



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I  
EKOLOGIJU



Dragana Šnjegota

# **Genetička struktura i filogeografski položaj populacije vuka (*Canis lupus* L. 1758) Bosne i Hercegovine**

-doktorska disertacija-



*Wolves and women are relational by nature, inquiring, possessed of great endurance and strength. They are deeply intuitive, intensely concerned with their young, their mate and their pack. Yet both have been hounded, harassed and falsely imputed to be devouring and devious, overly aggressive, of less value than those who are their detractors.*

*~WOMEN WHO RUNS WITH THE WOLVES~*

*Clarissa Pinkola Estes*

## *Zahvalnica*

*Ovo istraživanje je sprovedeno u laboratoriji za Genetiku, Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno - matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, pod mentorstvom dr Mihajle Djan, redovnog profesora.*

*Najiskrenije se zahvaljujem dr Mihajli Djan što mi je otvorila vrata laboratorije, nesebično me primila u svoj tim i omogućila da ovo istraživanje ugleda svjetlo dana. Zahvaljujem se na pomoći i korisnim savjetima koje sam dobijala tokom istraživanja.*

*Neizmerno se zahvaljujem dr Stojku Vidoviću za vjetar u leđa, za to što je svaki put kada sam rekla: "Profesore, ja bih aplicirala da idem negdje", odgovor bio: "Asistentice, samo naprijed i srećan put". Hvala na pruženoj prilici da započnem svoju akademsku karijeru, bez koje ne bih bila ovdje, gdje se trenutno nalazim.*

*Dr Dušku Ćiroviću se zahvaljujem za nesebičnu pomoć u ostvarivanju kontakata koji su neophodni u sakupljanju materijala bez kojeg ne bi bilo moguće sprovesti ovo istraživanje. Zahvaljujem se na entuzijazmu koji je bio prisutan tokom cijelog istraživanja, na lijepim riječima i pomoći.*

*Neizmerno se zahvaljujem Ljiljani Šašić Zorić, Nataši Kočiš Tubić, Neveni Veličković, Maji Oberman i Milomiru Stefanoviću što su me primili u svoj tim, nesebično mi pomagali u svim segmentima tokom izrade teze, ali prije svega, pružili mi divno drugarstvo zbog kojeg sam se sve ove godine u Novom Sadu osjećala kao kod kuće. Ova teza je posebna jer je iznjedrila drugarstva za cijeli život.*

*Veliko hvala kolegicama sa Prirodno - matematičkog fakulteta, Univerziteta u Banjaluci: Milici Lukač, Smiljani Paraš i Nataši Vojinović na neizmernoj pomoći tokom mojih odsustava.*

*Univerzitetu u Banjaluci se zahvaljujem za odobrena odsustva tokom kojih sam boravila u Novom Sadu i radila na izradi teze. Zahvaljujem se Ministarstvu Prosvjete i kulture i Ministarstvu Nauke i tehnologije Republike Srpske, kao i Rufford Fondaciji iz Velike Britanije, za finansijsku pomoć tokom izrade teze.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svima koji su pomogli u sakupljanju uzoraka, a posebno Lovačkom udruženju "Tetrijeb" i Šumskom gazdinstvu "Gorica" iz Šipova, Mladenu Jandriću, Milenku i Goranu Milovcu, Davoru Kopanji, Ivanu i čika Nikoli Sajeviću.*

*Mami i tati hvala što su me usmjerili na ispravan put, i što zajedno sa Tanjom i Milankom vjeruju u mene i pružaju mi bezgraničnu ljubav i podršku.*

