

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Iva Bazina

**Primjenjivost MHC lokusa kao biljega za otkrivanje hibridizacije
između vuka (*Canis lupus*) i psa (*Canis lupus familiaris*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Galov i neposrednim vodstvom dr. sc. Haidi Arbanasić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Zahvale

Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Galov i neposrednoj voditeljici dr. sc. Haidi Arbanasić na pruženoj prilici, izdvojenom vremenu, strpljenju i susretljivost koju su pokazale pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvalna sam na stručnim savjetima i pomoći pri razumijevanju rezultata i izradi diplomskog rada. Hvala im što su ovo iskustvo učinile vrlo ugodnim.

Gordani Žakman hvala na pomoći u tehničkom dijelu izrade rada, strpljenju i svim čajevima koje mi je skuhalo. Hvala Idi Svetličić na društvu i pomoći tijekom dijela tehničke izvedbe istraživanja.

Hvala prof. dr. sc. Đuri Huberu i prof. dr. sc. Josipu Kusaku s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na ustupljenim uzorcima.

Zahvaljujem profesorima, asistentima i djelatnicima Prirodoslovno-Matematičkog fakulteta zbog kojih će iskustvo studiranja biti lijepa uspomena.

Veliko hvala svim mojim prijateljima! Neki su tu od početka obrazovanja, neki su se pridružili kasnije, ali svi su bili ogromna podrška i uvijek su vjerovali u mene. Zbog njih je sve bilo lakše. Hvala na pomoći, podršci, savjetima, ali još više na nezaboravnim druženjima i uspomenama. Posebno hvala na strpljenju onima koji su toliko čuli o mom diplomskom da bi ga i sami mogli obraniti.

Hvala BIUS-ovcima na svim terenima, druženjima, savjetima, pomoći i povjerenju. BIUS je uvelike uljepšao i upotpunio iskustvo studiranja.

Na kraju, najveće hvala mojim roditeljima i sestrama, koji su se živcirali, tugovali i veselili skupa sa mnom od prvog dana. Hvala na godinama strpljenja, razumijevanja i ljubavi. Hvala im što su trpili sve stadije panike i promjene raspoloženja tijekom učenja i slavili sve uspjehe kao da su njihovi. Najviše im hvala što su vjerovali u mene i kad ja nisam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Primjenjivost MHC lokusa kao biljega za otkrivanje hibridizacije između vuka (*Canis lupus*) i psa (*Canis lupus familiaris*)

Iva Bazina
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Vukovi su česta pojava u blizini ljudskih naselja, koja naseljavaju i psi. Sve vrste roda *Canis* mogu stvarati plodno potomstvo, što znači da i vukovi i psi mogu stvarati hibride. Hibridizacija između divljih i udomaćenih vrsta, iako može imati i pozitivne posljedice, uglavnom se percipira kao prijetnja bioraznolikosti, najviše zbog introgresije alela domesticiranih vrsta, koji su nastali umjetnom selekcijom, u divlje populacije. Hibridi se ne mogu pouzdano identificirati samo po morfološkim obilježjima nego se koriste i molekularne metode. Uz uobičajenu genetičku analizu mitohondrijske DNA, Y kromosoma i mikrosatelita, 2012. godine prvi put je uspješno upotrijebljena analiza MHC lokusa kao metoda otkrivanja hibridizacije. U svrhu provjere primjenjivosti ove metode na hibride između vukova i pasa analizirani su aleli i haplotipovi DRB, DQA i DQB lokusa glavnog sustava tkivne podudarnosti 13 potencijalnih hibrida od kojih su tri bila ranije potvrđena kao hibridi nastali povratnim križanjem s vukom, i uspoređeni s podacima dobivenim za vuka i psa iz literature. U dva uzorka MHC lokusi nisu se pokazali informativnima za otkrivanje hibridizacije, dok su za jedan uzorak bili informativni. MHC lokusi mogu biti dobri biljezi za otkrivanje hibridizacije vuka i psa jedino u slučaju kad potencijalni hibridi nose privatne alele za pojedinu vrstu.

(37 stranica, 8 slika, 6 tablica, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: MHC, vuk, pas, hibrid, lokus, alel, haplotip

Voditelj: Dr. sc. Ana Galov, izv. prof.
Neposredni voditelj: Dr. sc. Haidi Arbanasić
Ocjenitelji: Dr.sc. Ana Galov, izv. prof.
Dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija, izv. prof.
Dr. sc. Božena Mitić, prof.

Rad prihvaćen: 14. veljače 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Applicability of MHC loci as markers for detecting hybridization between wolf (*Canis lupus*) and dog (*Canis lupus familiaris*)

Iva Bazina
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Wolves can often be seen near human settlements, where dogs live. All *Canis* species are closely related and can produce fertile progeny. Hybridization between wild and domesticated species can have a positive outcome, but it is usually perceived as threat to biodiversity, mostly because of the possibility of introgression of artificially selected domestic alleles into wild populations. Hybrids can't be identified solely based on morphological features, so using molecular methods is necessary. In 2012, along with the usual analysis of the mitochondrial DNA, Y chromosome and microsatellites, MHC loci analysis was used to detect hybrids for the first time. In order to find out if this method is applicable in detecting wolf-dog hybrids, DRB, DQA, DQB alleles and haplotypes of 13 suspected hybrids, three of which were earlier confirmed as back – crosses with wolves, were analysed and compared to available data from existing literature. MHC loci were informative in detecting hybridization for one of those samples, but weren't for other two. MHC loci are effective markers only when potential hybrids are carrying private alleles for each species.

(37 pages, 8 figures, 6 tables, 42 references, the original language: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: MHC, wolf, dog, hybrid, locus, allele, haplotype

Supervisor: Dr. sc. Ana Galov, Assoc. Prof.

Assistant supervisor: Dr. sc. Haidi Arbanasić

Reviewers: Dr.sc. Ana Galov, Assoc. Prof.

Dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija, Assoc. Prof

Dr. sc. Božena Mitić, Prof.

Thesis accepted: February 14, 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti	1
1.2. Vuk	4
1.3. Pas	8
1.4. Hibridizacija između vuka i psa	10
1.4.1 Identifikacija hibrida	12
1.5. Cilj istraživanja.....	14
2. MATERIJALI I METODE.....	15
2.1. Uzorci tkiva	15
2.2. Izolacija DNA.....	18
2.2.1. Wizard Genomic DNA Purification Kit.....	18
2.2.2. QIAamp DNA Micro Kit.....	19
2.3. Lančana reakcija polimerazom.....	20
2.4. Elektroforeza	21
2.5. Sekvenciranje	21
2.6. Računalna obrada podataka.....	21
2.6.1. BioEdit.....	21
2.6.2. SeqScape	22
3. REZULTATI.....	23
3.1. ALELI	25
3.2. Haplotipovi.....	27
4. RASPRAVA.....	29
5. ZAKLJUČCI	33
6. LITERATURA.....	34
7. ŽIVOTOPIS	38

POPIS KRATICA I OZNAKA

DLA – glavni sustav tkivne podudarnosti kod pasa (eng. *dog leukocyte antigens*)

HLA - glavni sustav tkivne podudarnosti u čovjeka (eng. *human leukocyte antigens*)

IUCN - međunarodni savez za očuvanje prirode (eng. *International Union for Conservation of Nature*)

LC- stupanj najmanje zabrinutosti prema IUCN-u (eng. *least concern*)

MHC - glavni sustav tkivne podudarnosti (eng. *major histocompatibility complex*)

mtDNA – mitohondrijska DNA

PBR – mjesto vezanja peptida (eng. *peptide binding region*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

PKV – hibrid nastao povratnim križanjem s vukom

PKD – hibrid nastao povratnim križanjem sa psom

rpm – broj okretaja u minuti (eng. *revolutions per minute*)

TBE – tris - borat - EDTA

UV – ultraljubičasta (eng. *ultraviolet*)

1. UVOD

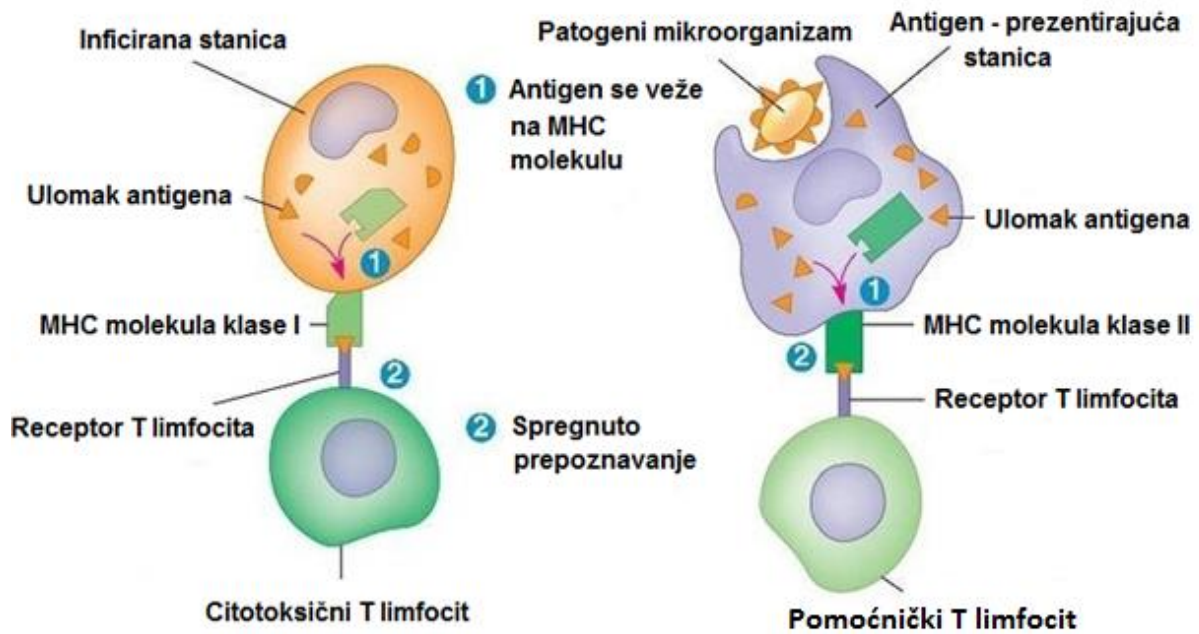
1.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti

Glavni sustav tkivne podudarnosti, drugog naziva MHC (od eng. *major histocompatibility complex*), kodira membranske molekule tkivne podudarnosti. Te molekule su membranski biljezi čija je primarna funkcija predočavanje stranih antigena limfocitima T (Andreis i sur., 2010). MHC svoje ime zahvaljuje tome što je cijeli koncept proizašao iz istraživanja nekompatibilnosti transplantiranih organa (Kelley i sur., 2005).

Strani proteinski antigeni se prerađuju unutar stanice i nastaju peptidni ulomci, koji sjedaju u žljebove izvanstanične domene novosintetizirane molekule MHC prije negoli se ona izloži na površini stanice. Limfocit T prepoznaje kompleks antigena i molekule MHC tako da jednim dijelom receptora prepoznaje peptidni antigen, a drugim molekulu. To je takozvano spregnuto prepoznavanje (Slika 1) (Andreis i sur., 2010).

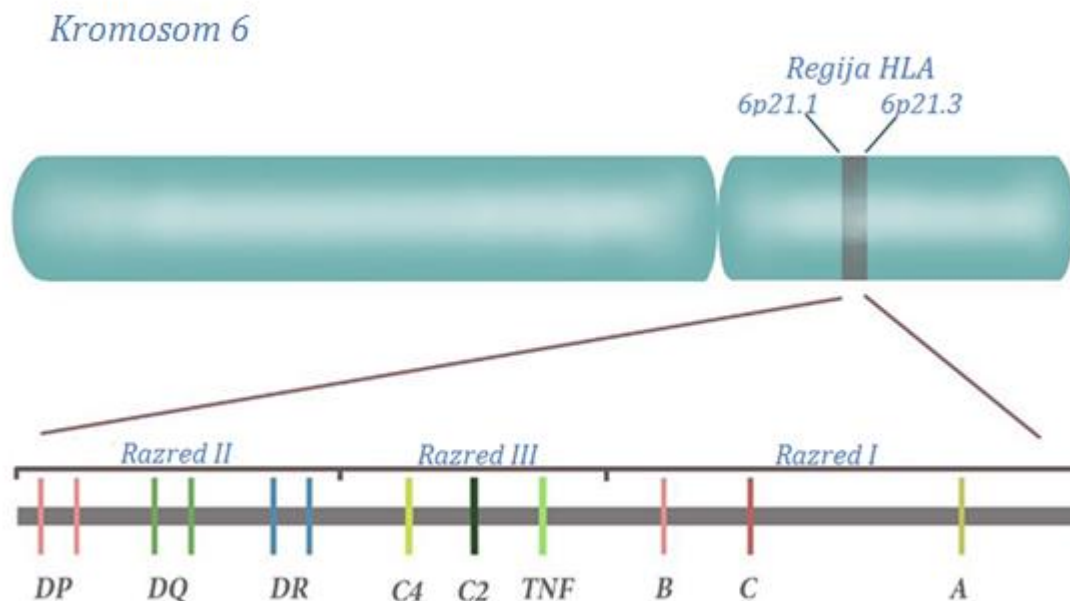
Geni i molekule MHC dijele se u tri skupine. Skupine I i II imaju ulogu u predočavanju antigena, a skupina III gena kodira molekule koje nemaju središnju imunoregulacijsku ulogu, ali sudjeluju u aktivaciji komplementa i upalnim procesima (Andreis i sur., 2010; Wagner, 2003).

