorofosfata i 15% fikola, te su nanešene u jažice u gelu. U prvu jažicu nanešen je biljeg veličine DNA fragmenata koji se sastoji od 10 dvolančanih DNA molekula veličina 100 pb, 200 pb, 300 pb itd., do 1000 pb (100 bp Molecular Ruler, 100 μg/ml, Bio-Rad). Elektroforezom provjereno je da li je došlo do umnažanja željenog slijeda te da li je došlo do pojavljivanja dodatnih, nespecifičnih fragmenta. Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi, pri naponu od 90 V, a trajala je 40 minuta. Gelovi su promatrani pomoću transiluminatora.

PCR proizvodi su pročišćeni pomoću komercijalnog kita Invitrogen ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit te su poslani na sekvenciranje u servis Macrogen Europe u Amsterdam, Nizozemska, gdje koriste 3730XL Automatic DNA sequencer. Rezultati sekvencioniranja (elektroferogram i nukleotidne slijedove) dobiveni su u ab1 i PDF formatu.

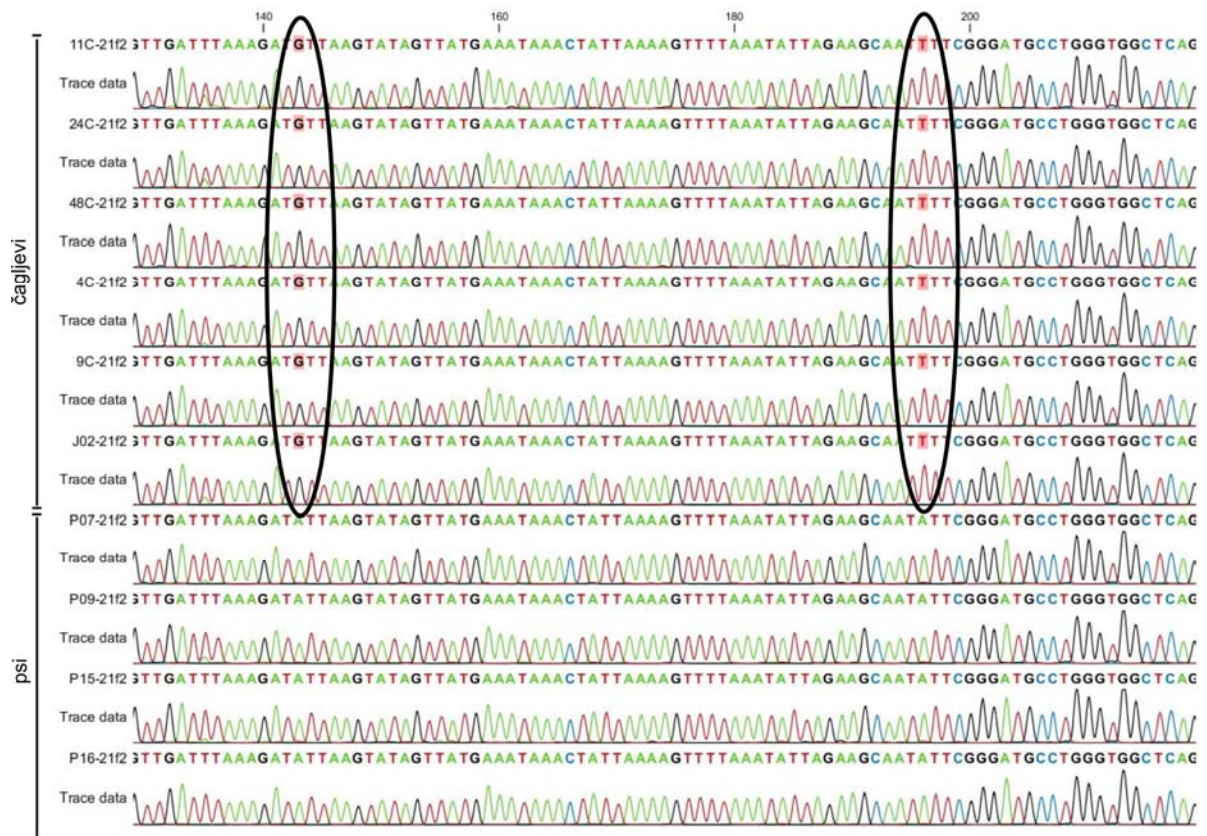
Sljedovi su analizirani u BioEdit programu (HALL, 1999.). U BioEditu je implementiran ClustalW program (THOMPSON i sur., 1994.) kojim je izvršeno višestruko sravnjenje sljedova DNA i identificirana su sva polimorfna nukleotidna mjesta.