*Novi Sad, 2018. godine*

*Dragana Šnjegota*

## SADRŽAJ

<i>Lista ilustracija</i> .....	<i>i</i>
<i>Lista tabela</i> .....	<i>v</i>
<i>Lista priloga</i> .....	<i>vi</i>
<i>Lista skraćenica</i> .....	<i>vii</i>
1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	5
2.1. Vuk .....	6
2.2. Molekularni markeri u populaciono - genetičkim analizama divljih životinja .....	12
2.2.1. Mikrosateliti .....	13
2.2.2. Mitohondrijalna DNK .....	16
2.3. Populaciono - genetička istraživanja vuka.....	17
2.3.1. Mikrosateliti u populaciono - genetičkim istraživanjima vuka .....	17
2.3.2. Mitohondrijalna DNK u populaciono - genetičkim istraživanjima vuka .....	20
2.4. Uticaj ledenih doba na vuka .....	23
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	25
4. RADNA HIPOTEZA .....	27
5. MATERIJAL I METODE .....	29
5.1. Materijal .....	30
5.2. Metode .....	31
5.2.1. Izolacija DNK .....	31
5.2.2. Analiza mikrosatelita .....	32
5.2.3. Analiza kontrolnog regiona mtDNK .....	34
5.3. Statistička analiza podataka o varijabilnosti mikrosatelita populacije vuka Bosne i Hercegovine .....	35
5.3.1. Detekcija nultih alela .....	35
5.3.2. Analiza genetičke varijabilnosti .....	36
5.3.3. Analiza strukturiranosti populacije vuka Bosne i Hercegovine .....	36
5.3.4. Određivanje efektivne veličine populacije ( <i>Ne</i> ) .....	40
5.3.5. Detekcija prolaska populacije kroz genetičko usko grlo .....	40
5.3.6. Analiza srodstva .....	41
5.4. Statistička analiza podataka o varijabilnosti mitohondrijalne DNK populacije vuka Bosne i Hercegovine .....	43
5.4.1. Poređenje i analiziranje sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK vuka ...	43
5.4.2. Filogeografska analiza na osnovu mtDNK haplotipova vuka .....	43
5.4.3. Rekonstrukcija demografskih promjena populacije vuka Evrope.....	45
6. REZULTATI .....	47
6.1. Varijabilnost mikrosatelita populacije vuka Bosne i Hercegovine .....	48

6.1.1. Genetička varijabilnost populacije vuka Bosne i Hercegovina .....	48
6.1.2. Strukturiranost populacije vuka Bosne i Hercegovine .....	50
6.1.3. Analiza srodstva .....	61
6.1.4. Efektivna veličina populacije ( $N_e$ ) i detekcija prolaska populacije vuka Bosne i Hercegovine kroz genetičko usko grlo .....	63
6.2. Strukturiranost populacije vuka Bosne i Hercegovine u dinarsko - balkanskom kontekstu .....	65
6.3. Varijabilnost kontrolnog regiona mitohondrijalne DNK populacije vuka Bosne i Hercegovine .....	77
6.3.1. Genetički diverzitet vuka na osnovu varijabilnosti kontrolnog regiona mtDNK .....	77
6.3.2. Filogeografska analiza mtDNK haplotipova vuka .....	78
6.3.3. Rekonstrukcija demografskih promjena vuka .....	84
7. DISKUSIJA .....	88
7.1. Genetička varijabilnost populacije vuka Bosne i Hercegovine .....	90
7.2. Populaciona struktura i filogeografija vuka .....	93
7.3. Rekonstruisanje demografske istorije vuka na evropskom nivou.....	101
7.4. Implikacije za konzervaciju i monitoring populacije vuka Bosne i Hercegovine ....	106
8. ZAKLJUČAK .....	108
9. PRILOZI .....	111
Prilog 1 .....	111
Prilog 2 .....	112
Prilog 3 .....	114
Prilog 4 .....	127
Prilog 5 .....	128
10. LITERATURA .....	135

