

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

POPULACIJSKA STRUKTURA IN OCENA
SORODNOSTI EVROPSKE SRNE (*Capreolus capreolus*)
V MODELNEM LOVIŠČU OLJKA, ŠMARTNO OB PAKI

MARTIN STERNAD

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Populacijska struktura in ocena sorodnosti evropske srne
(*Capreolus capreolus*) v modelnem lovišču Oljka, Šmartno ob
Paki**

Population structure and paternity relationship of the European roe deer
(*Capreolus capreolus*) in the model hunting area Oljka, Šmartno ob Paki

Ime in priimek: Martin Sternad

Študijski program: Bioinformatika

Mentor: izr. prof. dr. Elena Bužan

Somentor: izr. prof. dr. Boštjan Pokorny

Koper, oktober 2018

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Martin STERNAD

Naslov zaključne naloge: Populacijska struktura in ocena sorodnosti evropske srne (*Capreolus capreolus*) v modelnem lovišču Oljka, Šmartno ob Paki

Kraj: Koper

Leto: 2018

Število listov: 46

Število slik: 7

Število tabel: 11

Število prilog: 2

Št. strani prilog: 3

Število referenc: 58

Mentor: izr. prof. dr. Elena Bužan

Somentor: izr. prof. dr. Boštjan Pokorny

Ključne besede: evropska srna, *Capreolus capreolus*, Šmartno ob Paki, mikrosateliti, program *Structure*, sorodstvo

Izvleček:

Evropska srna / srnjad (*Capreolus capreolus*) je razširjena domala po celi Evropi. V Sloveniji je najbolj pogost prostoživeči parkljar in velja za najpomembnejšo in najštevilčnejšo vrsto divjadi. V zaključnem delu smo analizirali 74 vzorcev osebkov evropske srne, odvzetih iz modelnega lovišča Oljka, Šmartno ob Paki, v letih 2017 in 2018. Za določitev populacijske strukture in oceno sorodnosti smo uporabili genotipizacijo jedrnih markerjev (11 mikrosatelitnih lokusov). Na osnovi DNA analize smo določili genetsko raznolikost populacije in pokazali, da je populacija razdeljena na dve genetsko različni skupini. Potrdili smo tudi ozka sorodstvena razmerja med določenimi osebki.

Key words documentation

Name and SURNAME: Martin STERNAD

Title of the final project paper: Population structure and paternity relationship of the European roe deer (*Capreolus capreolus*) in the model hunting area Oljka, Šmartno ob Paki

Place: Koper

Year: 2018

Number of pages: 46

Number of figures: 7

Number of tables: 11

Number of appendix: 2

Number of appendix pages: 3

Number of references: 58

Mentor: Assoc. Prof. Elena Bužan, PhD

Co-supervisor: Assoc. Prof. Boštjan Pokorny, PhD

Keywords: European roe deer, *Capreolus capreolus*, Šmartno ob Paki, microsatellites, program *Structure*, paternity

Abstract:

European roe deer (*Capreolus capreolus*) is widely distributed species throughout Europe. In Slovenia, roe deer is the most abundant wild ungulate, and is the most important and numerous game species. In this work we analysed 74 samples of European roe deer from model hunting ground Oljka, Šmartno ob Paki. We genotyped nuclear markers (11 microsatellite loci) in order to determine the population structure and paternity relationship. Based on the DNA analysis we estimated genetic diversity of the population, and showed that the population is divided into two clearly distinguished groups. Moreover, we also confirmed close relatedness among some individuals.

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali na poti do sem.

Sprva bi se rad zahvalil moji družini in sorodnikom, ki so mi omogočili študij in bili vedno ob meni.

Nato se iskreno zahvaljujem moji mentorici, izr. prof. dr. Eleni Bužan, za pomoč pri genetskih analizah in somentorju, izr. prof. dr. Boštjanu Pokornemu, za zbiranje vzorcev, obema pa tudi za pomoč pri sestavljanju zaključne naloge.

Zahvaljujem se ekipi v laboratoriju Oddelka za biodiveriteto FAMNIT, katere člani so bili vedno prijazni z mano. Predvsem se iskreno zahvaljujem Sandri Potušek za izjemno pomoč pri laboratorijskem delu naloge.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali in stali ob strani tekom študija, tudi če jih nisem poimensko omenil v tej zahvali.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Evropska srna.....	1
1.1.1	Opis vrste.....	1
1.1.2	Razširjenost in taksonomija evropske srne.....	1
1.1.3	Razmnoževanje srnjadi.....	2
1.1.4	Varstveni status	2
1.2	Opis lovišča.....	2
1.2.1	Klimatske razmere.....	3
1.2.2	Geografski opis lovišča.....	3
1.2.3	Vodne razmere.....	3
1.2.4	Opisi najznačilnejših gozdnih združb.....	3
1.2.5	Drugi za življenjske razmere divjadi pomembni vplivi.....	4
1.2.6	Gostota odvzema vzorcev srnjadi.....	5
1.3	Molekularni markerji za določitev starševstva	6
1.3.1	Prednosti mikrosatelitov	7
1.3.2	Pomanjkljivosti mikrosatelitov	7
1.4	Parametri genetske diverzitete	7
1.4.1	Heterozigotnost.....	7
1.4.2	Hardy-Weinbergovo ravnotežje	8
1.4.3	Koeficient inbreedinga (F_{IS})	8
1.4.4	Število alelov (NA).....	9
1.5	Namen in cilji dela	10
2	MATERIALI IN METODE	11
2.1	Vzorčenje	11
2.2	Izolacija DNA	12
2.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	13
2.4	Določanje mikrosatelitnih lokusov	13
2.4.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	13
2.4.2	Fragmentna analiza.....	15
2.4.3	Analiza mikrosatelitnih lokusov	15
3	REZULTATI	17
3.1	Analiza mikrosatelitnih lokusov	17
3.1.1	Vizualizacija alelov in preverjanje kakovosti analize mikrosatelitnih lokusov.....	17
3.1.2	Analiza genetske diverzitete.....	17
3.2	Analiza populacijske strukture.....	22
4	RAZPRAVA IN SKLEP	25

5	LITERATURA.....	28
---	-----------------	----

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Število odvzema srnjadi in vrsta odvzema.....	5
Preglednica 2: Lastnosti lokusov.....	13
Preglednica 3: Razpon in število alelov na lokus.....	18
Preglednica 4: Hardy-Weinbergov test ravnotežja glede na lokus.....	18
Preglednica 5: Pričakovana in opažena heterozigotnost in inbreeding koeficient F_{IS}	19
Preglednica 6: Pregled potomcev in njihovih potencialnih očetov.....	19
Preglednica 7: Spol, datum in lokacija odvzema osebkov iz preglednice 6.....	20
Preglednica 8: Pregled potomcev in njihovih potencialnih mater.....	20
Preglednica 9: Spol, datum in lokacija odvzema osebkov iz preglednice 8.....	21
Preglednica 10: Razporejenost posameznih osebkov v dve ločeni skupini.....	22
Preglednica 11: Prikaz povprečij določenih parametrov v štirih različnih raziskavah vključno s slednjo.....	27

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Geografski prikaz lokacij odvzema osebkov srnjadi.....	11
Slika 2: Prikaz izrisa alelov v programu Genemapper 4.1v	17
Slika 3: Lokacije odvzema osebkov z oznako starševskega odnosa	21
Slika 4: Vrednosti $q1$ in $q2$ za K2.....	23
Slika 5: Razvrstitev lokacij odvzema osebkov srnjadi po pripadnosti genotipu.....	23
Slika 6: Razvrščanje v skupine z metodo FCA	24
Slika 7: Lokacije odvzema osebkov srnjadi s prikazanim genotipom	25

KAZALO PRILOG

Priloga A: Velikosti mikrosatelitnih markerjev za 74 vzorcev

Priloga B: Zbirnik razporejenosti posameznih osebkov po skupinah

SEZNAM KRATIC

bp	bazni par
ddH₂O	voda brez RNA in DNA
DNA	deoksiribonukleinska kislina
F_{IS}	koeficient <i>inbreedinga</i> oz. parjenja znotraj ožjega sorodstva
H	genetsko jasno različna skupina populacije srnjadi v modelnem lovišču Oljka, Šmartno ob Paki
He	pričakovana heterozigotnost
Ho	opažena heterozigotnost
K	klaster/gruča (angl. <i>cluster</i>)
H-W	Hardy-Weinbergovo ravnotežje
MCMC	Markova veriga Monte Carlo (angl. <i>Markov chain Monte Carlo</i>)
NA	število alelov
PCR	verižna reakcija s polimerazo
S1	prva subpopulacija populacije srnjadi v modelnem lovišču Oljka, Šmartno ob Paki
S2	druga subpopulacija populacije srnjadi v modelnem lovišču Oljka, Šmartno ob Paki
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

1 UVOD

Evropska srna / srnjad (*Capreolus capreolus*) je najpogostejša vrsta prostoživečih parkljarjev, ki je razširjena po skoraj celi Evropi (Krže 2000). Ne najdemo je na Irskem, Cipru in večini sredozemskih otokov; poseljuje najrazličnejše habitate od južne Španije do severne Norveške (Stube 1999). Dandanes je srnjad najpomembnejša vrsta parkljaste divjadi v Evropi, tako z gospodarskega kot lovskega vidika (Krže 2000). V Sloveniji je srnjad najbolj razširjen prostoživeči parkljar in velja za najpomembnejšo in najštevilčnejšo vrsto divjadi (Kos in Potočnik 2008).

1.1 Evropska srna (*Capreolus capreolus* L.)

1.1.1 Opis vrste

V biološki sistematiki je srnjad uvrščena v družino jelenov (Cervidae), ki skupaj z nekaterimi sorodnimi družinami sestavljajo podred prežvekovalcev. Srna je najmanjši evropski predstavnik družine jelenov. V primerjavi s telesom ima močne in dolge noge, značilna pa sta dolga in ovalna uhlja, majhen rep, vitek vrat in čokato telo, ki je v sprednjem delu močnejše kot v zadnjem. Samci imajo razmeroma šibko rogovje. Srnjad vzhodnoevropskih in severnih predelov je telesno močnejša glede na ostale predele (Krže 2000).

Pielowski (1970) je za srnjad vzhodne Poljske navedel povprečne teže (za oba spola) 19 kg, za zahodno Poljsko pa 15 kg. Hell (1980) je za povprečne žive teže slovaške srnjadi za srnjake navedel 23,8 kg in za srne 22,6 kg.

1.1.2 Razširjenost in taksonomija evropske srne

Evropska srna živi v večjem delu Evrope (razen na Irskem, Cipru, Korziki, Sardiniji, in na večini manjših otokov), vključno z zahodno Rusijo (Stubbe 1999). Prisotna je od morske gladine do 2400 m nadmorske višine v Alpah (von Lehmann in Sägeser 1986) in v Pirenejih (González in sod. 2013). Izven Evrope živi še v Turčiji, severni Siriji, severnemu Iraku, severnemu Iranu in na Kavkazu, naseljena pa je bila tudi na druge celine, npr. v Teksas v ZDA (Wilson in Reeder 2005). Subpopulacije, ki živijo vzdolž obale Črnega morja in v severni Egejski regiji v Turčiji se bližajo izumrtju. V Izraelu in Libanonu je vrsta izumrla (*ibid.*).

V južni Evropi se nahajajo dve podvrsti v relativno majhnem arealu. Prva je *C. c. italicus*, ki se pojavlja v srednji in južni Italiji, med južno Toskano, Lacijem in Apulijo, do Kalabrije (Lorenzini in sod. 2002; Randi in sod. 2004; Lorenzini in Lovari 2006), druga pa je *C. c. garganta*, ki se pojavlja v južni Iberiji, še posebno v Andaluziji (Sierra de Cádiz) (Lorenzini in sod. 2002; Lorenzini in Lovari 2006; Lorenzini in sod. 2013).

V Evropi naj bi dandanes prevladovala tri glavne genetsko ločene skupine nominalne podvrste srnjadi (*C. c. capreolus*): prva v jugo-zahodni Evropi (Iberijski polotok), druga v južni in vzhodni Evropi, tretja pa v centrali in severni Evropi (Lorenzini in Lovari 2006).

1.1.2.1 Razširjenost v Sloveniji

Srnjad je splošno razširjena in pogosta od morske obale do zgornje gozdne meje. Do druge polovice 19. stoletja je bila srnjad na slovenskem ozemlju maloštevilna (Kryštufek 1991). Pogostejša je začela postajati z obsežnim izsekavanjem pragozdov in razraščanjem grmišč. Največjo ekspanzijo je doživela v zadnjih devetdesetih letih, od leta 1930 dalje. Pred drugo svetovno vojno srnjadi ni bilo tudi po izrazito poljskih okoliših, tj. v večjem delu Prekmurja ter na Ptujskem in Dravskem polju. Danes so vsa ta območja že gosto poseljena s t. i. poljskim ekotipom srnjadi (*ibid.*).

1.1.3 Razmnoževanje srnjadi

Razmnoževalni cikel pri srnjadi se navadno začne poleti, tj. v drugi polovici julija in v začetku avgusta. Takrat se srna goni in ima spolni žar (estrus), ki traja tri dni. V tem obdobju srna spušča poseben vonj, s katerim opozarja srnjake, da je plodna. Poleg posebnega vonja občasno spušča piskajoča oglašanja (t. i. pivkanje). V času gonje srnjak z ovohavanjem ugotavlja pripravljenost srne za parjenje (Krže 2012).