Rezultati

Analizirani su sljedovi Y kromosoma na deset uzoraka tkiva vuka, sedam uzoraka tkiva čaglja i sedam uzoraka krvi psa u dužini od 672 pb. Uočeno je da kod vukova i pasa koji žive na području Republike Hrvatske na istraživanom slijedu nema polimorfnih mjesta, te se ovom metodom ne mogu razlikovati. Kod čaglja su nađena dva polimorfna mjesta, lokus 143 na kojem vuk i pas imaju adenin, a čagalj gvanin, te lokus 196 na kojem vuk i pas imaju adenin, a čagalj timin (Slika 1. i 2.).



Slika 1. Poravnati sljedovi fragmenta 21 Y kromosoma vuka, psa i čaglja, s označenim polimorfnim mjestima karakterističnim za razlikovanje čaglja



Slika 2. Elektroferogram na kojem su vidljiva polimorfna mjesta kod dva uzorka čaglja (oznake uzoraka 24C i 4C)

Rasprava

Cilj rada bio je istražiti mogućnost razlikovanja pripadnika roda *Canis* iz Hrvatske na temelju polimorfnih mjesta na Y kromosomu. Kod molekularnog razlikovanja kanida kao markeri najčešće se koriste kontrolna regija mitohondrijske DNA, dok se za razlikovanje jedinki i hibrida koriste mikrosateliti. Mikrosateliti su vrlo popularni molekularni biljezi, te je dokazano da se hibridi vuka i psa mogu razlikovati genotipizacijom većeg broja mikrosatelita (RANDI i LUCCHINI, 2002.; VERARDI i sur. 2006.; GODINHO i sur., 2011.), no nedostatak istraživanja mikrosatelita je činjenica da je laboratorijski rad vrlo skup. Istraživanja su pokazala da je na temelju kontrolne regije mtDNA moguće razlikovati vukove i pse iz Hrvatske (GOMERČIĆ, 2009.; SINDIČIĆ i sur., 2011.), ali s obzirom da se mtDNA nasljeđuje samo od majke tom metodom nije moguće identificirati oca i tako otkloniti mogućnost da je životinja hibrid. Zato je odlučeno istražiti novi marker kojim bi pouzdano mogli identificirati vuka, psa, čaglja i njihove hibride.

Istraživanje Y kromosoma vukova, pasa i kojota iz cijelog svijeta rezultiralo je pronalaskom 32 haplotipa: 27 psećih, jednog haplotipa zajedničkog psima i vukovima, dva vučja i dva haplotipa kojota (DING i sur., 2011.), što je ukazivalo na mogućnost razlikovanja pripadnika roda *Canis* na temelju Y kromosoma. Ovim istraživanjem utvrđena je prisutnost dva polimorfna mjesta na Y kromosomu kod čaglja iz Hrvatske, jedno na 143. lokusu i drugo na 196. lokusu fragmenta dužine 672 pb, koja ih razlikuju od vukova i pasa. Istovremeno je utvrđena odsutnost polimorfnih mjesta na Y kromosomu vuka i psa što pokazuje da njih ne možemo razlikovati analizom ovog fragmenta Y kromosoma.