## Lista ilustracija

<b>Slika 1.</b> Vuk ( <i>Canis lupus</i> ). Lokalitet: Kupreška rijeka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina (fotozapis sa Bushnell Trophy Cam kamere; Rufford Small Grant projekat) .....	9
<b>Slika 2.</b> Čopor. Lokalitet: Janj, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina (fotozapis sa Bushnell Trophy Cam kamere; Rufford Small Grant projekat).....	10
<b>Slika 3.</b> Distribucija vuka u Evropi (modifikovano iz Chapron i sar., 2014).....	19
<b>Slika 4.</b> Karta lokaliteta sakupljenih i analiziranih uzoraka vuka ( <i>Canis lupus</i> ) sa područja Bosne i Hercegovine .....	30
<b>Slika 5.</b> a) Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K=2$ ) u populaciji vuka Bosne i Hercegovine detektovanih u STRUCTURE analizi na osnovu najviših srednjih vrijednosti posterior vjerovatnoća ( $\ln Pr(X K)$ ) i $\Delta K$ metode b) Grafički prikaz distribucije jedinki u detektovanim genetičkim klasterima na osnovu srednjih vrijednosti pripadnosti jedinki određenom klasteru ( $q$ koeficijent; $q \geq 0,8$ ).....	51
<b>Slika 6.</b> Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K=2$ ) u populaciji vuka Bosne i Hercegovine detektovanih u TESS analizi na osnovu najnižih vrijednosti DIC .....	52
<b>Slika 7.</b> Grafički prikaz pripadnosti jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine pretpostavljenim genetičkim klasterima u TESS analizi, primjenom sva tri modela srodnosti jedinki (redno: BYM, CAR i No Admixture modeli) na osnovu srednjih vrijednosti pripadnosti jedinki određenom genetičkom klasteru ( $q$ koeficijent; $q \geq 0,8$ ) .....	53
<b>Slika 8.</b> Interpolirane log - likelihood vjerovatnoće pripadnosti jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine pretpostavljenim genetičkim klasterima (redno: BYM, CAR i No Admixture modeli). Svjetliji dijelovi na mapi označavaju pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru; na mapama koje se nalaze na lijevoj strani slike svjetli dijelovi označavaju pripadnost jedinki vuka istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine jednom genetičkom klasteru, a na desnoj strani pripadnost jedinki vuka ostatka navedenog područja drugom genetičkom klasteru .....	54

<b>Slika 9.</b> Broj pretpostavljenih genetičkih klastera u populaciji vuka Bosne i Hercegovine detektovanih primjenom a) uncorrelated i b) correlated modela korelacije alela u GENELAND analizi .....	55
<b>Slika 10.</b> Distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u pretpostavljene genetičke klastere (K=5) detektovane Geneland analizom, primjenom correlated modela frekvencije alela. Svjetliji dijelovi na mapi označavaju veću pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru.....	56
<b>Slika 11.</b> Distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u pretpostavljene genetičke klastere (K=2) detektovane Geneland analizom, primjenom uncorrelated modela frekvencije alela. Svjetliji dijelovi na mapi označavaju veću pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru .....	57
<b>Slika 12.</b> a) Broj pretpostavljenih genetičkih klastera (K=2) u populaciji vuka Bosne i Hercegovine detektovanih primjenom funkcije find.clusters u DAPC analizi na osnovu najnižih vrijednosti BIC b) pripadnost jedinki vuka Bosne i Hercegovine genetičkim klasterima c) jedinke u admiksiji .....	58
<b>Slika 13.</b> a) Rezultati sPCA analize i detekcija globalne i/ili lokalne strukture u populaciji vuka Bosne i Hercegovine b) statistička značajnost uočenih rezultata .....	59
<b>Slika 14.</b> a) Distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u dva pretpostavljena genetička klastera detektovana u sPCA analizi. Veća razlika u veličini, odnosno, boji kvadratića, ukazuje na veću diferencijaciju među jedinkama b) Intropolirana mapa distribucije jedinki .....	60
<b>Slika 15.</b> Prikaz punih srodnika u populaciji vuka Bosne i Hercegovine .....	62
<b>Slika 16.</b> a) Broj pretpostavljenih genetičkih klastera (K=2) u dinarsko - balkanskoj populaciji vuka detektovanih u STRUCTURE analizi na osnovu najviših srednjih vrijednosti posterior vjerovatnoća $\ln Pr(X K)$ i $\Delta K$ metode b) Grafički prikaz distribucije jedinki u genetičkim klasterima na osnovu srednjih vrijednosti pripadnosti jedinki određenom klasteru ( $q$ koeficijent; $q \geq 0.8$ ). Bijela boja u grafikonu predstavlja pripadnost jedinki vuka jednom genetičkom klasteru, a plava boja pripadnost jedinki vuka drugom genetičkom klasteru. Jedinke koje imaju $q < 0,8$ se smatraju jedinkama u admiksiji .....	66
<b>Slika 17.</b> Broj pretpostavljenih genetičkih klastera (K=2) u dinarsko - balkanskoj populaciji	