Pri srnjadi povprečna brejost traja 290 dni ali približno 10 mesecev. Brejost ločimo na dva dela: obdobje zadržane brejosti oz. embrionlane diapavze (traja približno pet mesecev; oplojena jajčna celica se takoj na začetku nekajkrat deli, vendar se ne ugnezdi v maternično steno) in obdobje aktivne brejosti (Flajšman *in sod.* 2013). V Sloveniji in Evropi imajo samice srnjadi visoko raven plodnosti, saj so v večini populacij oplojene skoraj vse odrasle srne in tudi večina enoletnih srn (Flajšman *in sod.* 2017a, 2018). Čeprav srne v srednjeevropskem prostoru praviloma poležejo dva mladiča, tiste bolj vitalne pa tudi tri, pa je od nedavnega znano, da lahko imajo v enem leglu celo pet mladičev (Flajšman *in sod.* 2017b).

1.1.4 Varstveni status

Srna je zelo razširjena in pogosta vrsta, ki ni ogrožena. Označena je v Rdečem seznamu Svetovne zveze za varstvo narave (IUCN) z oznako »najmanj ogrožena vrsta« (angl. *least concern*).

1.2 Opis lovišča

Lovišče ima skupno površino 2620 ha, od katere je 2436 ha lovne in 184 ha nelovne površine (Pokorny 1997).

1.2.1 Klimatske razmere

Lovišče leži v prehodnem območju med subalpskim in subpanonskim klimatskim pasom. Po podatkih HMZ je na najbližji meteorološki postaji (Velenje, n.m.v. 390 m) v obdobju 1951-1980 povprečna letna temperatura znašala 9 °C, povprečna januarska temperatura -1,3 °C in povprečna julijska temperatura 18,5 °C. Letno pade po podatkih HMZ na širšem območju Šaleške doline med 1200 in 1250 mm padavin. Največ padavin pade v juniju in oktobru, najmanj pa pozimi predvsem meseca januarja in februarja. Posebno vlogo v klimatskih razmerah lovišča igrajo vetrovi. Najpogostejši vetrovi na širšem območju Šaleške doline so vzhodnik (23,3 %), zahodnik (15,7 %) in severozahodnik (11,8 %) (*ibid.*).

1.2.2 Geografski opis lovišča

Lovišče leži v spodnjem delu reke Pake. 40 % ali 1000 ha površine se nahaja na nadmorski višini 200 do 400 m, medtem ko 60 % ali 1498 ha površine se nahaja na nadmorski višini 400 do 800 m.

Večina lovišča zajema gričevnat svet. V severnem delu lovišča leži Skorno (n.m.v. 325-652 m), v zahodnem Slatine (314-433 m), v severovzhodnem Paški vrhi (Veliki in Mali vrh, 430-627 m) in v vzhodnem delu Gora Oljka, ki je s 734 m tudi najvišja točka lovišča. V gričevnatem svetu prevladujejo južne in jugozahodne ekspozicije, zato je območje zelo primerno za vinogradništvo (*ibid.*).

1.2.3 Vodne razmere

Lovišče leži v porečju reke Pake in Savinje, ki sta glavni vodni telesi v lovišču. Paka z dolžino okoli 6 km deli lovišče na dva dela. Pri Rečici se Paka izliva v Savinjo, ki predstavlja južno in jugozahodno mejo lovišča. Obe reki skupaj predstavljata približno 10 ha vodnih površin. Značilno je, da je vodno omrežje na zahodni strani Pake bistveno bolj razvejano kot na vzhodni (*ibid.*).

1.2.4 Opisi najznačilnejših gozdnih združb

Po naravi prevladujejo listnati gozdovi, posebno bukovi. Daleč najbolj razširjena asociacija je acidofilni gozd hrastov, bukve in belkaste bekice, ki zajema približno 75% gozdov. Po naravi absolutno prevladuje bukev, pogosti pa so tudi hrasti (zlasti graden) in kostanj. Posamično se pojavljajo še beli gaber, češnja in breza. Zaradi antropogenih vplivov so zelo pogosti iglavci (smreka in rdeči bor, mestoma pa tudi jelka). Uspeva le manjše število grmovnic: kranjska krhlika, mali jesen, rdeči dren, glog, črni bezeg, navadni volčin in nekatere druge. Lokalno je lahko zelo bohotno razvito tudi robidovje (*ibid.*).

1.2.5 Drugi za življenjske razmere divjadi pomembni vplivi

1.2.5.1 Gospodarjenje z gozdovi

Velika večina gozdov je v zasebni lasti, državnih je le okoli 50 ha. Značilna je razdrobljena posest, zaradi česar izvajanje naprednejših gozdnogojitvenih sistemov ni mogoče, zato prevladuje sproščeno gospodarjenje z gozdovi v negativnem pomenu besede (zlasti poseki dreves in umetne sadnje). Največji problem pri gospodarjenju z gozdovi predstavlja kostanjev rak. Problematična je tudi z zakonom prepovedana paša živine v gozdu.

Gozdovi so v splošnem izredno dobro odprti s primarnimi in sekundarnimi prometnicami (*ibid.*).

1.2.5.2 Gospodarjenje s kmetijskimi površinami

Ravninski del lovišča predstavlja prostor najširše možnosti kmetijske rabe in je označen kot strateški prostor za pridobivanje hrane.

V lasti države je samo manjši odstotek kmetijskih površin v ravninskem delu lovišča. Na teh površinah pridelujejo izključno hmelj in silažno koruzo.

V zasebni lasti so vsa kmetijska zemljišča v gričevnatem in hribovitem svetu in tudi večina zemljišč v ravninskem delu lovišča. V slednjem prevladujejo intenzivno obdelovane njive, zlasti koruzne monokulture. V gričevnatem svetu so kmetijske površine bistveno bolj mozaično razdeljene (prepletajo se travniki, pašniki, stari sadovnjaki in njive).

V celotnem lovišču je še zlasti problematično gnojenje travnikov in pridelovanje travniške silaže, kar ima za posledico zelo zgodnje in pogoste košnje (problematično zlasti pri srnjadi). Proces oživljanja in intenziviranja živinoreje predstavlja izgubo pašnih površin za divjad, povečano medvrstno in posledično tudi znotrajvrstno kompeticijo, povečane koncentracije in objedanje srnjadi v gozdnem prostoru ter povečana škoda na gozdnem mladju (*ibid.*).

1.2.5.3 Vplivi urbanizacije

Za lovišče je značilen splet agrarne (nižinski del) in gozdnate krajine (gričevnat in hribovit svet), v kateri se mozaično prepletajo gozdne in kmetijske površine. Zlasti v agrarni krajini je vpliv urbanizacije na prostoživeče živali relativno močan (*ibid.*).

1.2.5.4 Vplivi prometa

Skozi središče lovišča poteka magistralna cesta Koroška - Savinjska dolina ter regionalna cesta Mozirje - Letuš. Te predstavljajo največje izgube prostoživečih živali. Podoben problem predstavlja železniška proga Velenje - Celje. Daleč najbolj ogrožena je srnjad, namreč letne izgube zaradi prometa se gibajo med 10 in 20 osebki (90 % magistralna in regionalna cesta, 10 % železnica) (*ibid.*).

1.2.5.5 Vplivi turizma in rekreacije

Gora Oljka je krajinski kompleks, ki je zelo primeren za planinarjenje, izletniško hojo in kolesarjenje. Območje Gore Oljke, Velikega vrha in Skorna je zelo primerno za nabiranje gob in gozdnih sadežev, zaradi česar so največji pritiski na prstoživeče živali v jesenskem času. Rekreacijski dejavnosti je skozi celo leto izpostavljeno območje Slatin, kjer predstavljajo največji problem vsakodnevni sprehajalci (*ibid.*).

1.2.5.6 Industrijski in drugi vplivi

Znotraj lovišča predstavlja največjo motnjo za delovanje naravnih ekosistemov kamnolom v Podgori. Bistveno večji problem kot lokalni onesnaževalci predstavlja daljinski transport polutantov, pri čemer je zlasti problematična Termoelektrarna Šoštanj. Onesnaževanje okolja negativno vpliva tudi na divjad (*ibid.*).

1.2.6 Gostota odvzema vzorcev srnjadi

V preglednici 1 so prikazani podatki o številu odvzete srnjadi v lovišču Oljka v obdobju 2006-2018. Intenziteta vzorčenja za namene pričujočega dela je zelo velika, saj smo v vzorec za genetske analize v letu 2017 vključili 60 % vse odvzete srnjadi, v letu 2018 pa 40 % odvzetih odsebkov do 31. julija.

Preglednica 1: Število odvzete srnjadi in vrsta odvzema na območju lovišča Oljka v obdobju 2006-2018; za leto 2018 je prikazan odvzem do 31. julija (vir: oslis 2018).

Vrsta odvzema / Leto	Skupaj	Leto												
		2018	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006
odstrel	771	21	57	61	70	64	63	64	56	60	65	63	58	69
povoz cesta	239	8	30	16	11	24	21	20	19	20	20	19	13	18
bolezen	48	1	3	4	6	1		1	10	4	1	2	5	10
neznano	35	3	1	2	3	1	4	3	2	1	6	3	6	
kosilnica	27	1	2	3	3		4	3	2	2	3	1	1	2
povoz														
železnica	22	2	2		2	1		1	4	1		4	3	2
drugo	18	2		1		1	2	3		2	3	1	1	2
psi	12	1		1			1	1		4	1		3	
krivolov	5			1		1	1					1		1
SKUPAJ	1177	39	95	89	95	93	96	96	93	94	99	94	90	104

1.3 Molekularni markerji za določitev starševstva

Mikrosateliti so kodominantni markerji, s pomočjo katerih lahko določimo vse prisotne alele na lokusu. Pri diploidnih vrstah se tako za vsak kodominantni marker določi en alel pri homozigotnem osebku in dva alela pri heterozigotnem osebku (Wan in sod. 2004; Frankham in sod. 2009; Freeland in sod. 2011). Mikrosateliti so nekodirajoča zaporedja DNA, ki so sestavljena iz tandemskih ponovitev od enega do šestih baznih parov, ki se ponovijo 5- do 100-krat (Wan in sod. 2004; Oliveira in sod. 2006; Selkoe in sod. 2006; Freeland in sod. 2011). Najdemo jih tako v prokariontskem kot v evkariontskem genomu (Oliveira in sod. 2006). Nahajajo se v jedrnem in kloroplastnem genomu, pri nekaterih vrstah so bili najdeni tudi v mitohondrijskem genomu (Freeland in sod. 2011). Znani so tudi pod imenom ponovitve enostavnih zaporedij oz. SSR (angl. *simple sequence repeats*) in kratke tandemske ponovitve oz. STR (angl. *short tandem repeats*) (Freeland in sod. 2011; Guichoux in sod. 2011).

Glede na tip ponovljivega zaporedja jih delimo na (Oliveira in sod. 2006):

- popolne: zaporedje ni prekinjeno z nobeno bazo, ki ne pripada ponovljivemu motivu;
- nepopolne: zaporedje je prekinjeno s parom baz, ki ne pripadajo ponovljivemu motivu;
- prekinjene: znotraj zaporedja se nahaja manjše zaporedje, ki ne pripada ponovljenemu motivu;
- sestavljene: ponovljiv motiv je sestavljen iz dveh različnih zaporedij.

Mikrosateliti imajo visoko mutacijsko stopnjo (10^{-2} do 10^{-6} nukleotidov na lokus na generacijo), razlog za to je nepravilno parjenje zdrsnjenih verig med podvojevanjem DNA, kar vodi do insercij in delecij ene ali več ponavljajočih se enot ter nepravilnega prekrivanja dela kromosomov pri mejozi (Oliveria in sod. 2006; Brown 2007; Kalia in sod. 2010; Freeland in sod. 2011). Pri mikrosatelitih ni enakomerne mutacijske stopnje, saj se spreminja med lokusi, aleli in vrstami. Mikrosateliti z večjim številom ponovitev so bolj podvrženi mutacijam zaradi večje verjetnosti zdrsa verig (Bhargava in Fuentes 2009). Tako so mikrosateliti z daljšo ponovitvijo tudi bolj polimorfni (Hoshino in sod. 2012).

Mikrosateliti niso uporabni za študije evolucijskih dogodkov, ki so se zgodili v daljni preteklosti, zaradi njihove hitre mutacijske stopnje. So pa prav zaradi tega uporabni pri raziskavah nedavnih genetskih dogodkov, saj imajo zaradi hitre mutacijske stopnje mnogokrat več alelov na lokusu in so visoko polimorfni. Zaradi njihove variabilnosti jih lahko uporabljamo za določitev posameznikov in določitev med populacijami, kar s počasneje razvijajočimi regijami ni mogoče (Freeland in sod. 2011). V preteklosti so veljali za selektivno nevtralne markerje, ki niso pod vplivom selekcijskih pritiskov.

Mikrosateliti so uporabni predvsem za študije genomske nestabilnosti pri raku, bioinvazije in epidemiologije, za študije populacijske genetike, forenzike, varstvene biologije, molekularne antropologije, evlucijske zgodovine, za identifikacijo posameznikov ter za določanje starševstva (Chistiakov in sod. 2006; Bhargava in Fuentes 2009; Hoshino in sod. 2012).

1.3.1 Prednosti mikrosatelitov

Za analizo mikrosatelitnih lokusov potrebujemo majhno količino DNA, uporabni so tudi pri degradirani DNA, saj za analizo mikrosatelitnih lokusov potrebujemo kratke DNA fragmente (Selkoe in Toonen 2006). Ko so mikrosateliti za določeno vrsto razviti, so preprosti za uporabo in cenovno ugodni. Imajo visoko ponovljivost ter visoko izobilje v živih organizmih (Bhargava in Fuentes 2009).