S populacijom koja broji oko 200 jedinki vuk je u Hrvatskoj strogo zaštićena vrsta (ŠTRBENAC i sur., 2010.; JEREMIĆ, 2011.). Vuk u Hrvatskoj, osobito na području Dalmatinske zagore, često napada domaće životinje, a sukladno Pravilniku o postupku sprječavanja i nadoknade štete od životinja strogo zaštićenih divljih svojti država je vlasniku životinje dužna nadoknaditi štetu. U slučaju kada štetu počini vrsta koja nije zaštićena (poput psa ili čaglja) država nije nadležna za naknadu štete. U cilju zaštite vrste i otplate odšteta važno je razlikovati napad vuka od napada pasa ili čagljeva, što zbog morfološke sličnosti zubala ovih kanida te sličnog načina predacije često nije moguće.

Jedini pouzdan način identifikacije kanida je korištenje molekularnih metoda. Ovim istraživanjem utvrđeno je da je uspoređivanjem polimorfnih mjesta na Y kromosomu moguće razlikovati vuka i psa od čaglja. Ova metoda se može koristiti u slučajevima kada je truplo

previše raspadnuto da bi se životinja mogla morfološki identificirati. Česta su i stradavanja na prometnicama kada je zbog ozljeda i općeg stanja trupla teško na temelju morfološke prosudbe točno zaključiti o kojoj je vrsti riječ. Kako bi dobili uzorak DNK i usporedbom polimorfnog fragmenta Y kromosoma otkrili o kojoj je životinji riječ dovoljno je sakupiti uzorak tkiva, dlake, nekoliko kapi krvi ili sline. U slučaju napada na domaće životinje uzorci se mogu skupiti i s ubijene životinje ili njezine neposredne blizine. Analizom uzoraka se može utvrditi koji predator je ubio životinju i tako odlučiti o načinu naknade štete stočarima.

Zaključci

1. Na istraživanom slijedu Y kromosoma u dužini od 672 pb, kod vuka i psa iz Republike Hrvatske nisu nađena polimorfna mjesta, dok su kod čaglja pronađena dva polimorfna mjesta, lokus 143 na kojem vuk i pas imaju adenin, a čagalj gvanin, te lokus 196 na kojem vuk i pas imaju adenin, a čagalj timin.
2. Vuk i pas iz Hrvatske ne mogu se razlikovati na temelju istraživanog sljeda Y kromosoma u dužini od 672 pb.
3. Na temelju istraživanog sljeda Y kromosoma u dužini od 672 pb može se razlikovati čaglja od vuka i psa.

Popis literature

- BANNASCH, D. L., M. J. BANNASCH, J. R. RYUN, T. R. FAMULA, N. C. PEDERSEN (2005): Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mamm. Genome* 16, 273-280.
- DING, Z. L., M. OSKARSSON, A. ARDALAN, H. ANGLEBY, L. G. DAHLGREN, C. TEPELI, E. KIRKNESS, P. SAVOLAINEN, Y. P. ZHANG (2011): Origins of domestic dog in Southern East Asia is supported by analysis of Y-chromosome DNA. *Heredity* doi:10.1038/hdy.2011.114
- GODINHO, R., L. LANEZA, J. C. BLANCO, S. LOPES, F. ALVARES, E. J. GARCIA, V. PALACIOS, Y. CORTES, J. TALEGO (2011): Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Mol. Ecol.* 20, 5154–5166.
- GOMERČIĆ, T. (2009): Genska raznolikost populacije vuka (*Canis lupus*) iz Hrvatske. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.
- HEBERT, P. D. N., E. H. PENTON, J. M. BURNS, D. H. JANZEN, W. HALLWACHS (2004): Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14, 812-817.
- HELLBORG, L., H. ELLEGREN (2004): Low levels of nucleotide diversity in mammalian Y chromosomes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 158–163.
- JEREMIĆ, J. (2011): Izvješće o stanju populacije vuka u Hrvatskoj u 2011. godini. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- LAHN, B. T., N. M. PEARSON, K. JEGALIAN (2001): The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat. Rev. Genet.* 2, 207-216.
- LINDGREN, G., N. BACKSTROM, J. SWINBURNE, L. HELLBORG, A. EINARSSON (2004): Limited number of patrilineages in horse domestication. *Nat. Genet.* 36, 335–336.