Molekule skupina I i II nejednako su raspodijeljene jer predočavaju antigene različitim T limfocitima (Slika 1). Molekule MHC I nalaze se na površini svih tjelesnih stanica s jezgrom i predočuju antigene unutarstaničnih patogena (uglavnom virusne) citotoksičnim limfocitima T (CD8⁺), koji potom ubijaju zaraženu stanicu. Pomagački limfociti (CD4⁺) komuniciraju samo sa stanicama limfatičkih tkiva pa su molekule MHC skupine II izražene samo na profesionalnim predočnim stanicama, kao što su limfociti B, makrofagi, dendritičke stanice, aktivirani limfociti T i neke endotelne stanice (Andreis i sur., 2010).



Slika 1. Razlike u djelovanju molekula MHC klase I i klase II (preuzeto i prilagođeno s <https://www.quora.com/How-do-our-immune-cells-recognize-self-and-nonsself>).

U čovjeka se MHC regija zove HLA (od eng. *human leukocyte antigens*) regija (Slika 2), a kod vrsta koje pripadaju porodici pasa (*Canidae*), analogno tome, DLA regija (od eng. *dog leukocyte antigens*). HLA se nalazi na 6. kromosomu, a DLA na 12. Nekoliko gena unutar DLA regije pokazuje značajnu sličnost u sekvencama s odgovarajućim genima kod čovjeka. MHC regija se sastoji od čvrsto vezane skupine gena (Andreis i sur., 2010; Wagner, 2003). Geni svih klasa MHC lokusa toliko su blizu (Slika 2) da se najčešće nasljeđuju zajedno. Kombinacija alelnih oblika gena na jednom kromosomu naziva se haplotip. Pojedina jedinka nasljeđuje jedan haplotip od oca, a jedan od majke. Izražavaju se kodominantno (Owen i sur., 2009). MHC sustav pokazuje i poligeniju (Slika 2), što znači da je kodiran velikim brojem gena s istom funkcijom, koji se malo strukturno razlikuju (Andreis i sur., 2010; Owen i sur., 2009).



Slika 2. Smještaj HLA regije na 6. kromosomu. Iz prikaza je vidljiv blizak smještaj gena svih razreda MHC sustava i poligenija (preuzeto i prilagođeno iz Ayna i Kočyiđi, 2016).

Najvažnija karakteristika glavnog sustava tkivne podudarnosti je izraziti polimorfizam. On nastaje i održava se, primarno, balansirajućom selekcijom, ali i brojnim genskim mehanizmima, kao što su genska konverzija, genska rekombinacija, točkaste mutacije i genetski drift (Andreis i sur., 2010; Arbanasić i sur., 2013).

Balansirajuća selekcija je oblik pozitivne selekcije, koja rezultira, ne samo održavanjem velikog broja alela u populaciji, nego i opstajanjem raznolikosti alela kroz dugi period. Dva glavna načina kojima se pokušava objasniti djelovanje balansirajuće selekcije su heterozigotna prednost i selekcija ovisna o frekvenciji. Heterozigotna prednost podrazumijeva da je svaki heterozigot rezistentniji od bilo kojeg homozigota. Negativna selekcija ovisna o frekvenciji, također opisivana i kao prednost rijetkog alela, favorizira alele koji su rijetki u populaciji, vjerojatno jer nose veću rezistentnost na nove patogene. Zbog središnje uloge MHC u imunološkom sustavu kralješnjaka, generalna je pretpostavka da glavni selekcijski pritisak koji utječe na raznolikost MHC gena proizlazi iz parazita i patogena koji koevoluiraju antagonistički s domaćinom, kako bi izbjegli imunološko prepoznavanje (Sommer, 2005).

MHC varijabilnost utječe na mnoge biološke osobine, uključujući imunološko prepoznavanje, podložnost infektivnim i autoimunim bolestima, jedinstveni miris pojedinca, odabir partnera za parenje, prepoznavanje srodnika, suradnju i ishod trudnoće. Zbog svega navedenog, MHC

je jedan od najboljih kandidata za istraživanje mehanizama i značajnosti molekularne prilagodbe u kralješnjaka. Također, odražava evolucijski bitne i adaptivne procese unutar i između populacija (Sommer, 2005).

Istraživanja MHC raznolikosti unutar porodice pasa koncentrirana su na tri lokusa MHC klase II: DRB, DQA i DQB. Preciznije, na njihov egzon 2, koji kodira mjesto vezanja patogena na molekuli (PBR, engl. *peptide binding region*), najpolimorfni dio molekule (Arbanasić i sur., 2013). U ovom diplomskom radu također se analiziraju ta tri lokusa.

1.2. Vuk

Vuk ili sivi vuk (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) (Slika 3) sisavac je koji pripada porodici pasa (Canidae) iz reda zvijeri (Carnivora). Osim sivoga vuka, poznate su još dvije slobodnoživuće vrste vukova - crveni vuk (*C. rufus*) i abesinski (etiopski) vuk (*C. simensis*) (<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/velike-zvijeri/sivi-vuk>).



Slika 3. Vuk (*Canis lupus*) (preuzeto s www.pixabay.com/en/wolf-zoo-canis-lupus-canine-mammal-725388/).

Vuk je najveći pripadnik porodice pasa, u Hrvatskoj mu je prosječna masa 31 kg. Može biti bijele, svjetlo smeđe, crvenkaste, sive i crne boje. U Hrvatskoj su pronađeni sivi primjerci s nešto tamnijim leđima i repom, a svjetlijim trbuhom i nogama. Na prednjoj strani podlaktice najčešće imaju tamnu prugu. Vukovi imaju uzak grudni koš, laktove uvučene prema unutra i šape okrenute prema van, noge su im duže od drugih pripadnika porodice pasa i imaju četiri prsta na stražnjim i pet na prednjim nogama. Sve navedeno je prilagodba na brzo kretanje na velike udaljenosti (<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/velike-zvijeri/sivi-vuk>).

Glava vuka prilagođena je na prehranu mesom i kostima životinja koje lovi. Izdužena je prema naprijed, duga prosječno 25 cm i široka 14 cm. Čeljust mu je masivna, ima snažne žvačne mišiće i 42 zuba specijalizirana za hvatanje i ubijanje plijena, rezanje mesa i tetiva te lomljenje kostiju. Volumen mozga mu je od 150 do 170 cm³ (30 cm³ više nego u većine pasa.). Sva osjetila su mu odlično razvijena, a prednjače njuh i sluh (<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/velike-zvijeri/sivi-vuk>).

Vukovi su predatori koji love plijen veći od sebe. To je moguće jer žive u čoporu, putuju, love, hrane se i odmaraju zajedno. Čopor ima složen hijerarhijski ustroj. Sastoji se od jednog reproduktivnog para i njihovih potomaka. Roditeljski par ima dominantan položaj, a ostali pripadnici čopora međusobno grade odnose podčinjenosti i nadčinjenosti, po muškoj i po ženskoj liniji. Jaka dominacija onemogućuje parenje podčinjenih parova međusobno ili s jednim od dominantnih vukova, što pridonosi samoregulaciji veličine populacije i sprječava parenje u srodstvu. Hijerarhija se vidi i pri hranjenju, kad nadčinjene jedinice jedu prve. Zbog nemogućnosti parenja i nedovoljno hrane, u drugoj ili trećoj godini života, mladi vukovi odlaze iz roditeljskog čopora u nepoznate predjele. To se naziva disperzija. Ako uspiju naći prostor bez stranih vukova s dovoljno plijena i ako je u isti prostor došao najmanje jedan vuk suprotnog spola, mogu stvoriti novi čopor. Izrazito su teritorijalni, svoj prostor obilježavaju urinom, izmetom, grebanjem po tlu i zavijanjem, a vukove, čak i pse, koji nepozvani uđu u njihov teritorij ubijaju. To je još jedan od mehanizama samoregulacije veličine populacije. (<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/velike-zvijeri/sivi-vuk>).

Vuk je jedan od najvažnijih europskih predatora (Milenkovic i sur., 2006) i nema prirodnih neprijatelja, osim čovjeka. Pokazalo se, međutim, da, ako ih ljudi toleriraju ili je smrtnost izazvana čovjekom manja od godišnjeg prirasta, vukovi mogu živjeti i u blizini ljudi. Tada se

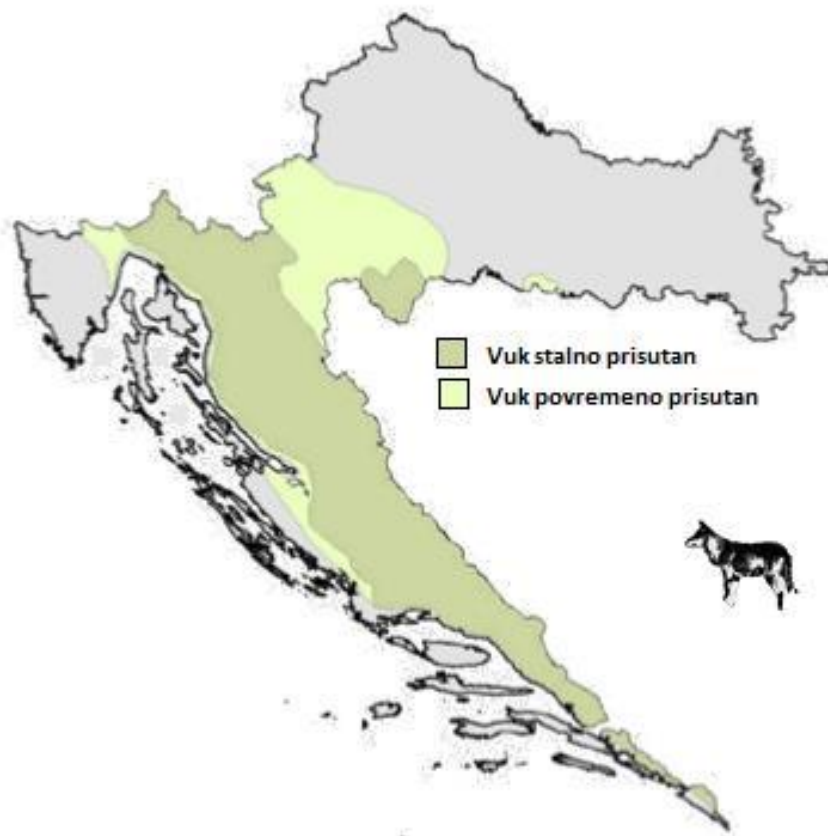
moгу skoro u potpunosti prebaciti na prehranu domaćim životinjama (ovce, koze, manje krupna stoka i psi). Vuk je lovac na velike sisavce, što znači da su mu glavni plijen veliki dvopapkari (parnoprstashi), a rjeđe kopitari (neparnoprstaši). Vuk će, ako u danom trenutku ona predstavlja lakši ulov, pojesti i bilo koju drugu životinju. Kada imaju izbor, lovit će onu vrstu koje ima više i pri tome će birati životinje koje su oslabljene zbog starosti, bolesti, izgladnjelosti ili su mladunčad. Vukovi time pozitivno utječu na zdravlje populacije plijena, a i doprinose stabilnosti cijelog ekosustava (<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/velike-zvijeri/sivi-vuk>).