So pogosti in uniformno razporejeni čez celoten genom, vendar so bolj pogosti pri živalskih kot rastlinskih vrstah. Mutacijska stopnja pri mikrosatelitnih markerjih je visoka, zaradi česar so uporabni pri intra-populacijskih študijah (Lowe in sod. 2004; Selkoe in Toonen 2006).

1.3.2 Pomanjkljivosti mikrosatelitov

Med slabosti mikrosatelitnih markerjev lahko prištevamo, da je začetno določanje mikrosatelitov draga in dolgotrajna (Wan in sod. 2004; Lowe in sod. 2004). Prav tako so za mikrosatelite značilni nerazjasnjeni mutacijski mehanizmi, napake pri določanju alelov, velikostna homoplazija (aleli so identični v dolžini, vendar niso enaki po izvoru) in ničelni aleli (delecije lokusa ali mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov lahko onemogočijo pomnoževanje in identifikacijo heterozigotov) (Hoshino in sod. 2012). To lahko vodi v napake pri določanju frekvence alelov (Hoshino in sod. 2012) in napake pri pomnoževanju (Wan in sod. 2004; Selkoe in Toonen 2006).

1.4 Parametri genetske diverzitete

S pomočjo podatkov genotipizacije mikrosatelitnih lokusov lahko izračunamo pričakovano (H_e) in opaženo (H_o) heterozigotnost, Hardy-Weinbergovo ravnotežje, koeficient *inbreedinga* oz. parjenja znotraj ožjega sorodstva (F_{is}), število alelov (N_A) in razne druge parametre (F_{st} , N_e , bogastvo alelov itd.), ki lahko določijo populacijsko strukturo in genetsko variabilnost populacije. V tem delu se bomo osredotočili le na parametre, ki opisujejo genetsko variabilnost in sorodstvene odnose med osebkami v populaciji. Sledijo opisi posameznih parametrov.

1.4.1 Heterozigotnost

Heterozigotnost je mera genetske diverzitete, ki predstavlja frekvenco vseh heterozigotov v populaciji (Frankham in sod. 2009; Page in Holmes 2009). Je najpogosteje uporabljena mera za določanje genetske diverzitete na posameznem lokusu (Frankham in sod. 2009). Na ravni populacij je po navadi opisana kot pričakovana ali kot opažena heterozigotnost (Mills 2013).

1.4.1.1 Pričakovana heterozigotnost

Pričakovano heterozigotnost (H_e) pričakujemo za populacijo glede na alelno frekvenco, ki je predpostavljena na podlagi Hardy-Weinbergovega ravnotežja (H-W ravnotežje) (Frankham in sod. 2009; Mills 2013). Po navadi se uporablja pri opisovanju genetske diverzitete, saj je manj občutljiva na velikost vzorca kot opažena heterozigotnost (Frankham in sod. 2009).

1.4.1.2 Opažena heterozigotnost

Opažena heterozigotnost (H_o) je dejanski delež opaženih heterozigotnih osebkov na lokusu (Mills 2013). Ta mera je pogosto uporabljena pri kodominantnih podatkih za diploidne organizme. Ne uporablja se za dominantne podatke, saj števila heterozigotov v populaciji ni mogoče enostavno določiti (Lowe in sod. 2004).

Z izrazom heterozigot označujemo tiste osebkke, ki imajo na posameznem lokusu dva različna alela. V nasprotju pa je homozigot tisti osebek, ki ima na določenem lokusu kopiji dveh enakih alelov (Frankham in sod. 2009).

Heterozigotnost lahko določimo direktno s štetjem heterozigotnih osebkov ali jo izračunamo iz alelnih frekvenc z uporabo H-W ravnotežja (Griffiths in sod. 2008). Z izračunom heterozigotnosti lahko v populaciji zaznamo različne procese, kot so genetski zdrs, selekcija in genski pretok (Mills 2013).

1.4.2 Hardy-Weinbergovo ravnotežje (HWE)

Model Hardy-Weinbergovega ravnotežja sta leta 1908 neodvisno razvila Godfrey H. Hardy in Wilhelm Weinberg (Lowe in sod. 2004). Model temelji na načelu, da se alelne in genotipske frekvence v času ne spreminjajo. To velja pod predpostavko, da populacije niso pod vplivom evlucijskih procesov, kot so naravna selekcija, genetski zdrs, mutacije in genski pretok (Frankham in sod. 2009; Mills 2013). Vendar to v naravnih populacijah ne drži, zato v naravi prihaja do odstopanja od H-W ravnotežja. Odstopanje je posledica petih

dejavnikov: mutacij, naravne selekcije, razporejeno parjenje (angl. *assortative mating*), genskega pretoka in majhne populacijske velikosti (Lowe in sod. 2004; Frankham in sod. 2009). Nenaključno parjenje povzroča odstopanje od H-W ravnotežja, to je lahko posledica razporejenega parjenja ali parjenja v sorodstvu (Höglund 2009). Do razporejenega parjenja prihaja, ko spolno razmnoževanje ni naključno, temveč prihaja do pogostejše izbire določenega genotipa nasprotnega spola (Griffiths in sod. 2008; Höglund 2009).

Hardy-Weinbergovo ravnotežje je pomemben parameter genetske diverzitete, s katerim lahko določimo odstopanje od naključnega parjenja, testiramo selekcijo, modeliramo posledice parjenja v sorodstvu in selekcije in ocenjujemo alelno frekvenco na dominantnih lokusih (Frankham in sod. 2009). Odstopanje od H-W ravnotežja lahko izračunamo s koeficientom *inbreedinga* (F_{IS}) (Lowe in sod. 2004).

1.4.3 Koeficient *inbreedinga* (F_{IS})

Do parjenja v ožjem sorodstvu (angl. *inbreeding*) prihaja, ko se med seboj pari osebki, ki si delijo enega ali več skupnih prednikov. Proces je posebej pogost v majhnih populacijah, kjer so po nekaj generacijah parjenja v sorodstvu vsi osebki v sorodu (Frankham in sod. 2009). Zaradi parjenja v sorodstvu prihaja do večjega deleža homozigotov na lokusih, kar močno zmanjša genetsko diverzitetu osebkov v populaciji (Freeland in sod. 2011). Parjenje v sorodstvu ima na populacijo in osebke številne negativne posledice. V populaciji lahko privede do zmanjšane razmnoževalnega potenciala in manjšega preživetja osebkov (zmanjšan fitness (uspešnost) populacije). Do *inbreedinga* lahko pride tudi pri naključnem parjenju v majhnih populacijah, kjer se v tem primeru zgodi genetski zdrs, kar vodi v izgubo heterozigotnosti. Posledica tega je, da se osebki, kljub naključnemu parjenju, pari z osebki, s katerimi si delijo skupne prednike (Mills 2013).

Parjenje v sorodstvu lahko zaznamo z izračunom koeficienta *inbreedinga* (F_{IS}). To je mera genetske diverzitete, ki opiše izgubo heterozigotnosti, ki nastane zaradi nenaključnega parjenja ali genetskega zdrsa v populaciji (*ibid.*). Pove nam razliko med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo v vsaki subpopulaciji zaradi nenaključnega parjenja osebkov (Frankham in sod. 2009; Hamilton 2009; Mills 2013).

Koeficient *inbreedinga* izračunamo iz razlike med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo v populaciji: $F_{IS} = (H_e - H_o) / H_e$ (Lowe in sod. 2004).

Pozitivne vrednosti koeficienta F_{IS} označujejo večjo povezanost, negativne vrednosti F_{IS} pa manjšo povezanost med posamezni osebki v populaciji glede na model naključnega parjenja (Wright 1965).

1.4.4 Število alelov (NA)

Je število, ki nam pove število alelov na posameznem lokusu. Število alelov na lokusu je funkcija, ki se postopoma povečuje in nikoli ne doseže asimptote. Zato pri večjemu številu vzorcev najdemo več redkih alelov (Lowe in sod. 2004). Če je na lokusu v populaciji prisoten več kot en alel, je lokus polimorfen (Mills 2013). Mera je odvisna od velikosti vzorca, zato jo pogosto nadomestimo z izbiro bogastva alelov (AR) (Höglund 2009), ki korigira število alelov in velikost vzorca.

1.5 Namen in cilji dela

Namen diplomskega dela je bil s pomočjo genotipizacije mikrosatelitnih lokusov določiti populacijsko strukturo srnjadi v modelnem lovišču Oljka, Šmartno ob Paki, in ugotoviti sorodstvene odnose med osebki te vrste, vključenimi v vzorec. Z uporabo molekularnih analiz smo genotipizirali 74 osebkov na 11 lokusih in tako določili genetsko diverziteto in oceno sorodnosti populacije.

Cilji dela:

1. izolacija DNA in pomnoževanje mikrosatelitnih markerjev iz pridobljenih tkivnih vzorcev;
2. analiza mikrosatelitnih lokusov;
3. analiza populacijske strukture in sorodnosti populacije.

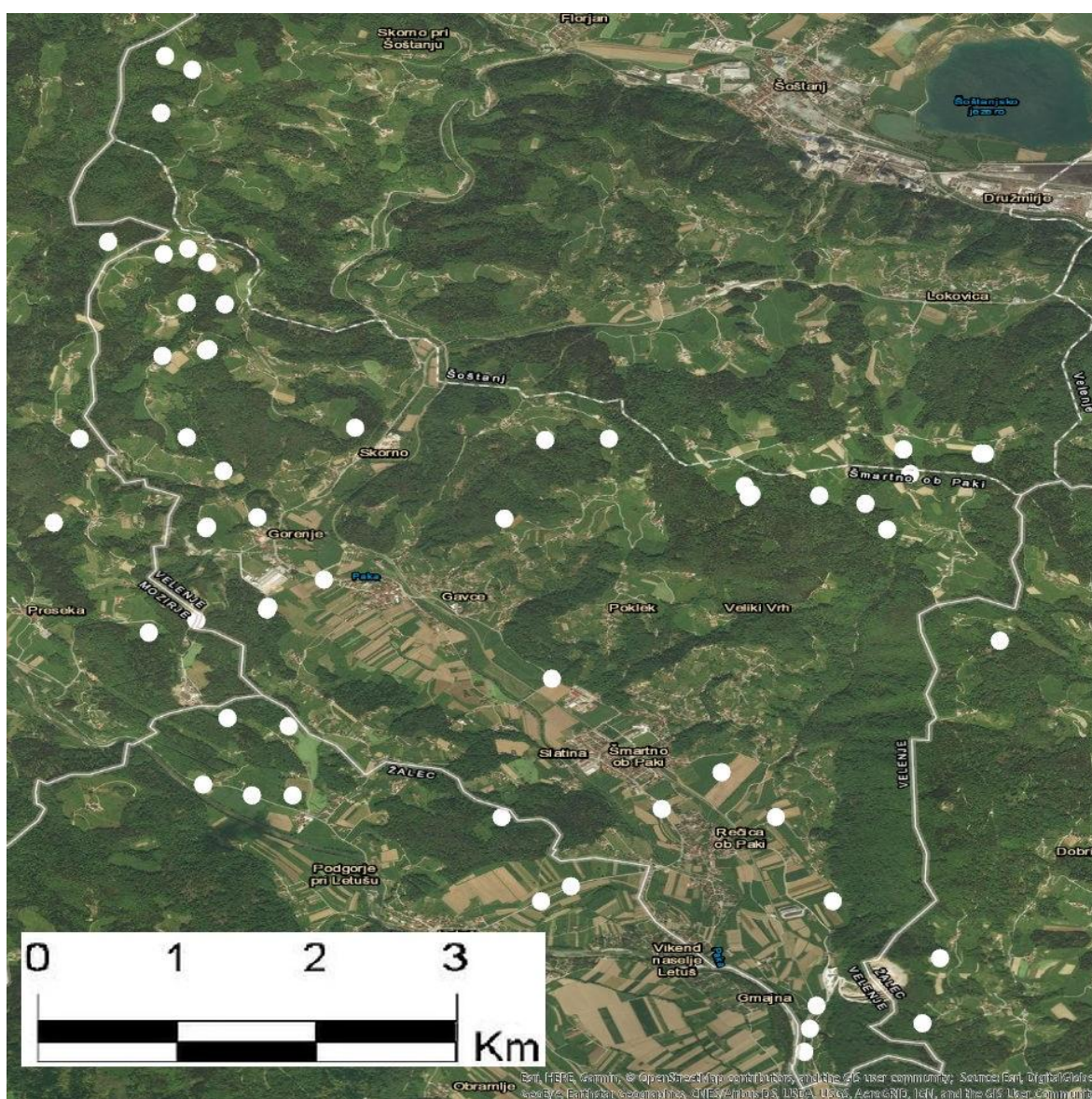
Hipoteze:

1. Na območju modelnega lovišča Oljka, Šmartno ob Paki, obstaja enotna populacija srnjadi.
2. S pomočjo analize mikrosatelitnih lokusov lahko sklepamo na sorodstvena razmerja med osebki.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Vzorčenje

Vzorci srnjadi so bili pridobljeni v lovišču Oljka, Šmartno ob Paki (Savinjsko-Kozjansko lovskoupravljensko območje, osrednja Slovenija), in sicer v sklopu rednega odvzema srnjadi (Slika 1). Vzorci so bili odvzeti v letih 2017 (junij – december) in 2018 (januar – maj), in sicer tako od odstreljenih kot tudi povoženih (na cesti ali železnici) osebkom. Osebkom je bil odvzet majhen košček mišičnega tkiva (s predela stegna, vrata ali glave), ki je bil nato shranjen v etanolu vse do laboratorijskih analiz.



Slika 1: Geografski prikaz lokacij odvzema osebkom srnjadi, ki so bili vključeni v vzorec. Območje v sredini slike, omejeno z belo črto, predstavlja Občino Šmartno ob Paki.