vuka, detektovanih u TESS analizi na osnovu najnižih vrijednosti DIC...

67

**Slika 18.** Grafički prikaz distribucije jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka u pretpostavljene genetičke klastere detektovane TESS analizom, primjenom sva tri modela srodnosti jedinki (redno: BYM, CAR i No Admixture modeli), na osnovu srednjih vrijednosti pripadnosti jedinki određenom genetičkom klasteru ( $q$  koeficijent;  $q \geq 0,8$ ). Bijeli dio grafikona predstavlja pripadnost jedinki vuka jednom genetičkom klasteru, a plavi dio grafikona predstavlja pripadnost jedinki vuka drugom genetičkom klasteru. Jedinke koje imaju  $q < 0,8$  se smatraju jedinkama u admiskiji .....

68

**Slika 19.** Interpolirane log-likelihood vjerovatnoće pripadnosti jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka u pretpostavljene genetičke klastere (redno: BYM, CAR i No Admixture modeli). Svjetliji dijelovi na mapi označavaju veću pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru; na mapama na lijevoj strani slike svjetli dijelovi označavaju pripadnost jedinki vuka Bosne i Hercegovine jednom genetičkom klasteru, a na desnoj strani pripadnost jedinki vuka Srbije drugom genetičkom klasteru .....

69

**Slika 20.** Broj pretpostavljenih genetičkih klastera detektovanih u GENELAND analizi primjenom a) uncorrelated ( $K=2$ ) i b) correlated ( $K=5$ ) modela korelacije alela za dinarsko - balkansku populaciju vuka .....

70

**Slika 21.** Distribucija jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka u detektovane genetičke klastere primjenom a) uncorrelated ( $K=2$ ) i b) correlated ( $K=5$ ) modela korelacije alela u GENELAND analizi. Svjetliji dijelovi na mapi označavaju pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru. Na slici pod a - na mapi sa lijeve strane slike svjetli dijelovi označavaju pripadnost jedinki vuka Bosne i Hercegovine jednom genetičkom klasteru, a na desnoj strani pripadnost jedinki vuka Srbije drugom genetičkom klasteru .....

71

**Slika 22.** a) Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K=2$ ) u dinarsko - balkanskoj populaciji vuka na osnovu najnižih vrijednosti BIC, detektovanih primjenom funkcije `find.clusters` u DAPC analizi b) pripadnost jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka pretpostavljenim genetičkim klasterima; genetički klasteri su predstavljeni različitim bojama .....