Vuk je vrlo prilagodljiv na različite ekosustave, od tundre do pustinje (Milenkovic i sur., 2006) i u jednom trenutku je bio najraširenija vrsta sisavca, s rasprostranjenošću po većini sjeverne polutke. Originalna raširenost po cijelom svijetu smanjena je tijekom prošlih stoljeća za otprilike trećinu zahvaljujući progonu zbog napada na domaće životinje i straha od napada na ljude, te fragmentaciji staništa i nedostatku prirodnog plijena. Vuk je sada izumrla vrsta u velikom dijelu zapadne i središnje Europe, Meksiku i velikom dijelu SAD-a (<http://www.iucnredlist.org/details/summary/3746/04>). Rasprostranjen je, još uvijek, u sjevernom i zapadnom dijelu Sjeverne Amerike, južno do Meksika i u Euroaziji, izuzevši zone tropskih prašuma i brojne otoke, kao što su Velika Britanija ili Grenland (Dinets, 2015). Iako se vuk i dalje suočava s nekim prijetnjama, relativno je široko rasprostranjen, a stabilan trend njegove populacije znači da vrsta na globalnoj razini ne zadovoljava kriterije za kategorije ugroženosti. Prema IUCN-u procijenjen je kao LC (*least concern*), što predstavlja najmanji stupanj zabrinutosti. Međutim, na regionalnoj razini neke populacije su ozbiljno ugrožene (<http://www.iucnredlist.org/details/summary/3746/04>)

Europska populacija vukova velika je metapopulacija podijeljena na 9 populacija. Dinarsko-balkanska populacija, s otprilike 5000 jedinki, jedna je od najvećih. Hrvatski vuk pripada toj populaciji i strogo je zaštićena vrsta sukladno Zakonu o zaštiti prirode (NN 80/13) i Pravilniku o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/13, 73/16) (<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/velike-zvijeri/sivi-vuk>, <http://www.iucnredlist.org/details/summary/3746/04>).

Krajem 19. stoljeća vuk je bio prisutan na cijelom hrvatskom teritoriju, ali programi lova i istrjebljenja kroz 20. stoljeće eliminirali su ga iz većine njegovog originalnog opsega i ograničili na brdovita područja Like i Gorkog kotara (10 000 km²). Rezultat je bilo smanjenje populacije na 30-50 jedinki u kasnim 1980-ima. Nakon uvođenja konzervacijskih mjera na

početku devedesetih, populacija hrvatskih vukova počela je rasti i dosegla otprilike 200 jedinki do 2010., šireći se na područja Dalmacije, Banovine i Učke. Prema podacima o rasprostranjenosti vuka u 2013. godini, u Hrvatskoj je vuk prisutan na 18.213 km², a povremeno se pojavljuje na još 6.072 km². Prostire se na području 9 županija: Sisačko-moslavačka, Karlovačka, Ličko-senjska, Primorsko-goranska, Istarska, Zadarska, Šibensko-kninska, Splitsko-dalmatinska i Dubrovačko-neretvanska (Slika 4) (<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/velike-zvijeri/sivi-vuk>). Pod zakonskom su zaštitom od 1995., ali stopa mortaliteta uzrokovana ljudskim djelovanjem još uvijek je visoka (Kusak i sur., 2018).



Slika 4. Rasprostranjenost vuka u Hrvatskoj iz 2011. godine (preuzeto s www.savjetodavna.hr/savjeti/14/487/zastita-stoke-od-zvijeri/).

1.3. Pas

Pas (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758) pripada porodici Canidae. Različite su teorije postanka ove životinje. Većina autora (Seddon i Ellegren, 2002; Lescureux i Linnell, 2014; Skoglund i sur., 2015; Serpell, 2017) slaže se da je pas nastao iz jedne ili nekoliko populacija vuka. To podržavaju podaci dobiveni molekularno-genetičkim metodama koji uključuju zajedničke haplotipove mtDNA te zajedničke alele mikrosatelitskih lokusa (Wayne i Ostrander, 1999). Međutim, neka obilježja pseće anatomije, posebno struktura mozga, više nalikuju na zlatnog čaglja ili kojota. Najprimitivnije pseće pasmine i najstarije divlje populacije izgledaju slično, ali ne nalikuju vuku, nego imaju tipičnu pseću anatomiju i uglavnom crvenkastu ili žućkastu obojenost. Ove i druge sumnje objašnjene su drugom teorijom, koja predlaže da je pseći predak zapravo neka izumrla vrsta iz porodica Canidae koja je bila u vrlo bliskom rodu s vukom (Dinets, 2015; Skoglund i sur., 2015).

Pas je nastao domestikacijom vuka i prva je vrsta životinje koja je domesticirana. Točan broj procesa domestikacije kroz povijest, vrijeme odvijanja i točne lokacije još uvijek su predmet rasprave. Najstariji fosilni ostaci psa datiraju oko 30 000 godina u prošlost (Lescureux i Linnell, 2014; Serpell, 2017; Skoglund i sur., 2015), ali budući da su se u ranijoj fazi domestikacije psi manje razlikovali od ostalih kanida, vode se rasprave radi li se zapravo o psima (Lescureux i Linnell, 2014). Neosporivi pseći ostaci pronađeni su na nalazištima starim 14 000 (Dinets, 2015; Savolainen i sur., 2002) i 15 000 (Lescureux i Linnell, 2014) godina u Europi i 12 000 u Aziji (Lescureux i Linnell, 2014; Savolainen i sur., 2002). Procjenjuje se da su se odvajanje vukova i pasa i domestikacija dogodili prije 11 000 - 16 000 godina (Kusak i sur., 2018; Skoglund i sur., 2015). Porijeklo psa smješta se u Istočnu Aziju, Bliski istok i Europu (Dinets, 2015; Serpell, 2017).

Domestikacija je biološki proces koji vodi do jedinstvenog odnosa između čovjeka i životinja koji jako variraju ovisno o životinji. Domestikacija se razlikuje od pripitomljavanja. Pripitomljavanje je privikavanje pojedine životinje na ljude dok domestikacija podrazumijeva mijenjanje genetskih (i morfoloških) obilježja životinja i te promjene su nasljedne (Lescureux i Linnell, 2014).

Domestikacija vuka bila je evolucijski proces koji je dao prednost svim nasljednim predispozicijama za pitomost u maloj populaciji vukova u blizini ljudskih populacija. Proces je započeo dolaskom vukova u blizinu ljudi, došlo je to tolerancije, smanjenja agresija i

straha u blizini ljudi. Prednosti koje povećavaju sposobnost preživljavanja počele su se nagomilavati kod vukova koji se uspješno razmnožavaju u ili blizu ljudskog okoliša, uz vjerojatni doprinos ljudske djelatnosti. Došlo je do nesvjesne rane selekcije korisnih osobina koja vodi početnoj pojavi primitivnih pasa. Nakon nesvjesnog, javlja se i svjesni oblik umjetne selekcije, prvo na temelju korisnih osobina, a kasnije i na temelju izgleda (Serpell, 2017). Umjetnom selekcijom stvoreno je više od 350 pasmina (Slika 5). To je sa sobom donijelo i mnoge bolesti specifične za pojedinu pasminu (Lescureux i Linnell, 2014).



Slika 5. Prikaz malog dijela postojećih pasmina pasa, koji pokazuje veliku morfološku raznolikost ove vrste. (preuzeto s https://www.sporcle.com/games/Rackie/where-s_woof).

Psi su postali korisni na razne načine, za hranu i krzno, kao nosači tereta čuvari, borci, pomoć ljudima s posebnim potrebama, čovjekov najbolji prijatelj i model za razumijevanje ljudskih bolesti (Serpell, 2017). Prateći ljude, raširili su se po svim kontinentima, osim Antarktike. Postali su jedna od najčešćih domaćih vrsta s procijenjenom rastućom populacijom od 900 milijuna jedinki (Lescureux i Linnell, 2014). Najpopularniji su kućni ljubimac nakon mačaka.

Usporedno s domestikacijom počinju se mijenjati morfološke karakteristike. Do promjena u početku vjerojatno nije došlo zbog umjetne selekcije nego su one posljedica fizioloških i hormonalnih promjena koje su pratile prelazak na domesticirani način života (Serpell, 2017).

Razlika između psa i vuka najizraženija je među svim parovima domesticiranih i divljih vrsta. Pas ima 30% manji mozak, manju glavu i tijelo, kraću i širu njušku i posljedično drukčije zubalo, zaobljenu donju čeljust i primjetne razlike u denticiji. Pas je prilagođen na omnivorni način prehrane svojim probavnim sustavom i, kritično za preživljavanje među ljudima, ima smanjene lovačke nagone, što omogućuje miran suživot psa i ostalih domaćih životinja. Razlikuju im se hod i otisak. Pas rep često drži uspravno, dok je kod vuka uglavnom spušten. Razlikuje im se i boja dlake. Psi dosežu spolnu zrelost brže od vukova i laju čitav život, što kod odraslih vukova nije često svojstvo (Serpell, 2017). Fenotipska varijabilnost psa (Slika 5) puno je veća nego u vuka, a i najveća među svim domesticiranim životinjama (Dinets, 2015; Serpell, 2017). Postoje i brojne druge anatomske, fiziološke i bihevioralne razlike.

1.4. Hibridizacija između vuka i psa

Prema nekim autorima, hibridizacija se definira kao križanje jedinki iz, genski, jasno različitih populacija, bez obzira na taksonomski status. Najčešće se odnosi na križanje heterospecifičnih vrsta, ali koristila se i za opis križanja jedinki različitih podvrsta, a čak i za populacije koje nisu taksonomski različite, ali se genski značajno razlikuju (Rhymer i Simberloff, 1996).

Hibridizacija među vrstama je uobičajena kod biljaka, ali često se na nju gleda kao neprirodnu i neuobičajenu kod životinja. Međutim, postoje dokazi da mnoge životinjske vrste mogu stvarati hibride. Procjene govore da barem 10% od svih životinjskih vrsta i 6% europskih sisavaca prolaze određeni stupanj hibridizacije (Hindrikson i sur., 2012; Mallet, 2005). Najčešće su u pitanju evolucijski mlade vrste (Mallet, 2005). Prirodna hibridizacija stvara gensku raznolikost i može imati važnu ulogu u specijaciji, ali antropogena hibridizacija može kompromitirati genski integritet vrste (Lorenzini i sur., 2014).

Stalni rast ljudske populacije diljem svijeta rezultirao je povećanjem teritorija kojeg okupira čovjek, smanjenjem pogodnog staništa za divlje životinje i približavanjem divljih životinja ljudskom staništu. Ti trendovi, u kombinaciji s povećanim brojem udomaćenih životinja koje dolaze uz ljude, znače da se povećao i potencijal za hibridizaciju (Hindrikson i sur., 2012). Neke ljudske aktivnosti koje dodatno pridonose hibridizaciji su modifikacija staništa, fragmentacija, unos egzotičnih vrsta (Rhymer i Simberloff, 1996). Ishodi hibridizacije su

različiti, ovisno o opsegu genske raznolikosti i porijeklu roditeljskih populacija (Fabbri i sur., 2014).

Hibridizaciju često prati introgresija. To je protok gena između populacija čije jedinke hibridiziraju. Postiže se kada se hibridi povratno križaju s jednom ili obje roditeljske populacije. Nakon prve generacije hibrida, trenutak u kojem jedinka prestaje biti hibrid je nejasan, proizvoljno se određuje (u ovom tekstu hibrid se odnosi i na prvu generaciju i na jedinke nastale povratnim križanjem). Introgresija se ne mora nužno dogoditi. Izostaje, na primjer, kad hibridno križanje rezultira sterilnim potomcima. (Rhymer i Simberloff, 1996).

Hibridizacija između divljih vrsta i njihovih domesticiranih oblika percipira se kao prijetnja bioraznolikosti. Ovakvo križanje može dovesti do introgresije domesticiranih alela, oblikovanih umjetnom selekcijom, u divlje populacije. To ima potencijalno negativne posljedice za konzervaciju, kao što su genska homogenizacija, remećenje lokalne prilagodbe ili, u krajnjem slučaju, izumiranje (Pacheco i sur., 2017). Postoje, međutim, i pozitivni učinci introgresije. Zone miješanja mogle bi generirati nove genske poretke koji su filtrirani prirodnom selekcijom, što bi posljedično povećalo fitnes miješanih populacija. Protok gena mogao bi pomoći u spašavanju genski osiromašenih i izoliranih populacija nastalih parenjem u srodstvu (Fabbri i sur., 2014).