2.2 Izolacija DNA

Izolacija je potekala po protokolu proizvajalca PEQLAB s kitom za izolacijo: peqGOLD Tissue DNA Kits (VWR 2018). Izolirali smo vzorce iz svežega tkiva (koščki mišičnine, shranjeni v etanolu). Izolacija je potekala tako, da smo s skalpelom odrezali košček tkiva, ki smo ga na papirnati brisački narezali na manjše koščke ter zmacerirali s skalpelom. Tako pripravljeno tkivo smo prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko. Za vsak vzorec smo očistili pribor in zamenjali brisačke, da ne bi prišlo do kontaminacije med vzorci. Sledila je razgradnja tkiva, kjer smo vzorcem dodali 400 μ L DNA Lysis Buffer T pufra, 20 μ L Proteinaze K in 15 μ L RNaze A. Vzorce smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali čez noč na 50 °C. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali na maksimalni hitrosti za tri minute, da smo odstranili večje delce materiala. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, vsakemu vzorcu dodali 200 μ L DNA Binding pufra in premešali s pipetiranjem. Raztopino smo nato prepipetirali na kolone za izolacijo (PerfectBind DNA Column), ki so bile položene na zbiralno mikrocentrifugirko. Vzorce smo centrifugirali eno minuto na 10.000 obratih. Zavrgli smo zbiralno mikrocentrifugirko in položili kolono v novo zbiralno mikrocentrifugirko. Nato je sledilo čiščenje DNA, tako da smo v kolono dodali 650 μ L DNA Wash pufra in centrifugirali na sobni temperaturi eno minuto na 10.000 obratov. Kolono smo nato prestavili v novo zbiralno mikrocentrifugirko in dodali 650 μ L DNA Wash 2 pufra ter centrifugirali na sobni temperaturi za dve minuti na 10.000 obratov. Sledila je elucija DNA, pri kateri smo kolono položili v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko ter dodali 200 μ L Elution pufra. Vzorce smo inkubirali na sobni temperaturi za tri minute in jih nato centrifugirali na sobni temperaturi eno minuto na 6.000 obratov. Odstranili smo kolono in shranili mikrocentrifugirko, ki je vsebovala čisto DNA. Vzorce smo shranili na -20°C za nadaljnje analize.

2.3 Verižna reakcija s polimerazo

Po izolaciji DNA je sledila priprava vzorcev za verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda pomnožitve majhne koncentracije DNA s selektivnim pomnoževanjem dela DNA, na katerega se vežejo začetni oligonukleotidi (Griffiths in sod. 2008; Mills 2013). Za PCR reakcijo potrebujemo izolirano DNA, *Taq* polimerazo, ki v procesu podaljševanja DNA verige dodaja deoksiribonukleotid trifosfate na 3' konec nastajajoče verige, par začetnih oligonukleotidov (so kratke sekvence, dolge 20 – 30 nukleotidov) in deoksiribonukleotide (dNTP) (Brown 2007).

PCR reakcija je sestavljena iz treh korakov (Awise 2004; Mills 2013):

1. denaturacija dvojne vijačnice (angl. *denaturation*) pri visoki temperaturi (okrog 94 °C), kjer dvojna vijačnica denaturira v dve enojni verigi;
2. prileganje začetnih oligonukleotidov (angl. *annealing*) na obeh straneh verige poteka pri temperaturi od 55 do 65 °C;
3. podaljšanje verige (angl. *extension*) poteka pri nekoliko višji temperaturi, tj. okrog 72 °C, ki je optimalna temperatura za delovaje *Taq* polimeraze. *Taq* polimeraza podaljšuje nastajajočo DNA verigo z dodajanjem deoksiribonukleotidov.

PCR reakcija se ponovi približno 30-krat, število molekul pa s cikli eksponentno narašča. Tako po 30 ciklih dobimo več kot 250 milijonov kopij DNA (Brown 2007).

2.4 Določanje mikrosatelitnih lokusov

2.4.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za analizo mikrosatelitnih lokusov smo uporabili 11 lokusov, ki so bili razviti za evropsko srno (Olano-Marin in sod. 2014). Značilnosti lokusov so opisane v Preglednici 2.

Preglednica 2: Lastnosti 11 mikrosatelitnih lokusov, ki so bili uporabljeni na 74 vzorcih. Za vsak lokus je prikazan njegov ponovitveni motiv, začetno oligonukleotidno zaporedje, barva, količina uporabljenega začetnega oligonukleotida v reakciji in temperatura prileganja. Lokusi s »touchdown« profilom so označeni s kratico TD.

Ime lokusa	Temperatura prileganja	Količina začetnega oligonukleotida (μL)	Ponovljen motiv
BM1818	54 °C	1,0	(TG) _n
BM757	54 °C	1,0	(GT) ₁₄
CSSM66	54 °C	0,6	(AC) _n
NVHRT21	57 °C	1,0	(GT) ₁₆ (GC) ₄ GT
NVHRT73	55 °C	1,0	(CT) ₄ GT(CT) ₃ GCCTGT (CT) ₂ CCTT(CT) ₃ TT (CT) ₁₃ CACT(CA) ₈ TA(CA) ₃
NVHRT24	55 °C	0,6	(TG) ₂ (TA) ₂ (CA) ₁₆ (TA) ₃ (CA) ₃ (TA) ₅
NVHRT48	55 °C	1,0	(GT) ₂ ATGTAT(GT) ₆ AT(GT) ₁₂
NVHRT16	55 °C	1,0	(CA) ₅ TA(CA) ₅ (TG) ₂ CG(CA) ₁₉
Roel	TD/45 °C	1,0	(CA) ₄ TA(CA) ₇
ETH225	TD/45 °C	1,0	18xCA
Roe8	TD/45 °C	0,6	(CA) ₁₀ CG(CA) ₆

Reakcijska mešanica s končnim volumnom 10 μL je vsebovala 1 μL DNA, 3,9 μL Kappa multiplex (Biosystem), 0,8 μL BSA (Bovine Serum Albumine), par začetnih oligonukleotidov (volumni za posamezen lokus so zapisani v preglednici 1), in ddH₂O. PCR reakcija je potekala po dveh različnih temperaturnih protokolih, osem lokusev je potekalo po navadnem, preostali trije pa po *touchdown* temperaturnem profilu.

Pri lokusih z navadnim protokolom je potekala reakcija takole:

BM18181, BM757, CSSM66:

Po 15-minutni denaturaciji na 95 °C sta sledila dva cikla po dve minuti denaturacije na 94 °C, 20 sekund prileganja začetnih oligonukleotidov (temperatura odvisna od lokusa, preglednica 1) in 25 sekund podaljševanja verige na 72 °C. Sledilo je 31 ciklov z denaturacijo na 94 °C za 15 sekund, 20 sekund prileganja oligonukleotidov (temperatura odvisna od lokusa, preglednica 1) in 25 sekund podaljševanja verige na 72 °C. Na koncu je potekal še dodatni cikel podaljševanja verige za 30 minut na 72 °C.

NVHRT21:

Po 15-minutni denaturaciji na 95 °C je sledilo 30 ciklov za eno minuto denaturacije na 95 °C, 30 sekund prileganja začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 57 °C in ena minuta podaljševanja verige na 72 °C. Po 35 ciklih je sledil še en dodatni cikel podaljševanja verige za 30 minut na 72 °C.

NVHRT73, NVHRT24:

Po 15-minutni denaturaciji na 95 °C je sledilo 35 ciklov za eno minuto denaturacije na 95 °C, 30 sekund prileganja začetnih oligonukleotidov (temperatura odvisna od lokusa, preglednica 1) in ena minuta podaljševanja verige na 72 °C. Po 35 ciklih je sledil še en dodatni cikel podaljševanja verige za 10 minut na 72 °C.

NVHRT48, NVHRT16:

Po 15-minutni denaturaciji na 95 °C je sledilo 30 ciklov za eno minuto denaturacije na 95 °C, ena minuta prileganja začetnih oligonukleotidov (temperatura odvisna od lokusa, preglednica 1) in dve minuti podaljševanja verige na 72 °C. Po 35 ciklih je sledil še en dodatni cikel podaljševanja verige za 10 minut na 72 °C.

Pri lokusih s *touchdown* profilom je potekala reakcija takole:

Roe1, ETH225, Roe8:

Po 15-minutni denaturaciji na 95 °C je sledilo 10 ciklov za 30 sekund denaturacije na 95 °C, 30 sekund prileganja začetnih oligonukleotidov na 55 °C (temperatura prileganja se je zmanjšala za 1 °C na cikel) in ena minuta podaljševanja verige na 72 °C. Sledilo je 17 ciklov z denaturacijo na 95 °C za 30 sekund, prileganje na 45 °C za 30 sekund in podaljševanje verige na 72 °C za eno minuto. Na koncu je sledil še en dodatni cikel podaljševanja verige za 10 minut na 72 °C.

2.4.2 Fragmentna analiza

Verižni reakciji s polimerazo je sledila fragmentna analiza. Za fragmentno analizo smo zmešali reakcijsko zmes s končnim volumnom 12,3 µL, ki je bila sestavljena iz 0,3 µL LIZ-a 500 (dolžinski standard) in 12 µL formamida. Reakcijsko zmes smo zmešali na vorteksu. Nato smo na ploščo nanegli 12,3 µL reakcijske zmesi in 1 µL vzorca ter jo pokrili s septo in jo položili na ciklični termostat za pet minut na 95 °C, da je potekla denaturacija. Po potekli denaturaciji smo preložili ploščo z vzorci na zmrznjeno ploščo, da so se vzorci ohladili. Ko se je plošča ohladila, smo jo na hitro scentrifugirali ter položili na sekvenator (genetski analizator ABI Prism 3130).

2.4.3 Analiza mikrosatelitnih lokusov

2.4.3.1 Vizualizacija alelov

Rezultate, ki smo jih pridobili s sekvenatorjem, smo analizirali v programu GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems), kjer smo preverili uspešnost pomnoževanja vzorcev ter določili pozicije alelov na lokusih. Pri vzorcih, kjer pomnoževanje določenega lokusa ni bilo uspešno, smo pod rezultate zapisali 000 (nulti alel). Podatke smo zaokrožili na cela števila in jih shranili v Excel tabelo za nadaljnje analize.

2.4.3.2 Analiza genetske diverzitete

Za izračun števila alelov (NA) in bogastva alelov (AR) smo uporabili program FSTAT 2.9.3.2. (Goudet 2001).

V programu Genepop (Raymond in Rousset 1995) smo opravili Hardy-Weinbergov test ravnotežja (HWE) za vsak lokus posebej. Program izračuna odklon od HWE ravnotežja po metodi Markove verige (angl. *Markov chain model*). Za izračun smo uporabili 1000 ponovitev.

Pričakovano heterozigotnost (H_e) in opaženo heterozigotnost (H_o) smo izračunali v programu Genetix 4.05 (Belkhir in sod. 2004).

Inbreeding koeficient (F_{IS}) smo izračunali v programu Genepop (Raymond in Rousset 1995).

2.4.3.3 Analiza genetske strukture

Genetsko strukturo smo analizirali v programu STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard in sod. 2000). Program določi populacijsko strukturo z uporabo podatkov genotipiziranja za K populacij (klastrov, skupin), od katerih je vsaka populacija/klastar karakterizirana z nizom alelnih frekvenc na vsakem lokusu (*ibid.*). Posamezniki so dodeljeni eni populaciji/klastru ali v primeru mešanega porekla več populacijam/klastrom. Program analizira razlike v porazdelitvi genetskih variant med populacijami/klastri z Bayesovim algoritmom (Porras-Hurtado in sod. 2013). Predvidevamo, da je osebek i podedoval del genoma (q) od prednikov v populaciji/klastru K (Pritchard in sod. 2000). Hibridne osebkke lahko določimo na podlagi vrednosti q , pri kateri hibridni osebkki predstavljajo srednjo vrednost. Vrednosti q se gibljejo od 0 do 1, pri čemer 0 pomeni, da osebek nima nobene podobnosti s starševsko populacijo/klastrom, 1 pa da je identičen starševski populaciji/klastru. Hibridni osebkki prve generacije imajo vrednost $q = 0,5$ (Vaha in Primmer 2006). Mejna vrednost q za določitev čistih osebkov starševskih skupin je v raziskavah različna (*ibid.*).