- MARTIN, L. D. (1989): Fossil history of the terrestrial carnivora. In: Carnivore behavior, ecology, and evolution, Vol. 1. (Gittleman, J. L., Ed.). Comstock publishing associates. Ithaca. pp. 536-568.
- MEYERS-WALLEN, V. N. (2006): Sex chromosomes, sexual development, and sex reversal in the dog. In: The dog and its genome. (Ostrander, E., U. Giger, K. Lindblad-Toh, Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Pp. 383-405.
- NATANAELSSON, C., M. C. OSKARSSON, H. ANGLEBY, J. LUNDEBERG, E. KIRKNESS, P. SAVOLAINEN (2006): Dog Y chromosomal DNA sequence: identification, sequencing and SNP discovery. BMC Genet. 45, 1-6.
- PANG, J. F., C. KLUETSCH, X. J. ZOU, A. B. ZHANG, L. Y. LUO, H. ANGLEBY (2009): Dog Origins South of Yangtze River. Mol. Biol. Evol. 26, 2849–2864.
- RANDI, E, V. LUCCHINI (2002): Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) population by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. Cons. Genet. 3:31-45.
- RUTLEDGE, L. Y., C. J. GARROWAY, K. M. LOVELESS, B. R. PATTERSON (2010): Genetic differentiation of eastern wolves in Algonquin Park despite bridging gene flow between coyotes and grey wolves. Heredity 105, 520-31.
- SHEN, P. D., F. WANG, P. A. UNDERHILL, C. FRANCO, W. H. YANG, A. ROXAS, R. SUNG, A. A. LIN, R. W. HYMAN, D. VOLLRAT, R. W. DAVIS, L. L. CAVALLISFORZA, P. J. OEFNER (2000): Population genetic implications from sequence variation in four Y chromosome genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 7354-7359.
- SINDIČIĆ, M., T. GOMERČIĆ, A. GALOV, H. ARBANASIĆ, J. KUSAK, A. SLAVICA, Đ. HUBER (2011): Mitochondrial DNA control region as a tool for species identification and distinction between wolves and dogs from Croatia. Vet. Arhiv 81, 249-258.
- ŠTRBENEC, A., J. KUSAK, Đ. HUBER, J. JEREMIĆ, P. OKOVIĆ, A. MAJIĆ, A. SKRBINŠEK, I. VUKŠIĆ, L. KATUŠIĆ, S. DESNICA, T. GOMERČIĆ, A. BIŠČAN, D. ZEC, M. GRUBEŠIĆ (2010): Plan upravljanja vukom u Republici Hrvatskoj za razdoblje od 2010. do 2015. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

- TEDFORD, R. H. (1978): History of dogs and cats: A view from the fossil record. In: Nutrition and management of dogs and cats. (Tedford, R. H., Ed.). Ralston Purina Co. St. Louis. pp. 1-10.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 22, 4673-4680.
- VAUGHAN, T. A. (1985): *Mammalogy*. Saunders College Publishing, Fort Worth, USA.
- VERARDI, A., V. LUCCHINI, E. RANDI (2006): Detecting introgressive hybridisation between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Mol. Ecol.* 15, 2845–2855.
- VILÀ, C., C. WALKER, A. K. SUNDQVIST, O. FLAGSTAD, Z. ANDERSONE, A. CASULLI, I. KOJOLA, H. VALDMANN, J. HALVERSON, H. ELLEGREN (2003): Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* 90, 17-24.
- VILA, C., P. SAVOLAINEN, J. E. MALDONANDO, I. R. AMORIM, J. E. RICE, R. L. HONEYCUTT, K. A. CRANDALL, J. LUNDEBERG, R. K. WAYNE (1997): Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* 276, 1687-1689.
- WALLNER, B., G. BREM, M. MÜLLER, R. ACHMANN (2003): Fixed nucleotide differences on the Y chromosome indicate clear divergence between *Equus przewalskii* and *Equus caballus*. *Animal Genetics* 34, 453-456.
- WAYNE, R. K. (1993): Molecular evolution of the dog family. *Trends Genet.* 9, 218-224.