Divlje vrste kanida mogu se pariti međusobno i sa psima (Kusak i sur., 2018). Bliska veza vuka i psa, koja je posljedica relativno nedavnog odvajanja vrsta, ukazuje na to da nije došlo do reproduktivne izolacije između dviju vrsta i one se mogu međusobno križati (Vilà i sur., 2003). Šanse za hibridizaciju vuka i psa smatraju se većima u području gdje vukovi žive bliže naseljima s velikom gustoćom pasa, u situacijama kada se vrši progon vukova ili tijekom ekspanzijske faze vučje populacije (Kusak i sur., 2018). Još Aristotel i Plinije zabilježili su namjernu hibridizaciju. Stoljećima su ljudi namjerno križali vukove i pse da bi poboljšali pasmine pasa. U 17. i 18. stoljeću zabilježena je hibridizacija vukova s indijskim, eskimskim, mađarskim i drugim psima. Danas postoji nekoliko pasmina koje su nastale hibridizacijom. Primjer su čehoslovački vučjak (Slika 6), lupo italiano i kunming. Takvi psi su često pod posebnom legislativom ili čak zabranjeni u nekim zemljama. Motivacija za zabrane je sigurnost, ne strah od povratnog križanja s vukovima (Lescureux i Linnell, 2014).



Slika 6. Čehoslovački vučjak je pasmina nastala križanjem vuka i psa, što se da naslutiti iz morfologije (preuzeto s <http://www.101dogbreeds.com/czechoslovakian-wolfdog-czechoslovakian-vcak.asp>).

Hibridizacija u divljini smatrala se globalno rijetkom pojavom (Dinets, 2015), ali danas to više nije slučaj. Jedno od prvih opsežnih istraživanja hibridizacije između vuka i psa nije pronašlo široko rasprostranjenu hibridizaciju u populacijama europskih vukova, a spolna asimetrija (pretežno križanje ženke vuka i mužjaka psa), fiziološke i bihevioralne razlike između vuka i psa prepoznate su kao razlog za nisku pojavnost hibrida. Napredak u istraživačkim tehnikama donio je sve više dokaza da hibridizacija između vuka i postoji u Bugarskoj, Srbiji, Latviji, Estoniji i, posebno, u Italiji, ali i u Hrvatskoj (Kusak i sur., 2018).

1.4.1 Identifikacija hibrida

Fenotipske anomalije (morfometrijske razlike i morfološke devijacije) koje se koriste za razlikovanje vukova od potencijalnih hibrida su: nedostatak crnih pruga na prednjim nogama u kombinaciji sa barem još jednim atipičnim obilježjem, povezani stražnji krajevi trećeg i četvrtog prsta na šapama u kombinaciji sa barem još jednim atipičnim obilježjem, plosnato čelo, odnosno gotovo nedostatak stepenice između lubanje i njuške, kratka ili duguljasta glava, dugačak i uzak nos, asimetrična duljina gornje i donje čeljusti, presfenoidna kost na bazi lubanje nema krilca, jednostavna je i šiljata kao u psa, njuška blago konkavna,

odnosno poput sedla, premala ili prevelika udaljenost između lijevih i desnih gornjih i/ili lijevih i desnih donjih očnjaka, duge uši, male šape, mala tjelesna masa prisutnost petog prsta/zakržljalog palca, pseći oblik tijela (kombinacija kratkih nogu sa zaobljenim bačvastim tijelom), i atipično obojenje krzna, uključujući crne, žute, pjegave ili u potpunosti bijelo krzno i šape (albinizam) (Kusak i sur., 2018). Naglasak je na „potencijalnih” jer je morfološka identifikacija hibrida težak posao. Primjerice, polimorfizam predaka ili mutacije na nekoliko gena za boju dlake mogu dati izgled hibrida (Mallet, 2005). Životinje morfološki okarakterizirane kao mogući hibridi se podvrgavaju daljnjim genetskim testovima kako bi se to potvrdilo (Rhymer i Simberloff, 1996).

Uobičajene molekularne metode otkrivanja hibridizacije su kombinacija genetičke analize mitohondrijske DNA, Y kromosoma i mikrosatelita. MtDNA nasljeđuje se po majčinskoj liniji i analiza njezinih haplotipova koristi se u otkrivanju majčinske linije potomaka obaju spolova, dok su haplotipovi vezani za Y kromosom korisni u detekciji očeve linije potomstva muških hibrida. Mikrosateliti se nasljeđuju od oba roditelja pa mogu pogodniji za otkrivanje hibridizacije, ali njihova analiza je prilično složen proces, zahtjeva dodatne korake (Alasaad i sur., 2012). Uz to, srodne vrste često imaju jednake MHC alele (pojava nazvana trans-specijski polimorfizam), što onemogućava njihovu upotrebu za detekciju hibrida. Usprkos tome, Alasaad i sur. (2012) su koristili MHC lokus kao biljeg za hibridizaciju vrsta *Capra hircus* i *Capra pyrenaica hispanica* i opisali ga kao jednostavniji, jeftiniji i brži pristup otkrivanju hibridizacije između divljih i pripitomljenih vrsta. Do sada je, po meni dostupnim izvorima, nakon toga, metoda korištena još samo dva puta, za analizu hibrida čaglja i psa (Galov i sur., 2015) i analizu varijabilnosti MHC lokusa vuka (Galaverni i sur., 2013).

Otkrivanje stupnja i opsega hibridizacije među vrstama bitno je za istraživanje specijacije i konzervacijsku biologiju vrsta koje su u potencijalnoj opasnosti (Vilà i sur., 2003). Hibridizacija između vuka i psa smatra se jednom od glavnih prijetnji konzervaciji vukova jer miješanje i introgresija gena domaćih životinja može poremetiti lokalne adaptacije i biti prijetnja dugotrajnom preživljavanju divljih populacija vukova. Više od 350 patogena može inficirati psa. Zajednice pasa pogodne su za opstanak bolesti i ako te bolesti prijeđu na divlje vrste, što bi se moglo dogoditi hibridizacijom i introgresijom gena, to postaje problem za očuvanje značajno manjih populacija vukova. U konzervacijskoj biologiji postoje brojna pitanja. Ako je vuk zaštićen, što je s hibridima? Koja razina introgresije je prihvatljiva? Treba li hibride ukloniti iz divljine? Koja je granica između domesticirane i divlje životinje? Koje metode upravljanja su prihvatljive kod hibrida (Lescureux i Linnell, 2014)? Da bi se na ta

pitanja moglo odgovoriti potrebno je saznati što više o hibridizaciji i odnosima ovih dviju životinja.

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je analizirati alele i haplotipove DQA/DQB/DRB uzoraka koji su potencijalni hibridi između vuka i psa te usporedbom s haplotipovima dobivenim za vuka i psa iz literature utvrditi mogu li se MHC lokusi koristiti za dokazivanje hibridizacije između vuka i psa, te saznati više o introgresiji gena kod ove dvije vrste u Hrvatskoj.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorci tkiva

Uzorci tkiva korišteni za izradu ovog diplomskog rada dobiveni su ljubaznošću prof. dr. sc. Đure Hubera i prof. dr. sc. Josipa Kusaka s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Radilo se o životinjama koje su pronađene mrtve (prometne nesreće, legalno i ilegalno ubijene, uginule od posljedica bolesti), tijekom programa monitoringa vukova, u razdoblju od 1996. do 2011. (Štrbenac i sur., 2010), na području Gorskog kotara, Like, Dalmacije, Banovine, Panonske Hrvatske i dijela BiH u blizini granice s Dalmacijom. Kusak i suradnici (2018) su među 176 uzoraka vukova, na temelju morfologije (Slika 7a i Slika 7b), izabrali 19 potencijalnih hibrida između vuka i psa, a ja sam obradila 17 takvih uzoraka (Tablica 1.). Od 17 uzoraka, genetički markeri korišteni u radu Kusak i sur. (2018) pokazali su da su 5 uzorka hibridi, nastali povratnim križanjem, a ostali vukovi. 4 hibrida su nastala povratnim križanjem s vukom, a 1 sa psom (Tablica 1) (Kusak i sur., 2018). U ovom diplomskom radu analizirala sam svih 17 uzoraka koji su morfološki ukazivali da bi se moglo raditi o hibridima, kako bih vidjela hoće li biti razlike između nalaza koje su dobili Kusak i sur. (2018) i onih dobivenih MHC genotipizacijom, i tako donijela informiraniji zaključak o primjenjivosti testirane metode.

Uzorci su čuvani na -20°C u 96%-tnom etanolu na Zavodu za biologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uglavnom se radilo o uzorcima mišićnog tkiva, a izuzetak su uzorci WCRO069 i WCRO101, od kojih je prvi uzorak epitelnog tkiva, a drugi jetre.

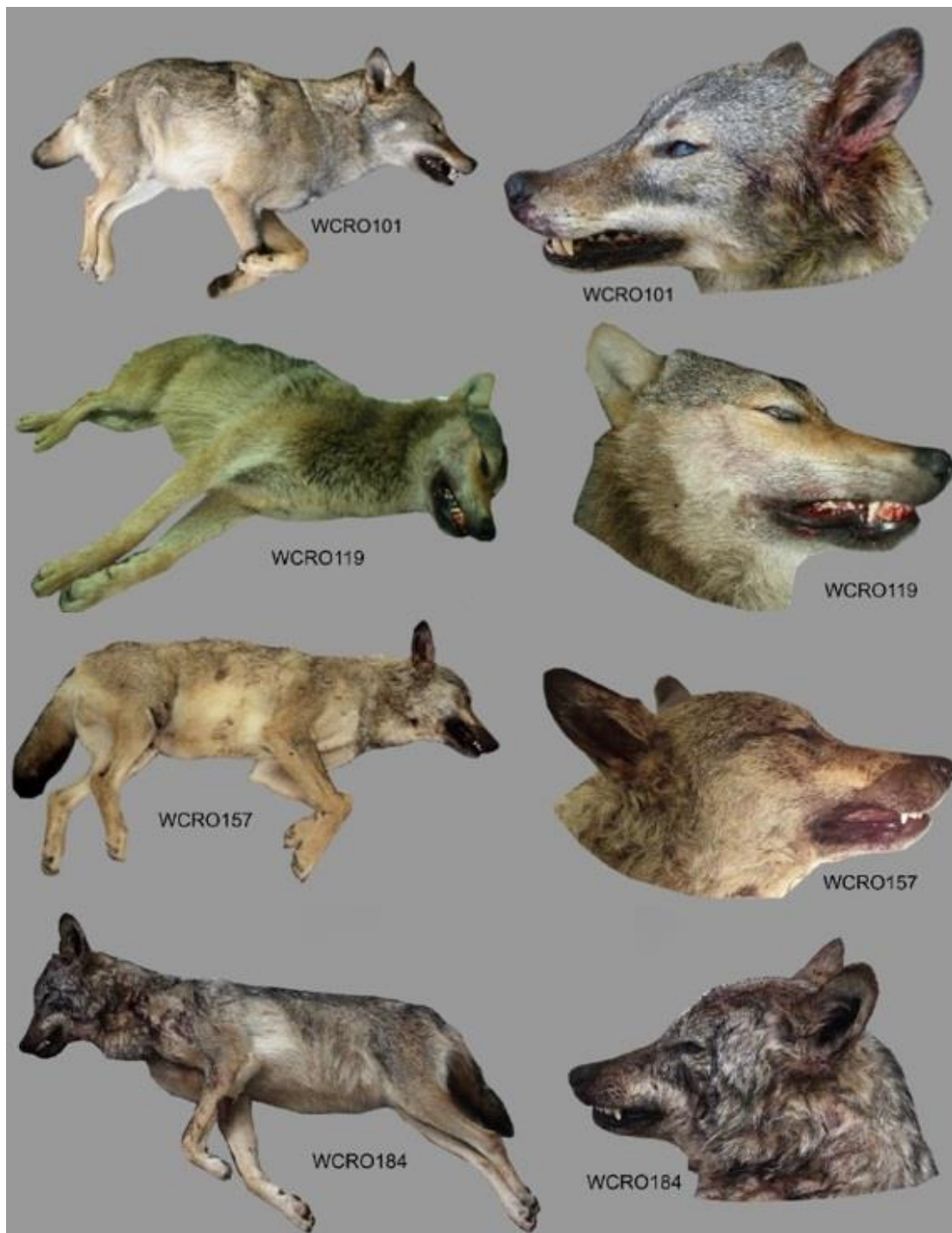
Tablica 1. Korišteni uzorci i fenotipske anomalije na temelju kojih su identificirani kao potencijalni hibridi (preuzeto i prilagođeno iz Kusak i sur., 2018).