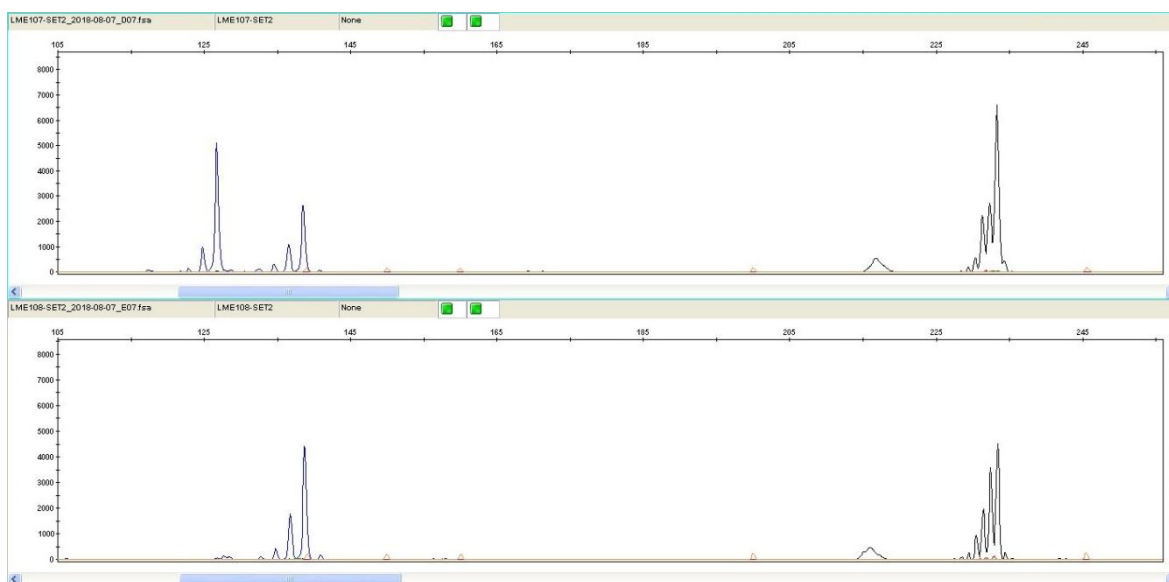
Izvedli smo analizo na 74 vzorcih na enajstih lokusih, pri kateri smo uporabili model mešanja (angl. *admixture model*) in korelirane alelne frekvence med populacijami (angl. *correlated allele frequencies*). MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) veriga je delovala 1.000.000 generacij, pri čemer smo začetnih 100.000 generacij zavrgli. Število skupin (K) smo določili od 1 do 10, za vsako skupino smo naredili deset ponovitev. Nato smo najverjetnejše število skupin določili s programom STRUCTURE HARVESTER Web v0.6.94 (Earl in von Holdt 2012) z metodo Evanno (Evanno in sod. 2005). Rezultate genetske strukture, ki smo jih pridobili s programom Structure, smo grafično prikazali v programu CLUMPP (Jakobsson in sod. 2007) in Distruct (Rosenberg 2003).

3 REZULTATI

3.1 Analiza mikrosatelitnih lokusov

3.1.1 Vizualizacija alelov in preverjanje kakovosti analize mikrosatelitnih lokusov

Uspešno smo analizirali velikost alelov in heterozigotnost alelov na enajstih lokusih pri 74 vzorcih. Rezultate smo zapisali v preglednico in jih zaokrožili na celo število. Lokuse, kjer se alel ni pomnožil, smo označili z 000 (ničeln alel). Med 74 analiziranimi vzorci jih je 67 imelo vse alele, 7 vzorcev pa je vsebovalo enega ali več ničelnih alelov.



Slika 2: Prikaz izrisa alelov v programu Genemapper 4.1v. Prikazan je primer izrisa za dva osebk in dva lokusa, NVHRT24 (moder alel) in NVHRT73 (črn alel). Moder alel je zgoraj prikazan kot heterozigot, spodaj kot homozigot; črni alel je v obeh primerih homozigot. Z oranžnimi vrhovi so označeni velikostni standardi (angl. *size standard*).

3.1.2 Analiza genetske diverzitete

Vsi uspešno pomnoženi lokusi so vsebovali od 2 do 14 alelov na lokus. Največje število alelov je imel lokus Roe8 ($A = 14$), najmanjše pa lokus Roe1 ($A = 2$). Na vseh enajstih lokusih skupaj je bilo 77 alelov (v povprečju 7 alelov na lokus). Rezultati razpona alelov in števila alelov za posamezen lokus so prikazani v Preglednici 3.

Preglednica 3: Razpon alelov in število alelov za vsak lokus.

Lokus	Razpon alelov (bp)	Število alelov (NA)
BM1818	247-263	8
BM757	158-211	7
CSSM66	167-185	6
NVHRT21	152-178	11
NVHRT73	210-267	7
NVHRT24	110-150	7
NVHRT48	80-95	3
NVHRT16	151-175	6
Roe1	131-133	2
ETH225	137-155	6
Roe8	59-101	14
Vsota		77
Povprečje		7

Rezultati Hardy-Weinbergovega testa ravnotežja glede na lokus so prikazani v Preglednici 4. Lokusi, ki imajo statistično značilne razlike pri stopnji tveganja $p < 0,05$, niso v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Nasprotno so lokusi, ki nimajo statistično značilne razlike ($p > 0,05$), v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

Osem lokusov se je statistično značilno razlikovalo: BM1818, BM757, NVHRT73, NVHRT24, NVHRT48, NVHRT16, ETH225 in Roe8, ostali trije lokusi (CSSM66, NVHRT21 in Roe1) pa ne.

Lokusi CSSM66, NVHRT21 in Roe1 so torej v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, ostali pa ne.

Preglednica 4: Hardy-Weinbergov test ravnotežja glede na lokus. Odebeljeni so statistično značilni rezultati ($p < 0,05$).

Lokus	H-W
BM1818	0,0040
BM757	0,0001
CSSM66	0,0715
NVHRT21	0,2293
NVHRT73	0,0000
NVHRT24	0,0254
NVHRT48	0,0000
NVHRT16	0,0073
Roe1	1,0000
ETH225	0,0000
Roe8	0,0015

Pričakovano heterozigotnost (H_e), opaženo heterozigotnost (H_o) in povprečno število alelov na lokus smo pridobili s pomočjo programa Genetix 4.05 (Belkhir in sod. 2004). V Preglednici 5 so prikazani rezultati programa Genetix. Pričakovana heterozigotnost se je nahajala med vrednostmi 0,2295 in 0,9337, opažena heterozigotnost je bila manjša in je bila med vrednostmi 0,1233 in 0,7639.

S programom Genepop smo kot rezultat dobili vrednosti koeficienta *inbreeding* F_{IS} , ki so po posameznem lokusu prikazani v Preglednici 5. Pozitivne vrednosti koeficienta F_{IS} označujejo večjo povezanost, negativne vrednosti pa manjšo povezanost med posamezni osebkami v populaciji glede na model naključnega parjenja (Wright 1965).

Preglednica 5: Vrednosti pričakovane heterozigotnosti, opažene heterozigotnosti in inbreeding koeficienta F_{IS} .

Lokus	He	Ho	F_{IS}
BM1818	0,7889	0,6575	0,1664
BM757	0,6731	0,4730	0,2973
CSSM66	0,6382	0,6892	-0,0799
NVHRT21	0,7797	0,7123	0,0863
NVHRT73	0,2295	0,1233	0,4627
NVHRT24	0,6399	0,6620	-0,0345
NVHRT48	0,7891	0,5946	0,2465
NVHRT16	0,7874	0,6901	0,1235
Roe1	0,4429	0,4507	-0,0176
ETH225	0,8112	0,4000	0,5069
Roe8	0,9337	0,7639	0,1818
Skupaj	0,6831	0,5651	0,1763

Rezultati programa Cervus, ki nakazujejo potencialna sorodstvena razmerja (potencialni starš in potomec), so prikazani v Preglednici 6 (za potencialne očete) in v Preglednici 8 (za potencialne matere). Rezultati so prikazani v obliki parov potomec-starš. Prikazana je tudi vrednost *Pair LOD score*, ki označuje verjetnost pravilnosti rezultatov. Če je *Pair LOD score* enak 0, potem je verjetnost, da je naveden potencialni starš tudi dejansko starš, enaka 50 %. Če je vrednost *Pair LOD score* negativna, je verjetnost <50 %, če pa je ta vrednost pozitivna, je verjetnost >50 %. Če je *Pair LOD score* večji od vrednosti 3, potem je rezultat zagotovo pravilen, če pa je manjši od vrednosti -2, potem rezultat zagotovo ni pravilen.

Iz Preglednice 6 je razvidno, da je osebek LME-18 zanesljivo potomec očeta LME-14 (vrednost parametra >3), medtem ko sta srnjaka LME-14 (za potomca LME-17) in LME-9 (za potomca LME-43) bila očeta z verjetnostjo >50 %.

Preglednica 6: Pregled potomcev in njihovih potencialnih očetov. V preglednici so predstavljeni samo tisti potencialni očetje, ki imajo *Pair LOD score* vrednost pozitivno oz. je verjetnost, da so to dejansko očetje potomcev iz prve kolone, >50 %.

Oznaka potomca	Oznaka potencialnega očeta (srnjaka)	<i>Pair LOD score</i>
LME-17	LME-14	0,62
LME-18	LME-14	3,70
LME-43	LME-9	0,91

Atributni podatki o srnjakih in njihovih potencialnih potomcih so prikazani v Preglednici 7. Iz nje je razvidno, da so vse te kombinacije možne: vsi potomci so bili v letu 2017 mladiči, srnjaki pa odrasli samci, ki so v preteklem letu (2016) lahko sodelovali v paritvi (prsku). Čeprav se lokacije mest uplenitve med potencialnimi očeti in potomci precej razlikujejo (Slika 3), to ni nič nenavadnega, če upoštevamo poznane paritvene izlete samic (srn) tudi na daljše razdalje (Lovari in sod. 2008; Bocci in sod. 2013; Debeffe in sod. 2014).

Preglednica 7: Spol, datum in lokacija odvzema potencialnih očetov (srnjakov) in njihovih potomcev.

Oznaka potomca/starša	Spol	Starost potomca/starša	Datum odvzema	Lokacija odvzema
LME-17	F	0,5	02/09/2017	Gneč
LME-18	F	0,5	02/09/2017	Skorno
LME-43	F	0,5	12/10/2017	Gavce
LME-9	M	8-9	05/08/2017	Gora Oljka
LME-14	M	3-4	23/08/2017	Veliki Vrh

V primeru srn (mater) in njihovih potencialnih potomcev so povezave precej bolj izrazite. Najbolj verjetni pari (torej z 100 % verjetnostjo) so: srna LME-42 in potomca LME-44 ter LME-3; srna LME-49 in potomca LME-5 ter LME-30; srna LME-23 in potomca LME-24 ter LME-6 (Preglednica 8).

Preglednica 8: Pregled potomcev in njihovih potencialnih mater. Za razlago vrednosti glej Preglednico 6.

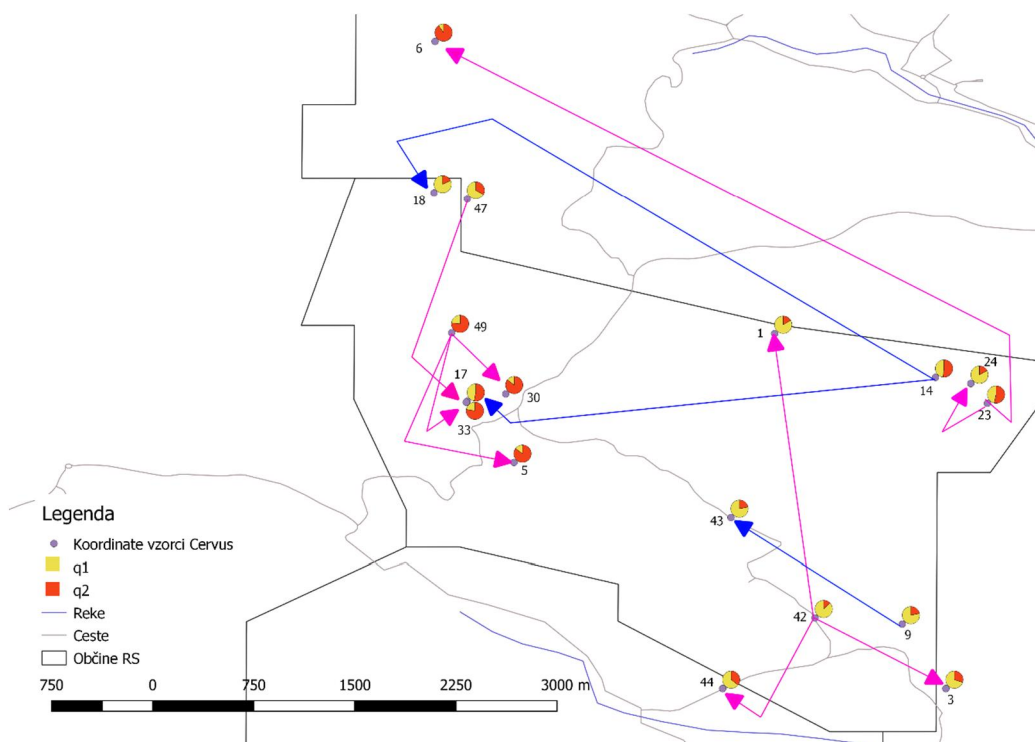
Oznaka potomca	Oznaka potencialne matere (srne)	Pair LOD score
LME-1	LME-42	2,39
LME-3	LME-42	3,70
LME-5	LME-49	3,42
LME-6	LME-23	5,39
LME-17	LME-47	0,4
LME-24	LME-23	5,56
LME-30	LME-49	5,89
LME-33	LME-49	1,95
LME-44	LME-42	6,63

Atributni podatki o srnah in njihovih potencialnih potomcih so prikazani v Preglednici 9. Tudi v tem primeru so vse te kombinacije možne: vsi potomci so bili v letu 2017 mladiči ali enoletni osebki, srne pa odrasle samice, ki so v preteklem letu (2016) skoraj zagotovo sodelovale v prsku. V primeru srn z več kot dvema potomcema so le-ti vedno pripadali dvema kohortama (mladiči in enoletni osebki), torej je tudi to možno glede na pričakovano število mladičev, ki jih je v določenem letu imela srna v tem delu Slovenije oz. jih lahko ima srna na splošno (praviloma dva; Flajšman in sod., 2017a, 2017b). Tudi lokacije odvzema potencialnih mater in potomcev potrjujejo p pravilnost določitve sorodstvenih razmerij (Slika 3): večina potomcev (med njimi vsi mladiči) so bili uplenjeni na oddaljenosti <1 km od

lokacije odvzema srne, na večji oddaljenosti pa sta bila odvzeta dva enoletna osebka moškega spola, tj. lanščaka, za katere je pri tej vrsti znana mladostna disperzija tudi na nekoliko večje razdalje (Wahlström 1994; Wahlström in Liberg 1995).