Sažetak

MARINA HABAZIN i NIKA KONSTANTINOVIĆ

Studentice 2. godine Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Razlikovanje pripadnika roda *Canis* iz Hrvatske na temelju Y kromosoma

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost razlikovanja pripadnika roda *Canis* prisutnih u Hrvatskoj (vuk *Canis lupus*, pas *Canis lupus familiaris* i čagalj *Canis aureus*) na temelju polimorfniha mjesta na Y kromosomu. Mogućnost identifikacije vrsta na temelju DNK značajna je zbog provedbe istaživanja, zaštite ugroženih vrsta, forenzičkih slučajeva, upravljanja populacijama, te nadoknade šteta koju počine zakonom zaštićene vrste. Pripadnici roda *Canis* morfološki su slični, dok je razlikovanje na temelju DNK moguće analizom mikrosatelita i mitohondrijske DNA. Budući se mtDNA naslijeđuje po majčinskoj liniji, cilj je uhodati metodu za utvrđivanje vrsne pripadnosti po očevoj liniji. Istraživanje je provedeno na fragmentu Y kromosoma dužine 672 pb na deset uzoraka vuka, sedam uzoraka psa i sedam uzoraka čaglja. Na istraživanom slijedu Y kromosoma kod vuka i psa iz Republike Hrvatske nisu nađena polimorfna mjesta, dok su kod čaglja pronađena dva polimorfna mjesta, lokus 143 na kojem vuk i pas imaju adenin, a čagalj gvanin, te lokus 196 na kojem vuk i pas imaju adenin, a čagalj timin. Temeljem toga zaključujemo da se vuk i pas iz Hrvatske ne mogu razlikovati na temelju istraživanog sljeda Y kromosoma, no možemo razlikovati čaglja od vuka i psa.

Ključne riječi: Y kromosom, *Canis lupus*, *Canis aureus*, *Canis lupus familiaris*

Summary

MARINA HABAZIN and NIKA KONSTANTINOVIĆ

Students of 2nd year at Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

Differentiation of Croatian representatives of genus *Canis* based on Y chromosome

The goal of this study was to investigate the possibility of distinguishing the members of the genus *Canis* present in Croatia (wolf *Canis lupus*, dog *Canis lupus familiaris* and golden jackal *Canis aureus*) based on the polymorphic sites on Y chromosome. Species differentiation based on DNA is important for scientific research, protection of endangered species, forensics, population management and refunding damages caused by protected species. Representatives of genus *Canis* are morphologically similar, while molecular identification is based on microsatellite and mitochondrial DNA analysis. As mtDNA is inherited from maternal line, the aim was to develop a method for distinguishing the paternal line. We have analyzed 672 bp-long fragment of the Y chromosome of ten wolf, seven dog and seven golden jackal samples. We found no polymorphic sites on wolf and dog sequences, but golden jackal sequences had two polymorphic sites – on locus 143 wolf and dog had adenin, while jackal had guanin; and on locus 196 wolf and dog had adenin, but golden jackal had timin. We concluded that based on this Y chromosome fragment wolf and dog from Croatia can not be differentiated, but we can distinguish golden jackal from wolf and dog.

Key words: Y chromosome, *Canis lupus*, *Canis aureus*, *Canis lupus familiaris*