OZNAKA	SPOL	PRONAĐENE FENOTIPSKJE ANOMALIJE	IDENTIFIKACIJA PREMA GENOTIPU
WCRO007*	M	Premala tjelesna masa (28 kg) za mužjaka vuka starog 3 godine.	VUK
WCRO032	M	Nedostatak crnih pruga na prednjim nogama, treći i četvrti prst spojeni na posteriornom kraju na sve 4 noge. Udaljenost gornjih očnjaka je 3.9 cm, a donjih samo 3.7 cm.	PKV ^a
WCRO43*	Ž	Lateralni nastavci na presfenoidnoj kosti dugi samo 1 mm.	VUK
WCRO051*	M	Nedostatak crnih pruga na prednjim nogama, tamne dlake na leđima, premala masa (32 kg) za mužjaka starog tri godine.	PKP ^b
WCRO052	M	Nedostatak crnih pruga na prednjim nogama, plosnato čelo.	VUK
WCRO058	Ž	Nedostatak crnih pruga na prednjim nogama, treći i četvrti prst spojeni na posteriornom kraju na sve četiri noge. Asimetrična gornja i donja čeljust.	VUK
WCRO069	Ž	Kratke noge, bačvasto tijelo, kratka njuška.	VUK
WCRO071	M	Crne dlake na leđima i nogama, crne pruge na prednjim nogama prilično široke. Glava duga i uska i bez čela.	VUK
WCRO075*	Ž	Atipično obojenje dlake, pretežno crna glava i tijelo. Crne mrlje, posebno na zadnjim nogama.	PKV ^a
WCRO101	M	Dlaka crvenkasto – smeđa, vrhovi dlaka crni, prisutna crna pruga na prednjim nogama, glava duga i uska, duge uši (11 cm), plosnato čelo, njuška blago konkavna.	PKV ^a
WCRO0119	M	Svjetlo žuta dlaka, nedostatak crnih pruga na prednjim nogama, glava duga i uska, njuška konkavna, duge uši (13.4 I 12.8 cm).	VUK
WCRO0127	Ž	Premala masa (22.5 kg) za ženku vuka staru 1.5 g.	VUK
WCRO157	M	Duge uši (11.4 i 11.5 cm), male šape (prednje: 8.6 i 8.1 cm; stražnje: 7.5 and 7.7 cm) za mužjaka u drugoj godini života.	PKV ^a
WCRO160	M	Tamne (gotovo crne) dlake, posebno na glavi, leđima I distalnom dijelu nogu, duga glava (30 cm).	VUK
WCRO162	Ž	Kratka glava (24 cm), duge uši (11.5 cm i 11.7 cm), žute dlake.	VUK
WCRO170	M	Tamna do crna dlaka na glavi, leđima i distalnom dijelu nogu, siva prsa, trbuh I proksimalni dio nogu.	VUK
WCRO184	F	Kratka glava (24.2 cm).	VUK

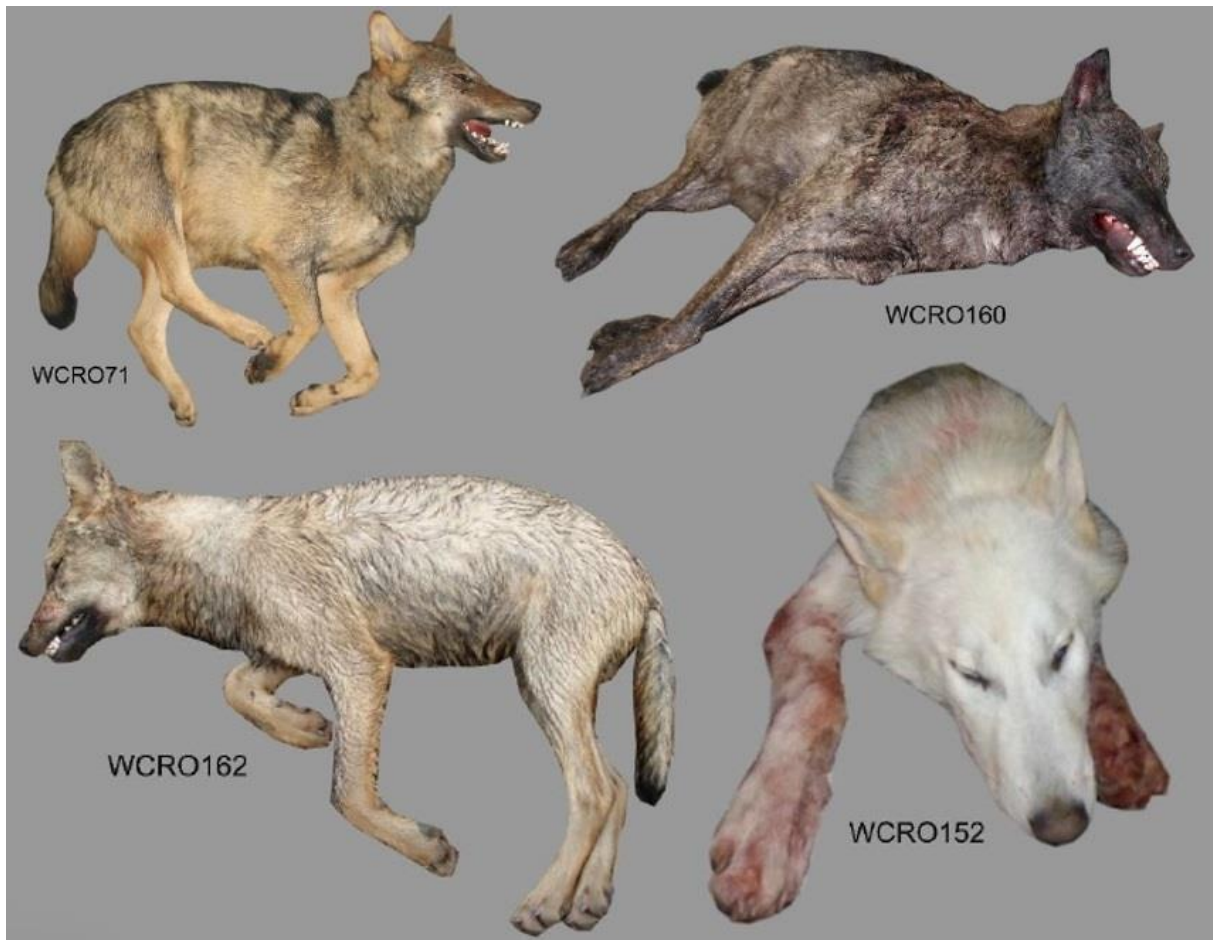
* uzorci iz kojih nije uspješno izolirana DNA

^a PKV-hibrid nastao povratnim križanjem s vukom

^b PKP-hibrid nastao povratnim križanjem sa psom



Slika 7a. Leševi životinja iz kojih su uzeti uzorci tkiva s vidljivim morfološkim anomalijama, zbog kojih su okarakterizirane kao mogući hibridi vuka i psa (preuzeto i prilagođeno iz Kusak i sur., 2018).



Slika 7b. Leševi životinja iz kojih su uzeti uzorci tkiva s vidljivim morfološkim anomalijama, zbog kojih su okarakterizirane kao mogući hibridi vuka i psa. (preuzeto i prilagođeno iz Kusak i sur., 2018).

2.2. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA prvo je korišten komercijalni paket Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), međutim, izolacija nije uspjela na velikom broju uzoraka pa je za ponovljenu izolaciju korišten QIAamp DNA Micro Kit, paket koji proizvodi Qiagen, a namijenjen je za izolaciju DNA iz malih količina uzoraka. Iz 5 uzoraka sam uspjela izolirati DNA korištenjem QIAamp DNA Micro Kit, premda mi izolacija s Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) na istim uzorcima nije uspjela.

2.2.1. Wizard Genomic DNA Purification Kit

5-10 mg tkiva usitnjeno je skalpelom i dodano u plastičnu eprvetu od 1.5 ml, u koju je prethodno otpipetirano 300 ml Nuclei Lysis Solution otopine. Sadržaj je vorteksiran da bi

se dobro izmiješao, a potom kratko centrifugiran. Nakon toga dodano je 1.5 µl proteinaze K koncentracije 20 mg/ml. Slijedila je inkubacija preko noći na 55°C. Sutradan je epruveta ohlađena na sobnu temperaturu, a nakon toga u nju je dodano 100 µl otopine Protein Precipitation Solution, sadržaj je snažno vorteksiran 20 sekundi pa stavljen na led 5 minuta. Ohlađena epruveta centrifugirana je 3 minute na 13000 rpm. U čistu pčastičnu epruvetu dodano je 300 µl 100%-tnog etanola, a potom i supernatant iz prethodnog koraka. Proteini su ostali u talogu. Pažljivim okretanjem epruvete, sadržaj je promiješan, a onda centrifugiran 1 minutu na 13000 rpm. Supernatant je dekantiran, a ovaj put je DNA ostala u talogu. Na talog je dodano 300 µl 70%-tnog etanola i opet pažljivo promiješano okretanjem epruvetice. Slijedila je ponovna centrifuga 1 minutu na 13000 rpm. Supernatant je odstranjen pipetom, a tubice su preokrenute na čisti filter papir i ostavljene da se suše 30 minuta na zraku. Nakon sušenja dodano je 100 µl DNA Rehydration Solution otopine i sadržaj epruvete je inkubiran na sobnoj temperaturi sat vremena. Time je dovršen proces izolacije DNA i ona je spremljena na 4°C u frižider.

2.2.2. QIAamp DNA Micro Kit

Za uspješnu izolaciju DNA iz nekih uzoraka bilo je, ipak, potrebno koristiti protokol za izolaciju manje količine DNA. Uzorak tkiva manji od 10 mg prebačen je u plastičnu epruvetu od 1.5 ml. Prije nego što se uzorak stigao u potpunosti odmrznuti dodano mu je 180 µl ATL pufera i temperatura mu je dignuta na sobnu. U tubicu je dodano 20 µl proteinaze K i vorteksirana je 15 sekundi. Sadržaj je inkubiran tijekom noći na 56°C u termomikseru kako bi se uzorak u potpunosti raspao. Ujutro je dodano 200 µl AL pufera i smjesa je centrifugirana dok nije postala potpuno homogena. U to je dodano 200 µl 100%-tnog etanola i opet je smjesa vorteksirana 15 sekundi. Slijedila je inkubacija 5 minuta na sobnoj temperaturi i kratka centrifuga kako bi se uklonile kapljice s poklopca i spriječilo prskanje pri otvaranju tubice. Cijeli lizat iz prethodnog koraka oprezno je premješten na QIAamp MinElute kolonu u epruvetu od 2 ml. Tijekom svih sljedećih koraka koji uključuju QIAamp MinElute kolone posebna je pažnja posvećena tome da se ne smoči rub kolone i da ona ne dođe u kontakt sa sadržajem koji protekao kroz nju. Lizat je centrifugiran prvo na 8000 rpm 1 minutu pa na sve većoj brzini dok cijeli nije prošao kroz kolonu. Naizgled prazna kolona premještena je u čistu epruvetu od 2 ml. U nju je oprezno dodano 500 µl AW1 pufera. Ponovljen je korak centrifugiranja na 8000 rpm 1 minutu i prebacivanja kolone u čistu tubicu. Sljedeći je dodan AW2 pufer u istoj količini i opet je uslijedila centrifuga i prebacivanje kolone. Epruveta je stavljena 3 minute na centrifugiranje pri punoj brzini kako bi se membrana u potpunosti

osušila. Kolona je, potom, prebačena u čistu plastičnu epruvetu od 1.5 ml i na sredinu membrane nanese je 50 µl AE pufera. Sve je inkubirano na sobnoj temperaturi 5 min pa centrifugirano pri punoj brzini.