Preglednica 9: Spol, datum in lokacija odvzema potencialnih mater (srn) in njihovih potomcev.

Oznaka potomca/starša	Spol	Starost potomca/starša	Datum odvzema	Lokacija odvzema
LME-1	M	1	08/06/2017	Veliki vrh
LME-3	M	1	24/06/2017	Gora Oljka
LME-5	M	1	28/06/2017	Slatine
LME-6	M	1	11/07/2017	Gora Oljka
LME-17	F	0,5	02/09/2017	Gneč
LME-24	F	0,5	03/09/2017	Veliki vrh
LME-30	M	0,5	13/09/2017	Skorno
LME-33	M	1	17/09/2017	Gneč
LME-44	F	0,5	19/10/2017	Slatine
LME-23	F	3-4	03/09/2017	Veliki vrh
LME-42	F	3-4	01/10/2017	Šmartno ob Paki
LME-47	F	3-4	20/12/2017	Skorno
LME-49	F	5-7	30/12/2017	Skorno



Slika 3: Lokacije odvzema osebkov z oznako starševskega odnosa. Prikazana smer puščice iz starša na potomca označuje sorodstvene povezave med osebki (glej Preglednici 6 in 8). Puščice rožnate barve označujejo materinsko povezavo, modre barve pa očetovsko povezavo; osebek LME-17 je povezan z obema potencialnima staršema. Označeni so vsi odnosi z $>50\%$ verjetnostjo starševstva.

3.2 Analiza populacijske strukture

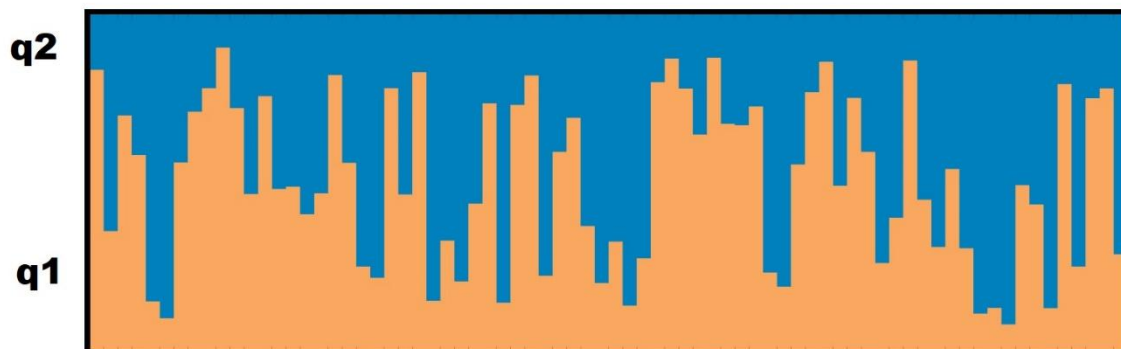
S programom *Structure harvester* smo z metodo Evanno za najverjetnejše število klastrov (skupin) določili dve skupini ($K = 2$; $\Delta K = 4,62$; $\text{Ln P (D)} = -2217,2$) genetsko prepoznavno različnih osebkov srnjadi, odvzetih v lovišču Oljka v letih 2017 in 2018.

Delež genotipov vseh 74 analiziranih osebkov je prikazan na Sliki 4 in v Preglednici 10.

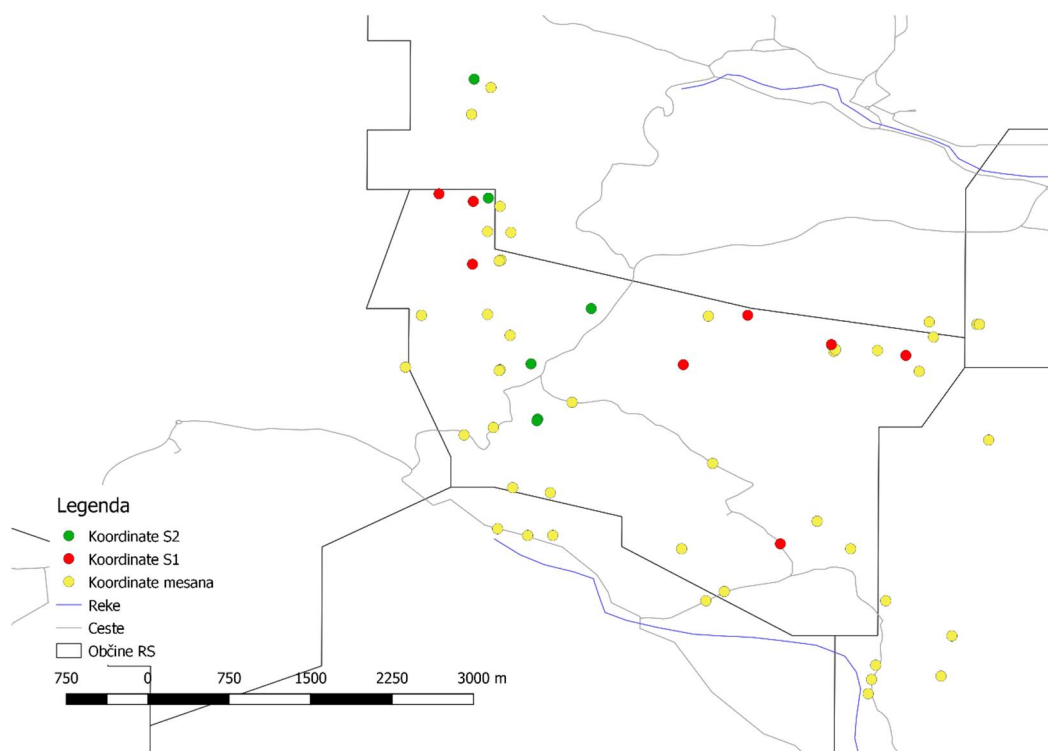
Preglednica 10: Razporejenost posameznih osebkov v dve ločeni skupini (K2), prikazanih na Sliki 4. Razporejenost smo določili glede na verjetnost q . Osebek pripada določeni skupini, če je verjetnost $q > 0,8$ v tisti skupini. Če je $0,2 < q < 0,8$, potem osebek pripada mešani skupini oz. ima lastnosti (genotip) obeh skupin.

ID (LME)	$q1$	$q2$	ID (LME)	$q1$	$q2$
1	0.836	0.164	38	0.326	0.674
2	0.357	0.643	39	0.135	0.865
3	0.701	0.299	40	0.276	0.724
4	0.582	0.418	41	0.799	0.201
5	0.148	0.852	42	0.869	0.131
6	0.098	0.902	43	0.780	0.220
7	0.560	0.440	44	0.644	0.356
8	0.711	0.289	45	0.872	0.128
9	0.781	0.219	46	0.676	0.324
10	0.902	0.098	47	0.671	0.329
11	0.722	0.278	48	0.727	0.273
12	0.467	0.533	49	0.233	0.767
13	0.758	0.242	50	0.192	0.808
14	0.482	0.518	51	0.555	0.445
15	0.489	0.511	52	0.769	0.231
16	0.407	0.593	53	0.860	0.140
17	0.469	0.531	54	0.491	0.509
18	0.820	0.180	55	0.753	0.247
19	0.559	0.441	56	0.593	0.407
20	0.251	0.749	57	0.262	0.738
21	0.218	0.782	58	0.397	0.603
22	0.781	0.219	59	0.864	0.136
23	0.466	0.534	60	0.450	0.550
24	0.828	0.172	61	0.310	0.690
25	0.149	0.851	62	0.541	0.459
26	0.329	0.671	63	0.306	0.694
27	0.208	0.792	64	0.112	0.888
28	0.438	0.562	65	0.129	0.871
29	0.737	0.263	66	0.080	0.920
30	0.144	0.856	67	0.493	0.507
31	0.731	0.269	68	0.436	0.564
32	0.819	0.181	69	0.128	0.872
33	0.224	0.776	345(70)	0.794	0.207
34	0.593	0.407	350(71)	0.252	0.748
35	0.693	0.307	351(72)	0.751	0.249
36	0.372	0.628	358(73)	0.781	0.219
37	0.202	0.798	359(74)	0.288	0.712

Odebeljeno so prikazane verjetnosti $q > 0,8$.



Slika 4: Vrednosti $q1$ in $q2$ vzorčenih osebkov za K2, pridobljeno s programom *Structure*.

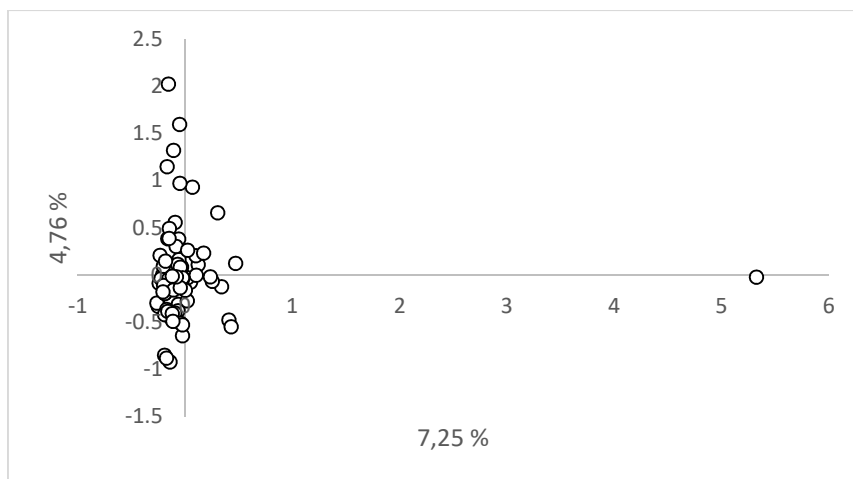


Slika 5: Razvrstitev lokacij odvzema osebkov srnjadi po pripadnosti določenem genotipu (S1, S2 in mešana skupina). Rdeče oznake pripadajo skupini S1, zelene skupini S2 in rumene mešani skupini.

Slika 5 prikazuje prostorsko razvrščanje osebkov treh prepoznanih skupin srnjadi v lovišču Oljka (glej tudi Prilogo B). Medtem ko so osebki mešane skupine dokaj enakomerno razporejeni po celotnem lovišču, so osebki skupine S1 (rdeče obarvani) prisotni samo v revirjih Skorno (severozahodni del lovišča) in Veliki Vrh (severovzhodni del), ne pa tudi v revirju Slatine, ki leži južno in ga od prejšnjih loči reka Paka (na karti te reka ni prikazana). Osebki, ki pripadajo skupini S2 (zelena barva), so prisotni samo v revirju Skorno oz. severno od naselja Gorenje in magistralne ceste Velenje-Mozirje. Razporeditev osebkov različnih genetskih skupin v prostoru lahko nakazuje na omejen, a vendarle prisoten barierni efekt

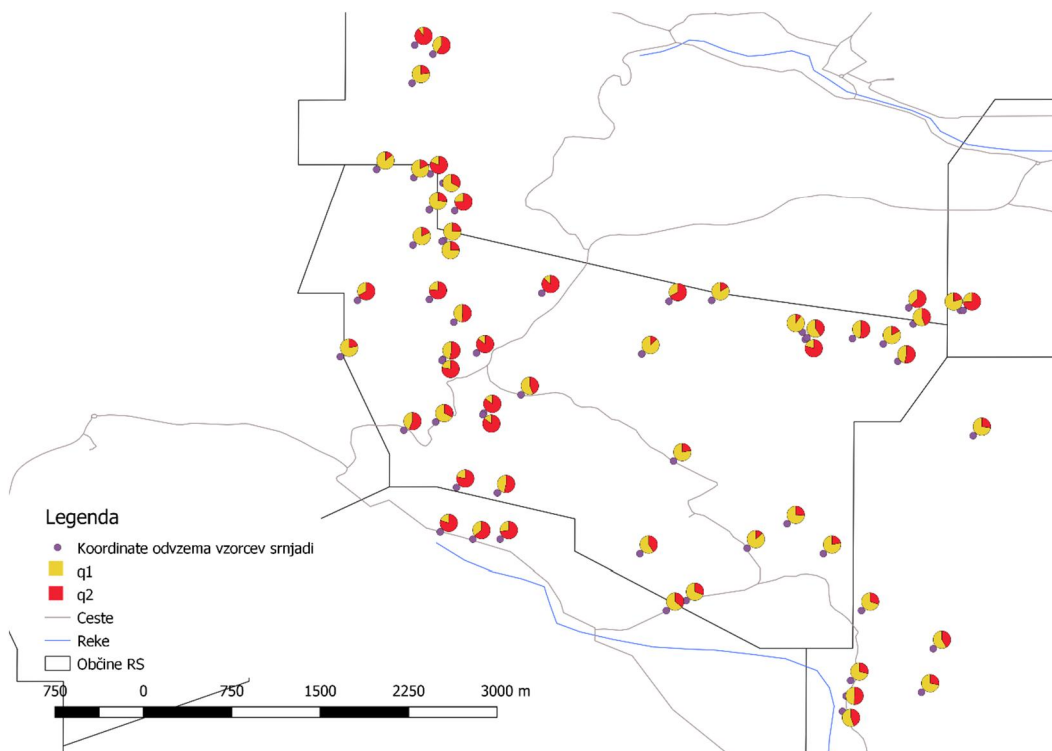
Pake kot manjše reke in magistralne ceste na genetski pretok znotraj populacije srnjadi v raziskovalnem območju.