2.3. Lančana reakcija polimerazom

Izolirana DNA išla je na daljnje umnažanje odsječaka od interesa pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*). PCR reakcija korištena je kako bi se umnožili fragmenti DNA koji sadrže egzon 2 DRB, DQA i DQB lokusa MHC sustava. Za to je korišten HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) komercijalni paket. Za provjeru uspješnosti izolacije DNA, reakcijska smjesa imala je 8 µl, a za umnažanje DNA fragmenta u svrhu slanja na sekvenciranje reakcijska smjesa bila je volumena 40 µl. Pola volumena činio je 1x koncentrirani Taq PCR Master Mix, koji sadrži pufer za PCR, dNTP i Taq DNA polimerazu. Ostatak su činile dvije početnice koncentracije 0,2 µM, DNA, koja je zauzimala 1/10 volumena reakcijske smjese, i voda bez RNaze, koja je zauzimala ostatak volumena. U svakoj reakciji bila je prisutna i negativna kontrola (bez DNA) kako bi se detektirala bilo kakva zagađenja.

Za DRB lokus korištene su uzvodna početnica DRBF (GAT CCC CCC GTC CCC ACA G) i nizvodna početnica DRB1R (TGT GTC ACA CAC CTC AGC ACC A). Za DQA lokus korištene su uzvodna početnica DQAin1 (TAA GGT TCT TTT CTC CCT CT) i nizvodna početnica DQAin2 (GGA CAG ATT CAG TGA AGA GA). DQB egzon 2 umnožen je pomoću uzvodne početnice DQB1BT7 (CTC ACT GGC CCG GCT GTC) i nizvodne početnice DQB1B (CAC CTC GCC GCT GCA ACG TG). (Arbanasić i sur., 2013)

Svaka PCR reakcija uključivala je 15 min na 95°C, 14 ciklusa od 30 s na 95°C i 1 min na odgovarajućoj temperaturi za sparivanje početnica. Temperatura sparivanja početnica s DNA postavljena je na 62°C za DRB, 54°C za DQA i 73°C za DQB lokus pa potom spuštena za 0,5°C u svakom ciklusu. Slijedila je 1 min na 72°C pa 20 ciklusa od 30 s na 95°C, a potom 1 min na 55°C (DRB), 47°C (DQA) ili 73°C (DQB) i opet 1 min na 72 °C. Zadnji korak produljivanja DNA odvijao se 10 min na 72°C (Arbanasić i sur., 2013).

Uzorci su, nakon umnažanja, ohlađeni na 4°C i spremljeni u hladnjak do elektroforeze.

2.4. Elektroforeza

Uspješnost DNA izolacije i lančane reakcije polimerazom provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu. 1%-tni agarozni gel napravljen je otapanjem 0.5 g agaroze u 50 ml 0.5xTBE pufera, tako da se smjesa zagrijavala sve dok se agarozna nije u potpunosti otopila. Nakon što se otopina malo ohladila, dodano joj je 5 µl SYBR Safe DNA gel stain boje za vizualizaciju DNA. Otopina je izlivena u kalup za gel i u to je umetnut češljic za jažice. Nakon 20 minuta u mraku, gel se polimerizirao i bio je spreman za nanošenje uzoraka. 3 µl PCR produkta pomiješano je na parafilmu s 3 µl pufera za nanošenje i nanoseno u jažice gela, koji je prethodno potopljen u kadnicu za elektroforezu, napunjenu TBE puferom. Elektroforeza je trajala 30 minuta i odvijala se pri naponu od 100 V i jakosti struje od 400 mA. Gel je analiziran na transiluminatoru pod UV svjetlom.

2.5. Sekvenciranje

Uspješno umnoženi uzorci DNA poslani su na sekvenciranje u MacroGen servis u Amsterdam. U servisu je prije sekvenciranja obavljeno i pročišćavanje uzoraka, a za sekvenciranje je korištena usluga "Standard-seq single Regular". Korištene su iste početnice kao i u PCR reakcijama. DQA lokus svih uzoraka sekvenciran je u uzvodnom smjeru uz pomoć početnice DQAin1 (TAA GGT TCT TTT CTC CCT CT). Za DRB i DQB lokus prvo su korištene početnice DRB1R (TGT GTC ACA CAC CTC AGC ACC A) i DQB1B (CAC CTC GCC GCT GCA ACG TG) za sekvenciranje u nizvodnom smjeru. Za uzorke kod kojih nije bilo moguće točno očitati slijed nukleotida naručeno je i potvrdno sekvenciranje u suprotnom smjeru. Za to su korištene početnice DRBF (GAT CCC CCC GTC CCC ACA G) i DQB1BT7 (CTC ACT GGC CCG GCT GTC).

2.6. Računalna obrada podataka

2.6.1. BioEdit

Program BioEdit korišten je za pregledavanje i uređivanje, odnosno, poravnavanje nukleotidnih slijedova, kako bi se mogla identificirati polimorfna nukleotidna mjesta.

2.6.2. SeqScape

SeqScape (Applied Biosystems) softver dizajniran je za referentnu analizu nukleotidnih sljedova. Program uspoređuje dobivene sekvence s knjižnicom referentnih alela, specifičnih za određeni lokus, koji su dobiveni u prošlim istraživanjima, i na temelju poznatih alela razdvaja heterozigotne sljedove nukleotida. Prvo je provjerena točnost sljedova i ručno su prepravljene eventualne pogreške, a onda su, usporedbom s knjižnicom, određeni aleli DRB, DQA i DQB lokusa, odnosno haplotipovi svih uzoraka. Korištena je knjižnica alela izrađena za ranija istraživanja.

3. REZULTATI

Od početnih 17 uzoraka, izolacija DNA uspješno je obavljena na njih 13. Uspješno je identificirano 12 tro-lokusnih haplotipova iz 10 uzoraka (WCRO32, WCRO058, WCRO101b, WCRO119, WCRO127, WCRO157, WCRO160, WCRO162, WCRO170, WCRO 184). Za uzorak WCRO069 dobiveni su DRB/DQB dvo-lokusni haplotipovi (DRB1*03701/DQB1*00701, DRB1*03601/DQB1*03501), a za uzorak WCRO071 DRB/DQA haplotiovi (DRB1*03701/DQA1*005011 i DRB1*03601/DQB1*03501). Uzorak WCRO052 uspješno je umnožen samo na DQA lokusu (DQA1*00301 i DQA1*005011) (Tablica 2.).

Tablica 2. prikazuje haplotipove svih uzoraka koji su uspješno analizirani na dva ili tri lokusa i alele uzorka WCRO052, identifikaciju uzorka na temelju MHC genotipa iz ovog istraživanja (na osnovu podataka iz tablice 6) i identifikaciju uzorka na temelju analize mtDNA, Y kromosoma i mikrosatelitske DNA u ranijem istraživanju (Kusak i sur., 2018). Privatni pseći haplotip označen je crnom, zajednički haplotipovi nijansama sive, a privatni vučji različitim bojama (svaki haplotip je posebne boje, a boje su jednake onima u tablici 6).

Tablica 2. Distribucija pronađenih haplotipova po jedinkama, identifikacija uzorka na osnovu genotipa koji pokazuju MHC haplotipovi i genotipova koji su identificirali Kusak i sur. (2018). Privatni vučji haplotipovi označeni su različitim bojama, jedan privatni pseći crnom, a dva zajednička haplotipa nijansama sive.

JEDINKA	HAPLOTIPOVI			IDENTIFIKACIJA UZORAKA NA OSNOVU MHC GENOTIPA	IDENTIFIKACIJA UZORAKA IZ Kusak i sur. (2018)
WCRO032	DRB1*01501	DQA1*00901	DQB1*00101	NE MOŽE SE ODREDITI*	PKV
	DRB1*03701	DQA1*005011	DQB1*00701		
WCRO052		DQA1*00301		NE MOŽE SE ODREDITI§	VUK
		DQA1*005011			
WCRO058	DRB1*03701	DQA1*005011	DQB1*00701	VUK	VUK
	DRB1*05401	DQA1*00301	DQB1*04101		
WCRO069	DRB1*03701		DQB1*00701	VUK	VUK
	DRB1*03601		DQB1*03501		
WCRO071	DRB1*03701	DQA1*005011		VUK	VUK
	DRB1*05401	DQA1*00601			
WCRO101	DRB1*03701	DQA1*005011	DQB1*00701	VUK	PKV
	DRB1*03701	DQA1*005011	DQB1*00701		
WCRO119	DRB1*03202	DQA1*00201	DQB1*02901	VUK	VUK
	DRB1*05401	DQA1*00601	DQB1*02002		
WCRO127	DRB1*03601	DQA1*012011	DQB1*03501	VUK	VUK
	DRB1*05401	DQA1*00301	DQB1*04101		
WCRO157	DRB1*01502	DQA1*00601	DQB1*02301	HIBRID	PKV
	DRB1*05401	DQA1*00301	DQB1*00401		
WCRO160	DRB1*03202	DQA1*00201	DQB1*02901	VUK	VUK
	DRB1*05401	DQA1*00301	DQB1*00401		
WCRO162	DRB1*01801	DQA1*00101	DQB1*00802	NE MOŽE SE ODREDITI*	VUK
	DRB1*05401	DQA1*00301	DQB1*04101		
WCRO170	DRB1*03701	DQA1*00301	DQB1*00401	VUK	VUK
	DRB1*04301	DQA1*00301	DQB1*04101		
WCRO184	DRB1*03701	DQA1*005011	DQB1*00701	VUK	VUK
	DRB1*04301	DQA1*00301	DQB1*03801		

* s obzirom da ova dva uzorka imaju po jedan haplotip koji zajednički vuku i psu (svjetlo sivi, odn. tamno sivi), a drugi haplotip im je specifičan za vuka (tamno zeleni, odn. žuti), ne mogu isključiti mogućnost da se u ta dva slučaja radi o hibridima (ali ih ne mogu niti potvrditi)

§ oba DQA1 alela su zajednički vuku i psu (tablica 4)

3.1. ALELI

U svrhu određivanja pripadnosti pojedinih alela određenoj vrsti (vuk, pas ili zajednički) (Tablice 3, 4 i 5), pronađene alele sam uspoređivala s dostupnim prethodnim nalazima (Arbanasić i sur., 2013; Galaverni i sur., 2013, 2015; Kennedy i sur., 2000, 2007a, 2007b; Maccari i sur., 2017; Niskanen i sur., 2014; Seddon i Ellegren, 2002). Ukupno je 6 alela nađeno isključivo u vuka (privatni vučji aleli), od toga je 5 na DRB (Tablica 3), a 1 na DQB lokusu (Tablica 5). Također sam utvrdila da je jedan alel pronađen u ovom istraživanju ranije pronađen isključivo u psa (privatni pseći alel) i pripada DQB lokusu (Tablica 5).

Tablica 3. DRB aleli pronađeni u ovom istraživanju, broj jedinki kod kojih je pronađen i pripadnost vrsti određena u prethodnim istraživanjima. Zajednički aleli označeni su sivom pozadinom, a privatni vučji aleli ružičastom.

ALEL	VUK	PAS	BR. JEDINKI KOD KOJIH JE PRONAĐEN ALEL
DRB1*01501	+	+	1
DRB1*01502	+	+	1
DRB1* 01801	+	+	1
DRB1*03202	+		2
DRB1*03601	+		2
DRB1*03701	+		6
DRB1*04301	+		2
DRB1*05401	+		6

Tablica 4. DQA aleli pronađeni u ovom istraživanju, broj jedinki kod kojih je pronađen i pripadnost vrsti određena u prethodnim istraživanjima. Zajednički aleli označeni su sivom pozadinom.

ALEL	VUK	PAS	BR. JEDINKI KOD KOJIH JE PRONAĐEN ALEL
DQA1*00101	+	+	1
DQA1*00201	+	+	2
DQA1*00301	+	+	7
DQA1*005011	+	+	6
DQA1*00601	+	+	3
DQA1*00901	+	+	1
DQA1*012011	+	+	1

Tablica 5. DQB aleli pronađeni u ovom istraživanju, broj jedinki kod kojih je pronađen i pripadnost vrsti određena u prethodnim istraživanjima. Privatni pseći alel označen je crnom pozadinom, zajednički sivom, a privatni vučji ružičastom.

ALEL	VUK	PAS	BR. JEDINKI KOD KOJIH JE PRONAĐEN ALEL
DQB1*00101	+	+	1
DQB1*00401	+	+	3
DQB1*00701	+	+	5
DQB1*00802	+	+	1
DQB1*02002	+	+	1
DQB1*02301		+	1
DQB1*02901	+	+	2
DQB1*03501	+	+	2
DQB1*03801	+	+	1
DQB1*04101	+		3

3.2. Haplotipovi

Usporedbom nalaza s dostupnim podacima iz prijašnjih istraživanja (Arbanasić i sur., 2013; Galaverni i sur., 2013, 2015; Kennedy i sur., 2002, 2007a, 2007b) zaključeno je da je 9 pronađenih tro-lokusnih haplotipova, te 4 dvo-lokusna haplotipa privatno za vuka (tablica 6). Svi dvo-lokusni haplotipovi su okarakterizirani kao privatni vučji.