S programom *Genetix* smo izrisali graf, ki ponazarja nekoliko drugačno razvrstitev v skupine v populaciji. Graf je izrisan z metodo FCA (angl. *Factorial Correspondence Analysis*). V tem primeru opazimo, da večina osebkov pripada eni skupini, od katere odstopa samo en osebek.



Slika 6: Razvrščanje osebkov v skupine z metodo FCA.

Lokacije odvzema in genotipi posameznih osebkov srnjadi so prikazani na Sliki 4. Prikazanih je 57 osebkov na od skupno 74, saj za preostalih 17 osebkov nismo imeli na razpolago koordinat lokacij odvzema.



Slika 7: Lokacije odvzema osebkov srnjadi s prikazanim genotipom, določenim s programom Structure, v lovišču Oljka.

4 RAZPRAVA IN SKLEP

Pri računanju heterozigotnosti, Hardy-Weinbergovega ravnotežja, števila alelov in koeficienta *inbreedinga* F_{IS} smo upoštevali vseh 74 vzorcev. Pri računanju sorodnosti s programom *Cervus* smo tudi upoštevali vseh 74 vzorcev, vendar smo pri grafičnih prikazih upoštevali samo tiste vzorce (skupno 57), za katere smo poznali koordinate lokacij odvzema.

Lokusi so bili v glavnem visoko polimorfni (2 do 14 alelov). Devet lokusov je imelo 6-14 alelov, lokus NVHRT16 tri alele in lokus Roe1 dva alela. Povprečno število alelov na lokus je bilo točno 7. Do podobnih rezultatov so prišli tudi v različnih raziskavah na evropski srni (Galan in sod. 2003, Coulon in sod. 2004, 2006; glej tudi Preglednico 11).

Opažena heterozigotnost je bila pri večini lokusov (8 od 11) manjša od pričakovane, le pri treh lokusih (CSSM66, NVHRT24, Roe1) je veljalo obratno. Heterozigotnost je pomembno merilo genetske diverzitete. Visoka heterozigotnost označuje, da je v populaciji velika genetska variabilnost, nizke vrednosti pa kažejo na majhno variabilnost populacije (Frankham in sod. 2009). V preglednici 11 so prikazane povprečne pričakovane in opažene heterozigotnosti, povprečno število alelov in povprečni koeficient *inbreedinga* F_{IS} pričujočega dela in dveh drugih raziskav (Coulon in sod. 2004, 2006). Obe raziskavi sta bili izvedeni v južni Franciji. V prvi raziskavi (2004) so raziskovali vpliv krajinske fragmentacije

na genski pretok pri srnjadi. Medtem ko v drugi raziskavi (2006) pa so raziskovali genetsko strukturo populacije srnjadi, ki je nedavno spet naselila določeno območje, ki je krajinsko fragmentirano.

Preglednica 11: Prikaz povprečij parametrov v primerljivih raziskavah. Prikazane so pričakovana (H_e) in opažena heterozigotnost (H_o), koeficient inbreedinga (F_{IS}), število alelov (NA) in razpon števila alelov.

Raziskava	H_e	H_o	F_{IS}	NA	Razpon NA
Pričujoča raziskava	0,6831	0,5651	0,17634	7	2-14
Coulon in sod. 2004	0,6634	0,6493	0,02076	6,58	2-17
Coulon in sod. 2006	0,6843	0,6720	0,01797	7,5	2-19
Galan in sod. 2003				5,67	2-15

V primerjavi s predhodnimi raziskavami ugotavljamo, da najmanj odstopa vrednost števila alelov, razpon števila alelov in pričakovana heterozigotnost. Medtem ko med študijami najbolj odstopata vrednosti opažene heterozigotnosti in koeficient *inbreedinga* (F_{IS}).

Opažena heterozigotnost je v primerjavi z ostalimi raziskavami nižja. Na vrednost H_o ima vpliv opažena heterozigotnost lokusa NVHRT73, ki znaša 0,1233. Če slednje vrednosti ne bi upoštevali, bi povprečna opažena heterozigotnost znašala 0,6093, kar je bistveno višja vrednost od dobljene (0,5651). Iz prikazanega lahko potrdimo, da je opažena heterozigotnost manjša, kar je lahko posledica usmerjenega izvajanja lova (npr. večji odvzem osebkov, ki živijo bližje gozdnega roba in pogosteje izstopajo na travnike ali podobnih vzrokov).

S programom *Structure harvester* smo za najverjetnejše število klastrov določili dve skupini genetsko prepoznavno različnih osebkov. S programom *Genetix* smo izrisali graf (Slika 4), ki ponazarja genotipsko razvrstitev osebkov glede na genetske razdalje. Iz grafa je razvidno, da pripadajo osebki eni sami večji skupini, kjer vsekakor določeni osebki izstopajo glede na y os, eden pa glede na x os.

V podobni raziskavi (Coulon in sod. 2006) so uporabili za analizo populacijske strukture srnjadi poleg programa *Structure* še program *Geneland* (Guillot in sod. 2005). *Structure* je v tem primeru določil eno samo skupino, medtem ko je *Geneland* določil dve. *Geneland* uporablja metodo Monte Carlo Markovsko verigo (angl. MCMC).

Rezultati v *Genelandu* so kazali šibko vendar pomembno diferenciacijo; prednost programa je ravno v tem, da lahko prepozna šibko genetsko strukturo. Zato bi v prihodnje lahko genotipe analizirali tudi v omenjenem programu.

Rezultati v programu *Structure* prikazujejo, da so osebki mešane skupine dokaj enakomerno razporejeni po celotnem lovišču, medtem ko na severozahodnem in severovzhodnem delu lovišča prevladujejo osebki skupine S1, osebki skupine S2 pa prevladujejo v zahodnem delu lovišča. Taka razporeditev osebkov različnih genetskih skupin v prostoru lahko nakazuje na barierni efekt Pake kot manjše reke in magistralne ceste na genski pretok znotraj populacije srnjadi v raziskovalnem območju.

Genetska strukturiranost srnjadi v lovišču Oljka je verjetno posledica prostorsko-geografskih značilnosti lovišča, saj se na vzhodnem in zahodnem delu nahaja gozdnata krajina, vmes pa je ravnina s prevladujočo kmetijsko krajino, naselji, prometnicami in tudi reko Paka. Reka Paka lahko skupaj z ob njej potekajočima magistralno cesto in železnico tvori bariero med vzhodnim in zahodnim delom lovišča oz. tam živečih osebkov srnjadi. Na severnem delu je ravnina bistveno ožja kot v južnem delu, kar drastično zmanjšuje razdaljo med gozdovi na obeh straneh. Zato severni del lahko predstavlja povezavo med vzhodnim in zahodnim delom lovišča. To lahko dodatno potrjujemo z dejstvom, da se na severnem delu nahaja bistveno več osebkov iz mešane skupine kot na južnem delu. Če so naša predvidevanja pravilna, lahko sklepamo, da je na južnem delu območja prisotna močnejša geografska/urbana bariera, ki zmanjšuje stik med osebki. To na nek način potrjujejo tudi rezultati ocene sorodnosti, ki so podrobneje komentirani že v poglavju Rezultati. Vendar zaradi majhnega števila ocen verjetnega očetovstva (samo tri povezave) in materinstva (devet povezav) težko sklepamo, ali so razlike v prostorki razporeditvi genotipov posledica prisotne bariere, usmerjenega načina lova ali pa specifične paritvene strategije srnjadi.

Torej ena izmed glavnih prednosti tega dela je ta, da smo uspešno genotipizirali velik delež osebkov srnjadi iz območja lovišča Oljka, Šmartno ob Paki, ter pridobili več informacij glede strukturiranosti populacije in sorodnosti določenih osebkov. Pridobili smo tudi pomembne informacije glede geografskih barier, ki vplivajo na populacijo srnjadi.

Ena izmed slabosti našega dela je ta, da težko lahko povzamemo neke konkretne zaključke, saj imamo premalo podatkov na razpolago. Trenutno imamo podatke o koordinatah za 57 vzorcev, medtem ko za ostalih 17 vzorcev nimamo te informacije, zato bomo v nadaljnjem skušali pridobiti te podatke in jih analizirali skupaj z že obdelanimi vzorci.

Dodatno bomo še pridobili podatke drugih osebkov, kar bo dodatno obogatelo naše delo.

6 LITERATURA IN VIRI

- Avise J.C. (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, second edition. Massachusetts, Sinauer Associates.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L et al., (2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier.
- Bhargava A., Fuentes F.F., (2009). Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular biotechnology* 44: 250-266.
- Bocci A., Aiello V., Lovari S. (2013). Excursion behaviour of female roe deer may depend on density, *Behavioural Processes*, Volume 97: 18-20.
- Brown T.A., (2007). *Genomes 3*. New York, Garland Science Publishing.
- Chistiakov D.A., Hellemans B., Volckaert F.A.M., (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1–29.
- Coulon, A. , Cosson, J. F., Angibault, J. M., Cargnelutti, B. , Galan, M. , Morellet, N. , Petit, E. , Aulagnier, S. and Hewison, A. J. (2004), Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology*, 13: 2841-2850.
- Coulon, A. , Guillot, G. , Cosson, J. , Angibault, J. M., Aulagnier, S. , Cargnelutti, B. , Galan, M. and Hewison, A. J. (2006), Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population.
- Debeffe L., Focardi S., Bonenfant C., Mark Hewison A.J., Morellet N., Vanpè C., Heurich M., Kjellander P., Linnell J.D.C., Mysterud A., Pellerin M., Sustr P., Urbano F., Cagnacci F., (2014). A one night stand? Reproductive excursions of female roe deer as a breeding dispersal tactic. *Oecologia* 176: 431-443.
- Earl, D.A. & vonHoldt, B.M., (2012). *Conservation Genet Resour* 4: 359.
- Evanno, G. , Regnaut, S. and Goudet, J., (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.

- Flajšman, K., Jelenko, I., Poličnik, E., Pokorny, B., (2013). Reproductive potential of roe deer (*Capreolus capreolus* L.): Review of the most important influential factors. *Acta Silvae et Ligni* 102, 1-20.
- Flajšman K., Jerina K., Pokorny B., (2017a). Age-related effects of body mass on fertility and litter size in roe deer, *PLOS ONE* 12(4).
- Flajšman, K., Pokorny, B., Chirichella, R., Bottero, E., Mattioli, L., Apollonio, M., (2017b). I can produce more offspring as you can imagine: first records on exceptionally large litters in roe deer in central/southern Europe. *European Journal of Wildlife Research* 63: 42.
- Flajšman, K., Borowik, T., Pokorny, B., Jędrzejewska, B., (2018). Effects of population density and female body mass on litter size in European roe deer at a continental scale. *Mammal Research* 63: 91-98.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A., (2009). *Introduction to conservation genetics*, second edition. Cambridge, Cambridge University Press.
- Freeland J.R., Kirk H., Petersen S.D., (2011). *Molecular ecology*, second edition. Oxford, Wiley-Blackwell.
- Galan, M. , Cosson, J. F., Aulagnier, S. , Maillard, J. C., Thévenon, S. and Hewison, . A., (2003). Cross-amplification tests of ungulate primers in roe deer (*Capreolus capreolus*) to develop a multiplex panel of 12 microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes*, 3: 142-146.
- González, J. Herrero, J. Prada, C. and Marco, J., (2013). Changes in wild ungulate populations in Aragon, Spain between 2001 and 2010. *Galemys* 25: 51-57.
- Goudet J., (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll S.B., (2008). *Introduction to genetic analysis*. New york, W.H. Freeman and Company.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J., (2011). Current trends in microsatellites genotyping, *Molecular ecology resources* 11, 591-611.
- Guillot, G. , Mortier, F. and Estoup, A. (2005), GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5: 712-715.

- Hamilton M.B., (2009). Population genetics. New York, Blackwell-Wiley.
- Höglund J., (2009). Evolutionary Conservation Genetics. Oxford, Oxford University Press.
- Hoshino A.A., Bravo J.P., Macedo N.P., Morelli K.A., (2012). Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. Genetic Diversity in Microorganisms 6: 149-170.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics 23: 1801-1806.
- Kalia K.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K., (2010). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica 177: 309–334.
- Kos I., Potočnik H., (2008). Pomen natančne registracije odvzema srnjadi za načrtovanje nadaljnjih odvzemov - selektivni odstrel vpliva na prirastek pri srnjadi. V: Povzetki 1. slovenski posvet z mednarodno udeležbo o upravljanju z divjadjo: srnjad. Velenje, 22. november 2008. Pokorny B. (ur.), Savinek K. (ur.), Poličnik H. (ur.). Velenje, ERICo, d.o.o.: 17-19
- Kryštufek B., (1991). Sesalci Slovenije. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije.
- Krže B., (2000). Srnjad. Lovska zveza Slovenije, Ljubljana, str.12.
- Krže B., (2012). Evropska srna (srnjad) (*Capreolus Capreolus*), v: Leskovic, B., Pičulin, I., Ambrožič, L. (ur.), Divjad in lovstvo, Lovska zveza Slovenije, Ljubljana, 496-513.
- Lehmann, E. & Sägeser, H., (1986). Handbuch der Säugetiere, Vol. 2/II. Paarhufer Artiodactyla (Ed. by J. Niethammer & F. Krapp). Wiesbaden, Aula Publisher, 233–268. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018.1. www.iucnredlist.org (Datum dostopa: 10. 7. 2018).
- Lorenzini R., Lovari S., (2006). Genetic diversity and phylogeography of the European roe deer: the refuge area theory revisited. London, Biological Journal of the Linnean Society, 88, 85–100. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018.1. www.iucnredlist.org (Datum dostopa: 10. 7. 2018).
- Lorenzini R., Lovari S., Masseti M., (2002). The rediscovery of the Italian roe deer: genetic differentiation and management implications. Rome, Italian Journal of Zoology, 69, 367–379. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018.1. www.iucnredlist.org (Datum dostopa: 10. 7. 2018).
- Lorenzini R., Garofalo L., Xuebo Q., Voloshina I., Lovari S., (2013). Global phylogeography of the genus *Capreolus* (Artiodactyla: Cervidae), a Palaeartic

- meso-mammal, London, Zoological Journal of the Linnean Society, 170, 209-221.
The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018.1. www.iucnredlist.org
(Datum dostopa: 10. 7. 2018).
- Lovari S., Bartolommei P., Meschi F., Pezzo F., (2008). Going out to Mate: Excursion Behaviour of Female Roe Deer. *Ethology* 114: 886-896.
- Lowe A., Harris S., Ashton P., (2004). *Ecological genetics: Design, Analysis and application*. Oxford, Blackwell Publishing.
- Mills L.S., (2013). *Coservation of wildlife populations: Demography, Genetic and Management*, second edition. Oxford., Wiley-Blackwell.
- Olano-Marin J, Plis K, Sönnichsen L, Borowik T, Niedziałkowska M, et al. (2014) Weak Population Structure in European Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and Evidence of Introgressive Hybridization with Siberian Roe Deer (*C. pygargus*) in Northeastern Poland. *PLOS ONE* 9(10): e109147.
- Oliveira E.J., Padua J.G., Zucchi M.I., Vencovsky R., Vieira M.L.C., (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294–307.
- Oslis, (2018). <http://oslis.gozdis.si/>
- Page D.M.R., Holmes C. E., (2009). *Molecular Evolution: A phylogenetic approach*. Oxford, Blackwell publishing.
- Pokorny B., (1997). Lovskogospodarski načrt za lovišče Oljka, Šmartno ob Paki, za obdobje 1997-2002. Lovska družina Oljka, Šmartno ob Paki, 28 str.
- Porras-Hurtado Liliana, Ruiz Yarimar, Santos Carla, Phillips Christopher, Carracedo Ángel, Lareu Maviky, (2013). An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics* 4.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945 – 959.
- Randi, E., Alves, P.C., Carranza, J., Milosevic-Zlatanovic, S., Sfougaris, A. & Mucci, N., (2004). Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics, *Molecular*

- Ecology, 13, 3071–3083. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018.1. www.iucnredlist.org (Datum dostopa: 10. 7. 2018).
- Raymond, M. and Rousset, F., (1995). GENEPOP (v 1.2): A population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Selkoe K.A., Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Rosenberg, N. A., (2003). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular ecology notes* 4: 137-138.
- Stubbe, M., (1999), The Atlas of European Mammals (Ed. by A.J. Mitchell-Jones, G. Amori, W. Bogdanowicz, B. Kryštufek, P.J.H. Reijnders, F. Spitzenberger, M. Stubbe, J.B.M. Thissen, V. Vohralík & J. Zima), London, Natural History Publisher, 400–401. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018.1. www.iucnredlist.org (Datum dostopa: 10. 7. 2018).
- Vähä, J. and Primmer, C. R., (2006). Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*, 15: 63-72.
- VWR, <https://www.vwr.com/>. (Datum dostopa: 11. .7. 2018).
- Wan Q.H., Wu H., Fujihara T., Fang S.G. (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25: 2165–2176.
- Wahlström, L. (1994). The Significance of Male-Male Aggression for Yearling Dispersal in Roe Deer (*Capreolus capreolus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 35(6), 409-412.
- Wahlström L.K., Liberg O., (1995). Patterns of dispersal and seasonal migration in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Zoology*. 235. 455-467.
- Wilson, D.E., Reeder D.M., (2005). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed.), Baltimore, John Hopkins University Press. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018.1. www.iucnredlist.org (Datum dostopa: 10. 7. 2018).
- Wright, Sewall, (1965). The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution*. 19 (3): 395–420.

PRILOGE

Priloga A: Velikosti mikrosatelitnih markerjev za 74 vzorcev.

ID	BM1818		BM757		CSSM66		NVHRT21		NVHRT73		NVHRT24		NVHRT48		NVHRT16		Roe1		ETH225		Roe8	
1	255	265	178	188	173	175	156	170	232	232	138	142	91	93	158	166	134	136	136	138	74	74
2	249	255	180	180	167	175	156	164	232	232	138	144	93	93	156	166	134	136	138	144	74	88
3	249	255	178	178	167	173	164	170	232	232	138	138	91	95	158	174	134	136	136	140	66	74
4	265	265	180	180	167	173	160	164	232	234	126	138	91	93	166	174	134	136	142	144	74	88
5	257	265	180	180	167	175	162	170	232	232	138	138	91	93	168	174	134	134	140	140	74	84
6	257	257	178	188	167	175	156	164	232	232	138	138	93	93	156	156	134	136	140	140	84	84
7	249	257	178	180	173	185	164	164	232	232	138	146	93	93	000	000	134	134	138	138	74	74
8	255	255	178	180	175	175	166	170	232	232	138	146	93	95	158	164	134	134	138	138	78	84
9	265	265	178	180	173	173	170	176	232	232	138	144	93	93	158	158	134	136	140	140	72	72
10	255	265	178	178	173	187	168	170	230	230	138	142	91	93	158	168	136	136	138	144	74	80
11	249	265	178	182	175	175	166	170	232	250	126	138	91	91	000	000	134	136	138	144	74	76
12	257	257	178	178	173	175	164	166	232	232	138	138	93	93	156	156	134	134	140	140	64	64
13	247	247	178	180	175	187	164	168	232	232	138	144	91	93	156	168	134	136	142	142	74	74
14	249	257	178	178	173	175	162	170	232	232	138	144	91	93	156	168	134	136	142	144	74	78
15	255	265	178	180	175	175	170	170	232	256	140	144	91	93	156	174	134	136	138	138	76	86
16	257	257	178	178	173	173	164	166	232	232	140	148	93	93	156	156	134	134	142	142	78	82
17	257	265	178	178	173	173	164	164	232	232	138	144	91	93	168	174	134	134	140	144	74	78
18	249	255	178	178	173	175	164	170	232	250	138	144	91	93	168	168	134	136	142	146	78	94
19	257	265	188	188	173	173	170	170	232	232	138	138	91	95	156	168	134	134	138	138	78	78
20	249	257	180	188	173	175	164	170	232	232	138	140	93	93	168	174	136	136	138	144	74	82
21	255	255	178	180	167	175	156	164	232	232	138	144	91	93	156	174	134	136	142	142	76	82
22	255	263	178	194	167	175	162	168	232	232	138	144	93	93	168	168	134	136	136	138	74	76
23	257	263	178	178	167	175	156	168	232	232	126	138	91	93	156	166	134	136	140	140	84	86
24	255	263	176	178	173	175	162	168	232	232	138	138	91	93	166	166	134	134	140	140	74	84
25	257	257	180	180	167	175	162	164	232	232	126	138	91	93	156	174	134	134	142	142	74	80
26	249	265	178	180	175	175	164	164	232	232	126	138	93	93	158	158	134	134	140	146	76	82
27	257	257	178	180	175	175	162	170	232	232	138	140	93	93	156	168	134	134	136	144	76	84
28	255	265	178	178	173	175	170	170	232	232	138	144	91	93	156	174	134	136	136	140	76	84
29	251	257	178	188	173	175	168	170	232	232	126	138	93	93	166	166	136	136	140	146	76	82
30	265	265	180	180	173	175	164	170	256	256	140	140	93	93	174	174	134	134	140	140	76	82
31	249	253	178	180	167	173	164	176	230	230	128	138	91	93	168	174	134	134	144	144	74	74
32	249	265	178	178	173	173	162	168	232	232	126	138	93	95	164	168	134	134	140	140	76	76
33	249	265	180	180	173	175	164	170	232	256	138	140	93	93	158	174	134	136	140	144	76	82
34	257	257	178	194	173	175	164	170	230	266	144	144	91	93	158	166	134	134	144	144	74	74
35	265	265	180	180	173	175	148	160	232	232	138	140	93	93	158	168	134	134	142	142	70	74
36	255	255	180	180	167	175	166	170	232	232	138	138	93	93	156	166	136	136	142	142	74	74
37	257	265	180	180	173	175	164	164	232	232	138	144	91	93	156	174	134	134	138	138	76	82
38	257	265	178	178	175	175	160	170	232	232	138	138	93	93	166	174	134	134	142	142	76	82
39	249	255	178	180	175	175	156	170	232	256	138	138	93	93	156	156	134	134	140	140	76	82
40	255	257	178	180	175	175	164	172	232	232	138	144	93	93	156	156	136	136	140	146	74	84
41	251	265	178	188	173	175	164	164	232	232	138	144	93	93	158	158	134	134	136	142	74	84
42	255	265	178	178	173	173	166	170	232	232	138	140	91	95	158	166	134	134	136	140	68	74
43	255	265	178	188	173	175	164	170	232	232	138	144	91	93	158	158	134	134	142	142	72	86
44	249	255	178	178	167	173	156	166	232	232	138	140	93	95	158	158	134	134	140	144	74	82

45	255	255	160	182	173	175	160	176	232	232	138	144	93	93	166	166	134	136	136	136	74	84
46	249	251	178	178	173	175	170	170	232	266	126	138	93	93	158	178	134	136	140	140	74	78
47	265	265	178	178	173	175	164	172	232	232	138	138	93	93	156	168	134	134	138	146	74	78
48	251	255	178	178	175	175	164	170	232	232	126	138	91	93	156	166	134	134	144	144	74	88
49	265	265	180	180	175	175	164	170	232	256	138	140	91	93	166	174	134	134	140	140	70	84
50	257	265	178	188	175	175	164	164	232	232	138	144	93	93	156	174	136	136	138	138	74	84
51	265	265	176	178	173	175	164	170	232	232	138	142	91	93	156	156	136	136	142	146	74	84
52	251	251	176	176	173	175	160	170	232	232	138	138	93	95	168	174	134	136	140	140	84	86
53	249	265	176	178	173	173	168	176	232	232	138	138	93	95	156	166	134	136	146	146	74	78
54	000	000	180	180	173	173	000	000	232	232	000	000	93	93	158	166	000	000	000	000	78	84
55	249	257	178	178	173	175	164	170	232	232	138	144	93	93	158	166	134	134	146	146	78	84
56	249	257	180	188	173	175	166	170	232	232	138	142	93	95	156	158	134	136	142	146	84	88
57	257	257	188	188	167	173	170	170	232	232	138	138	91	95	156	174	134	136	138	138	78	84
58	249	257	180	180	167	173	170	178	232	232	138	140	91	93	156	168	134	136	142	146	74	80
59	249	265	180	182	171	171	178	178	200	200	000	000	91	93	156	166	136	136	146	146	86	86
60	249	265	178	180	167	175	156	170	232	232	126	126	91	93	156	166	134	136	146	146	74	86
61	255	265	180	180	173	175	164	164	000	000	000	000	91	93	156	166	000	000	000	000	000	000
62	249	249	188	194	175	175	162	170	232	232	138	144	91	93	000	000	134	136	146	146	78	84
63	249	257	178	188	173	175	162	170	232	232	138	144	93	93	156	156	134	136	138	146	78	84
64	249	257	178	178	167	167	164	164	232	232	138	138	91	93	156	156	134	136	140	140	74	84
65	249	255	178	178	167	175	170	170	232	232	126	126	91	93	156	156	134	136	140	140	84	84
66	249	257	180	180	167	175	170	170	232	232	126	138	91	93	156	156	134	136	140	140	84	84
67	249	249	188	194	175	175	162	170	232	232	138	144	91	93	156	166	000	000	000	000	000	000
68	249	255	178	178	167	175	170	170	232	232	128	128	91	93	156	156	000	000	000	000	000	000
69	249	257	180	180	167	175	170	170	232	232	126	138	93	93	156	166	134	136	140	140	80	84
345	249	265	176	180	173	175	164	178	232	232	138	138	93	93	166	166	134	136	136	140	72	72
350	249	249	180	180	173	175	170	170	232	232	138	138	91	93	156	164	134	134	136	140	84	84
351	249	249	160	176	173	175	170	170	232	232	138	138	91	93	158	164	134	134	136	142	74	84
358	249	249	178	180	173	175	168	168	232	232	138	146	93	93	166	168	134	134	138	138	74	74
359	257	257	180	180	173	175	160	164	232	232	126	126	93	95	156	156	134	134	136	136	74	82

Priloga B: Zbirnik razporejenosti posameznih osebkov po skupinah (glej tudi Preglednico 10, kjer so podane vrednosti q).

Skupina S1 (n = 9)	Skupina S2 (n = 10)	Mešana skupina (n = 55)			
LME-1	LME-5	LME-2	LME-20	LME-38	LME-57
LME-10	LME-6	LME-3	LME-21	LME-40	LME-58
LME-18	LME-25	LME-4	LME-22	LME-41	LME-60
LME-24	LME-30	LME-7	LME-23	LME-43	LME-61
LME-32	LME-39	LME-8	LME-26	LME-44	LME-62
LME-42	LME-50	LME-9	LME-27	LME-46	LME-63
LME-45	LME-64	LME-11	LME-28	LME-47	LME-67
LME-53	LME-65	LME-12	LME-29	LME-48	LME-68
LME-59	LME-66	LME-13	LME-31	LME-49	LME-345
	LME-69	LME-14	LME-33	LME-51	LME-350
		LME-15	LME-34	LME-52	LME-351
		LME-16	LME-35	LME-54	LME-358
		LME-17	LME-36	LME-55	LME-359
		LME-19	LME-37	LME-56	