Haplotip DRB1*01502/DQA1*00601/DQB1*02301 privatni je pseći haplotip, a pronađen je kod labradora, njemačkog ovčara i 28 drugih pasmina.

Dva haplotipa su zajednička vukovima i psima. To su DRB1*01501/DQA1*00901/DQB1*00101 koji je osim kod vuka pronađen i kod dobermana, bigla i 11 drugih pasmina te DRB1*01801/DQA1*00101/DQB1*00802 koji je osim kod vuka pronađen i kod rodezijskog goniča lavova, bradatog škotskog ovčara i 9 drugih pasmina.

Svi haplotipovi i njihova pripadnost vrsti prikazani su u tablici 6.

Među 12 tro-lokusnih haplotipova 9 ih je privatnih vučjih, 1 privatni pseći, a 2 su zajednička. Haplotip koji se najčešće pojavljuje je DRB1*03701/DQA1*005011/DQB1*00701, u 20 uzoraka pojavljuje se 5 puta kod 4 jedinke.

Tablica 6. Haplotipovi pronađeni u ovom istraživanju, broj jedinki kod kojih su pronađeni i pripadnost vrsti određena u prethodnim istraživanjima.

HAPLOTIPOVI			VUK	PAS	BR. JEDINKI KOD KOJIH JE PRONAĐEN HAPLOTIP
DRB1*01501	DQA1*00901	DQB1*00101	+	+	1
DRB1*03701	DQA1*005011	DQB1*00701	+		4
DRB1*05401	DQA1*00301	DQB1*04101	+		3
DRB1*03701		DQB1*00701	+		1
DRB1*03601		DQB1*03501	+		1
DRB1*03701	DQA1*005011		+		1
DRB1*05401	DQA1*00601		+		1
DRB1*03202	DQA1*00201	DQB1*02901	+		2
DRB1*05401	DQA1*00601	DQB1*02002	+		1
DRB1*03601	DQA1*012011	DQB1*03501	+		1
DRB1*01502	DQA1*00601	DQB1*02301		+	1
DRB1*05401	DQA1*00301	DQB1*00401	+		2
DRB1*01801	DQA1*00101	DQB1*00802	+	+	1
DRB1*03701	DQA1*00301	DQB1*00401	+		1
DRB1*04301	DQA1*00301	DQB1*04101	+		1
DRB1*04301	DQA1*00301	DQB1*03801	+		1

4. RASPRAVA

Iz većine uzoraka DNA je uspješno izolirana tek korištenjem QIAamp DNA Micro Kit paketa, a iz nekih niti tom metodom (WCRO007, WCRO043, WCRO051, WCRO75). Nekoliko uzoraka DNA nije uspješno umnoženo na jednom ili dva lokusa (WCRO052, WCRO69b, WCRO071). Uzorci korišteni za ovaj diplomski rad stari su između 7 i 22 godina, uzimani su iz uginulih životinja, korišteni su za ranija istraživanja i vjerojatno više puta odmrzavani i smrjavani. Sve to utječe na stabilnost DNA molekule i ukazuje da je vjerojatni uzrok neuspjele izolacije ili umnožavanja fragmenta DNA razina njezine degradacije. Nakon više neuspješnih pokušaja izolacije DNA, odbačeni su uzorci WCRO007, WCRO043, WCRO051, WCRO075.

Pripadnost alela i haplotipova uspješno obrađenih uzoraka određena je usporednom dobivenog s dostupnom literaturom (Arbanasić i sur., 2013; Galaverni i sur., 2013; Kennedy i sur., 2000, 2007a, 2007b; Maccari i sur., 2017; Niskanen i sur., 2014; Seddon i Ellegren, 2002). Haplotip DRB1*03701/DQA1*00301/DQB1*00401, prema mojem saznanju, u ovom je istraživanju prvi put zabilježen. Prema MHC bazi podataka Europskog instituta za bioinformatiku, koja skuplja i organizira podatke svih istraživanja MHC sustava (Maccari i sur., 2017), DRB1*03701 alel pronađen je samo kod vuka i prema toj informaciji u ovom je radu haplotip određen kao privatni vučji. Svi pronađeni dvo-lokusni haplotipovi određeni su, također, zbog privatnog vučjeg alela na DRB lokusu, kao privatni vučji.

Prvi put je analiza MHC lokusa kao biljega za hibridizaciju korištena za detekciju hibridizacije vrsta *Capra hircus* i *Capra pyrenaica hispanica*. Pokazano je da su MHC lokusi pogodni za detekciju hibrida vrsta s različitom varijabilnošću alela na tim lokusima, ali uz upozorenje da bi se kod evolucijski bliskih vrsta ili vrsta koje su domaćini istim patogenima mogli pojaviti zajednički MHC aleli (Alasaad i sur., 2012). U ovom istraživanju to se i dogodilo. Svi DQA aleli, većina DQB alela i tri DRB alela pronađeni su i kod vukova i kod pasa. To je i očekivano, s obzirom da su Seddon i Ellegren (2002) usporedivši MHC lokuse europskog vuka s američkim vukom i psom uvidjeli da europski vuk dijeli sve pronađene DQA alele s američkim vukom i/ili psom, dok je za DQB i DRB lokuse razina preklapanja puno manja. Razlog tome je manja varijabilnost DQA lokusa. Kod vukova je najvarijabilniji DRB lokus (Arbanasić i sur., 2013).

Pojava da različite vrste imaju iste alele česta je pojava kod lokusa MHC sustava. Često najbliža sekvenca MHC alela dolazi iz druge vrste, a ne iz drugog alela unutar iste vrste. Ovaj fenomen se naziva trans-specijski polimorfizam i predlaže da se varijanta (alel) kojeg nosi zajednički predak održava čak i kad se vrsta podijeli u dvije ili više novih vrsta (Hedrick i sur., 2000). Karakterističan je za MHC gene, najčešće se događa između dvije blisko povezane vrste i posljedica je balansirajuće selekcije, koja djeluje na MHC gene kroz dugi period (Piertney i Oliver, 2006).

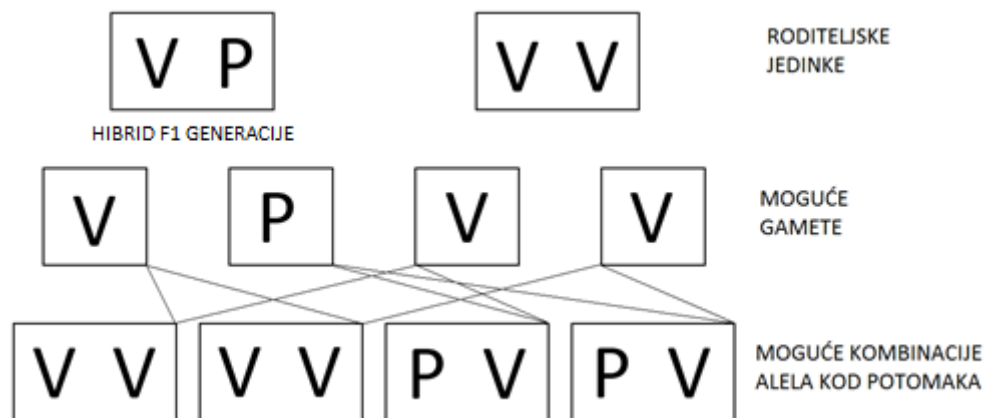
Galov i suradnici (2015) predlažu da, kada postoji trans-specijski polimorfizam, odnosno kada aleli na određenom lokusu nisu specifični za vrstu, dvo-lokusni ili tro-lokusni haplotipovi, koji se u određenim kombinacijama nasljeđuju zajedno, mogu poslužiti za identifikaciju hibrida. Tako je u ovom istraživanju nađeno da su, premda je većina alela zajednička vukovima i psima (ukupno 18 alela: 3 od 8 na DRB1 lokusu, 7 od 7 na DQA1 lokusu i 8 od 10 na DQB1 lokusu, tablice 3, 4 i 5), ipak haplotipovi koje tvore više specifični za vrstu. Tako je od ukupno 16 dvo-lokusnih i tro-lokusnih haplotipova njih čak 13 specifično za vuka, 1 za psa, dok su zajednička samo 2 haplotipa (tablica 6).

Galov i sur. (2016) analizirali su, nakon uobičajene analize mtDNA, Y kromosoma i mikrosatelita, MHC lokuse tri hibrida čaglja i psa. Kod sve tri jedinke ustanovili su prisutnost jednog privatnog haplotipa za psa i jednog privatnog za čaglja, i tako, dodatno, potvrdili da se radi o hibridima. Zaključili su da se MHC lokusi mogu koristiti za identifikaciju hibrida u slučaju kad su dostupni podaci za obje roditeljske populacije i kada roditeljske populacije nisu blisko srodne.

Kusak i suradnici (2018) uzorke korištene za ovaj rad analizirali su kombinacijom genetičke analize mitohondrijske DNA, Y kromosoma i mikrosatelita i odredili koji od potencijalnih hibrida su i genetski hibridi, a koji su vukovi. WCRO32, WCRO101 i WCRO157 prema njihovim su rezultatima okarakterizirani kao hibridi. Preciznije rečeno, radi se o jedinkama koje nisu F1 hibridi već hibridi nastali povratnim križanjem s vukom. Što se tiče alela MHC lokusa identificiranih u ovom istraživanju WCRO32 (identificiran kao PKV, Tablica 1) ima jedan haplotip tipičan za vuka (DRB1*03701/DQA1*005011/DQB1*00701) (prema Arbanasić i sur., 2013 najčešći u populaciji hrvatskih vukova), a drugi je zajednički vuku i psu (DRB1*01501/DQA1*00901/DQB1*00101). WCRO101 (identificiran kao PKV, Tablica 1) je homozigot je za tipičan vučji MHC haplotip (DRB1*03701/DQA1*005011/DQB1*00701). Za ova dva uzorka MHC haplotipovi nisu se

pokazai informativnima za identifikaciju hibrida (PKV). WCRO157 (identificiran kao PKV, Tablica 2) jedini je hibrid koji ima privatni vučji i privatni pseći haplotip i MHC genotipizacija je jedino u ovom slučaju potvrdila njegov status hibrida. Kada se radi o povratnom križanju, pojavljivanje pojedinih haplotipova i njihove kombinacije mogu se objasniti segregacijom alela. Naime, F1 generacija hibrida je heterozigotna na svim lokusima za alele specifične za populaciju, ali jedinke nastale povratnim križanjem hibrida i roditeljske populacije mogu imati različite kombinacije genotipova, ovisno o križanju i rezultatima segregacije alela (Rhymer i Simberloff, 1996). Jedinke nastale povratnim križanjem hibrida F1 generacije s vukom mogu dobiti vučje haplotipove MHC lokusa i od jednog i od drugog roditelja (Slika 8). Isto tako, povratnim križanjem hibrida s vukom mogao je nastati potomak s jednim psećim i jednim vučjim haplotipom i tako prenijeti pseći haplotip u vučju populaciju. Tada govorimo o introgresiji psećih gena u vučju populaciju.

Dodatno, jedinka WCRO162 (identificirana kao vuk, Tablica 1) ima jedan haplotip koji je zajednički vukovima i psima (DRB1*01801/DQA1*00101/DQB1*00802), dok je drugi privatni vučji (DRB1*05401/DQA1*00301 /DQB1*04101) (Tablica 2). Niti u ovom slučaju ne možemo pomoću MHC genotipa isključiti mogućnost da se radi o hibridu.



Slika 8. Shematski prikaz segregacije alela u kojem povratnim križanjem hibrida između vuka i psa s vukom može nastati jedinka s oba vučja alela i jedinka s jednim vučjim i jednim psećim alelom. Budući da se MHC aleli svih lokusa gotovo uvijek nasljeđuju zajedno, ova shema vrijedi i za nasljeđivanje haplotipova. (V = vučji alel, P = pseći alel)

Za ostale uzorke kojima sam identificirala dvo- ili tro- lokusne haplotipove (WCRO058, WCRO069, WCOR071, WCRO119, WCRO127, WCRO160, WCRO170, WCRO184, Tablica 2) MHC genotipovi su potvrdili prijašnju identifikaciju ovih jedinki kao vukova (Tablica 1) jer su svi imali privatne vučje haplotipove.

Kada postoji balansirajuća selekcija multiplih alela i podjela populacije, predviđa se značajna introgresija između dviju skupina zbog snažne selektivne prednosti rijetkih alela. Naime, kada životinje žive na istom staništu, što je uglavnom istina za vrste koje hibridiziraju, susreću se s istima patogenima. Introgresija rezistentnih alela može biti adaptivna prednost. Međutim, trans-specijski polimorfizam vezan je uz dugotrajnu podložnost istim patogenima i polimorfni lokusi pod utjecajem balansirajuće selekcije zadržavaju varijacije naslijeđene od zajedničkog pretka puno dulje od neutralnog lokusa. Drugim riječima, teško je razlikovati introgresiju iz srodne vrste od trans-specijskog polimorfizma, pogotovo na lokusima koji su pod utjecajem balansirajuće selekcije (Galov i sur., 2015; Hedrick, 2013; Kennedy i sur., 2007a). Činjenica da psi i vukovi dijele alele i haplotipove može biti posljedica trans-specijskog polimorfizma ili introgresije gena jer su se relativno nedavno odvojili, ali i vrste su koje hibridiziraju.

5. ZAKLJUČCI

Od ukupno 17 uzoraka potencijalnih hibrida između vuka i psa, uspješno sam identificirala tro-lokusne haplotipove kod njih 10, dvo-lokusne haplotipove sam identificirala kod dva uzorka, a za jedan uzorak sam uspjela identificirati samo 1 lokus. Za 4 uzorka nisam uopće uspjela dobiti PCR produkte niti za jedan lokus. Relativno niska uspješnost PCR umnažanja posljedica je starosti uzoraka i toga što uzorci potječu s lešina životinja, tako da je DNA bila degradirana.

Usporedbom 16 dobivenih haplotipova s informacijama iz dostupne literature u ovom istraživanju određena je pripadnost haplotipova vrsti: 13 su identificirani kao privatni vučji, 1 kao privatni pseći i dva koja su zajednička. Pri tome je pronađen jedan novi haplotip (DRB1*03701/DQA1*00301/DQB1*00401) koji do sada nije pronađen ni kod psa ni kod vuka, određen je kao vučji (s obzirom da sadrži privatni vučji alel na DRB lokusu).

Pronađeno je 18 zajedničkih alela i 2 zajednička haplotipa. To može biti pokazatelj trans-specijskog polimorfizam ili introgresije gena. Vukovi i psi imaju zajedničkog pretka, često dijele stanište i međusobno hibridiziraju, što znači da je eventualno postojanje zajedničkih gena vjerojatno posljedica oba ova procesa.

Od analiziranih uzoraka, 3 (WCRO032, WCRO101 I WCRO157) su ranije određena kao hibridi nastali povratnim križanjem s vukom (PKV). Za WCRO032 i WCRO101 MHC haplotipovi nisu se pokazali informativnim za potvrdu da se radi o hibridu. No, za uzorak WCRO157 pokazali su se informativnima. Stoga MHC lokusi mogu biti dobri biljezi za otkrivanje hibridizacije vuka i psa jedino u slučaju kad potencijalni hibridi nose privatne alele za pojedinu vrstu. Primjenjivost MHC lokusa bi zasigurno bila bolja u identifikaciji hibrida prve generacije. Povratnim križanjem hibrida prve, i svake sljedeće, generacije s vukom sve više se smanjuje vjerojatnost pronalaska psećih alela, a time i primjenjivost MHC lokusa kao biljega za otkrivanje hibridizacije između vuka i psa.

6. LITERATURA

- Alasaad S., Fickel J., Rossi L., Sarasa M., Benítez-Camacho B., Granados J. E., Soriguer R. C. (2012): Applicability of major histocompatibility complex DRB1 alleles as markers to detect vertebrate hybridization: A case study from Iberian ibex × domestic goat in southern Spain. *Acta Veterinaria Scandinavica* **54**: 1–6.
- Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. (2010): Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb.
- Arbanasić H., Huber D., Kusak J., Gomerčić T., Hrenović J., Galov A. (2013): Extensive polymorphism and evidence of selection pressure on major histocompatibility complex DLA-DRB1, DQA1 and DQB1 class II genes in Croatian grey wolves. *Tissue Antigens* **81**: 19–27.
- Ayna T. K., Koçyiği A. Ö. (2016): Detection of Anti-HLA Antibodies by Flow Cytometer. U: Schmid I. (ur.) *Flow Cytometry - Select Topics*. InTechOpen, str. 131-153.
- Dinets V. (2015). The Canis tangle: a systematics overview and taxonomic recommendations. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* **19**: 286.
- Fabbri E., Caniglia R., Kusak J., Galov A., Gomerčić T., Arbanasić H., Huber D., Randi E. (2014): Genetic structure of expanding wolf (*Canis lupus*) populations in Italy and Croatia, and the early steps of the recolonization of the Eastern Alps. *Mammalian Biology* **79**: 138–148.
- Galaverni M., Caniglia R., Fabbri E., Lapalombella S., Randi E. (2013): MHC variability in an isolated wolf population in Italy. *Journal of Heredity* **104**: 601–612.
- Galov A., Fabbri E., Caniglia R., Arbanasić H., Lapalombella S., Florijančić T., Bošković I., Galaverni M., Randi E. (2015): First evidence of hybridization between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers. *Royal Society Open Science* **2**: 150450.
- Hedrick P. W. (2013): Adaptive introgression in animals: Examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Molecular Ecology* **22**: 4606–4618.
- Hedrick P. W., Lee R. N., Parker K. M. (2000): Major histocompatibility complex (MHC) variation in the endangered Mexican wolf and related canids. *Heredity* **85**: 617–624.
- Hindrikson M., Männil P., Ozolins J., Krzywinski A., Saarma U. (2012): Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves. *PLoS One* **7**: 1–12.

- Kelley J., Walter L., Trowsdale J. (2005): Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics* **56**: 683–695.
- Kennedy L. J., Angles J. M., Barnes A., Carmichael L. E., Radford A..D., Ollier W. E. R., Happ G. M. (2007a): DLA-DRB1, DQA1, and DQB1 alleles and haplotypes in North American gray wolves. *Journal of Heredity* **98**: 491–499.
- Kennedy L.J., Barnes A., Short A., Brown J. J., Lester S., Seddon J., Fleeman L., Francino O., Brkljačić M., Knyazev S., Happ M., Ollier W. E. R. (2007b): Canine DLA diversity: 1. New alleles and haplotypes. *Tissue Antigens* **69**: 272–288.
- Kennedy L.J., Barnes A., Happ G. M., Quinnell R. J., Bennett D., Angles J. M., Day M. J., Carmichael N., Innes J. F., Isherwood D., Carter S. D., Thompson W., Ollier W. E. R. (2002): Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. *Tissue Antigens* **59**: 194–204.
- Kennedy L. J., Altet L., Angles J. M., Barnes A., Carter S. D., Francino O., Gerlach J. A., Happ G. M., Ollier W., E., R., Thompson W., Wagner J. L.(2001) Nomenclature for factors of the Dog Major Histocompatibility System (DLA), 2000: First report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Animal Genetics* **32**: 193-199.
- Kusak J., Fabbri E., Galov A., Caniglia R., Galaverni M., Huber Đ., Randi E. (2018): Wolf-Dog Hybridization in Croatia. *Veterinarski arhiv, u postupku objavljivanja*.
- Lescureux N., Linnell J.D.C. (2014): Warring brothers: The complex interactions between wolves (*Canis lupus*) and dogs (*Canis familiaris*) in a conservation context. *Biological Conservation* **171**: 232–245.
- Lorenzini R., Fanelli R., Grifoni G., Scholl F., Fico R. (2014): Wolf-dog crossbreeding: “Smelling” a hybrid may not be easy. *Mammalian Biology* **79**: 149–156.
- Maccari G., Robinson J., Ballingall K., Guethlein L. A., Grimholt U., Kaufman J., Ho C.S., De Groot N. G., Flicek P., Bontrop R. E., Hammond J.A., Marsh S.G.E. (2017): IPD-MHC 2.0: An improved inter-species database for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research* **45**: D860–D864.
- Mallet J. (2005): Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* **20**: 229–237.
- Milenković M., Habijan-Mikeš V., Matić R. (2006): Cases of spontaneous interbreeding of wolf and domestic dog in the region of Southeast Banat. *Archives of Biological Sciences* **58**: 225–231.
- Niskanen A. K., Kennedy L. J., Ruokonen M., Kojola I., Lohi H., Isomursu M., Jansson E., Pyhajarvi (2014): Balancing selection and heterozygote advantage in major

- histocompatibility complex loci of the bottlenecked Finnish wolf population. *Molecular Ecology* **23**: 875–889.
- Owen J.A., Punt J., Stranford S.A., Patricia P. Jones (2009): *Kuby Immunology*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Pacheco C., López-Bao J. V., García E. J., Lema F. J., Llaneza L., Palacios V., Godinho R. (2017): Spatial assessment of Wolf-dog hybridization in a single breeding period. *Scientific Reports* **7**: 42475
- Piertney S. B., Oliver M. K. (2006): The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* **96**: 7–21.
- Rhymer J.M., Simberloff D. (1996): Extinction By Hybridization and Introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**: 83–109.
- Savolainen P., Zhang Y., Luo J., Lundeberg J., Leitner T. (2002): Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science* **298**: 1610–3.
- Seddon J. M., Ellegren H. (2002): MHC class II genes in European wolves: A comparison with dogs. *Immunogenetics* **54**: 490–500.
- Serpell J. (2017): *The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People*. Cambridge University Press, Cambridge
- Skoglund P., Ersmark E., Palkopoulou E., Dalén L. (2015): Ancient wolf genome reveals an early divergence of domestic dog ancestors and admixture into high-latitude breeds. *Current Biology* **25**: 1515–1519.
- Sommer S. (2005): The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology* **2**: 1–18.
- Štrbenac A., Kusak J., Huber Đ., Jeremić J., Oković P., Majić-Skrbinšek A., Vukšić I., Katušić L., Desnica S., Gomerčić T., Bišćan A., Zec D., Grubešić M. (2010): Plan upravljanja vukom u Republici Hrvatskoj za razdoblje od 2010. do 2015. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb
- Vilà C., Walker C., Sundqvist A. K., Flagstad Ø., Andersone Z., Casulli A., Kojola I., Valdmann H., Halverson J., Ellegren H. (2003): Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* **90**: 17–24.
- Wagner J.L. (2003): Molecular Organization of the Canine Major Histocompatibility Complex. *Journal of Heredity* **94**: 23–26.
- Wayne R.K., Ostrander E. (1999): Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. *Bioessays* **21**: 247–257.

Internetski izvori:

<https://www.101dogbreeds.com/czechoslovakian-wolfdog-czechoslovakian-vlcak.asp>

<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/velike-zvijeri/sivi-vuk>

<http://www.iucnredlist.org/details/3746/1>

<http://www.iucnredlist.org/details/summary/3746/04>

<https://www.quora.com/How-do-our-immune-cells-recognize-self-and-nonself>

https://www.sporcle.com/games/Rackie/where-s_woof

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16. lipnja 1993. u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje započela sam u OŠ Petra Preradovića, a završila u OŠ grofa Janka Draškovića. Završila sam gimnaziju Tituša Brezovačkog 2012. godine i upisala preddiplomski sveučilišni studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija, upisala sam 2015. godine.

U okviru studija odradila sam stručnu praksu na Hrvatskom veterinarskom institutu, u Laboratoriju za analizu veterinarsko medicinskih pripravaka i Laboratoriju za mikrobiologiju hrane. Tijekom studijskog obrazovanja sudjelovala sam u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Noć biologije“ od 2013. do 2016. godine, 2015. godine kao studentski koordinator. Aktivna sam članica Udruge studenata biologije – BIUS, u čijem sam radu sudjelovala od 2014. godine kao članica Sekcije za herpetologiju i Sekcije za mikrobiologiju, 2016. kao član Upravnog odbora, a 2017. kao predsjednica Udruge. Sudjelovala sam u istraživačko- edukacijskim projektima „Papuk 2015.“, „Mura-Drava 2016.“ i „Insula Tilagus 2017.“, te brojnim manifestacijama. Istraživanje za diplomski rad provela sam na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ana Galov i neposrednim vodstvom dr. sc. Haidi Arbanasić.