73



<b>Slika 23.</b> a) Rezultati sPCA analize za detekciju globalne/lokalne strukture dinarsko - balkanske populacije vuka b) statistička značajnost uočenih rezultata .....	74
<b>Slika 24.</b> a) Distribucija jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka u dva pretpostavljena genetička klastera. Veća razlika u veličini, odnosno, boji kvadratića, ukazuje na veću diferencijaciju među jedinkama b) Intropolirana mapa distribucije jedinki.....	75
<b>Slika 25.</b> Distribucija haplotipova vuka ( <i>Canis lupus</i> ) evropskog seta podataka u dvije haplogrupe: haplogrupu 1 i haplogrupu 2. Veličina kruga odražava brojnost jedinki po haplotipu. Mutacioni koraci između detektovanih haplotipova predstavljeni su kosim, kratkim linijama koje se nalaze na punim linijama koje povezuju haplotipove .....	79
<b>Slika 26.</b> Zastupljenost svih detektovanih haplotipova vuka u okviru proučavane države/regije na nivou Evrope .....	81
<b>Slika 27.</b> Distribucija haplotipova mtDNK vuka koji su zastupljeni u Bosni i Hercegovini, a detektovani su i u Evropi .....	82
<b>Slika 28.</b> Bajesovo filogenetsko stablo mtDNK haplotipova jedinki vuka ( <i>Canis lupus</i> ) na evropskog seta podataka sa posterior vjerovatnoćama .....	83
<b>Slika 29.</b> Grafici mismatch distribucije a) evropskog seta podataka i b) definisanih haplogrupa vuka Evrope. Na x-osi je prikazan prosječan broj nukleotidnih razlika (pairwise differences, engl.); na y-osi prikazana je frekvencija prosječnog broja nukleotidnih razlika .....	86
<b>Slika 30.</b> Bajesovi skyline grafikoni a) haplogrupe 2 i b) haplogrupe 1 vuka na području Evrope. Na x - osi je prikazano vrijeme ekspanzije haplogrupa u godinama, a na y - osi je prikazana efektivna veličina populacije .....	87

## Lista tabela

<b>Tabela 1.</b> <i>Uslovi multipleks PCR amplifikacije 19 lokusa komercijalnog kita - The Canine Genotypes<sup>TM</sup> Panel 1.1 .....</i>	33
<b>Tabela 2.</b> <i>Uslovi PCR amplifikacije dijela kontrolnog regiona mtDNK .....</i>	34
<b>Tabela 3.</b> <i>Parametri koji su primjenjeni u analizi prostorne strukture genetičke varijabilnosti u STRUCTURE, TESS i GENELAND programskim paketima .....</i>	38
<b>Tabela 4.</b> <i>Vrijednosti osnovnih genetičkih parametara populacije vuka (Canis lupus) Bosne i Hercegovine utvrđene analizom polimorfnosti mikrosatelita.....</i>	49
<b>Tabela 5.</b> <i>Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za detektovane genetičke klastere u populaciji vuka Bosne i Hercegovine.....</i>	61
<b>Tabela 6.</b> <i>Rezultati bottleneck analize za populaciju vuka Bosne i Hercegovine za IAM, TPM i SMM modele mutacija i vrijednosti wilcoxon testa .....</i>	64
<b>Tabela 7.</b> <i>Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za dinarsko - balkansku populaciju vuka.....</i>	76
<b>Tabela 8.</b> <i>Distribucija haplotipova i parametri genetičkog diverziteta kontrolnog regiona mtDNK populacije vuka Bosne i Hercegovine.....</i>	77
<b>Tabela 9.</b> <i>Osnovni parametri genetičkog diverziteta definisanih haplogrupa vuka (Canis lupus) evropskog seta podataka.....</i>	84
<b>Tabela 10.</b> <i>Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za definisane haplogrupe vuka (Canis lupus) evropskog seta podataka.....</i>	84
<b>Tabela 11.</b> <i>Rezultati testova neutralnosti i mismatch analize sekvenci kontrolnog regiona mtDNK vuka (C. lupus) evropskog seta podataka i definisanih haplogrupa.....</i>	85

## Lista priloga

<b>Prilog 1.</b> <i>The Canine Genotypes™ Panel 1.1 kit (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) .....</i>	111
<b>Prilog 2.</b> <i>Uzorci vuka Srbije koji su analizirani zajedno sa uzorcima vuka Bosne i Hercegovine u cilju detekcije prostornog obrasca genetičke varijabilnosti primjenom mikrosatelita u dinarsko - balkanskom kontekstu, a nisu prethodno analizirani .....</i>	112
<b>Prilog 3.</b> <i>I) Lista sekvenci kontrolnog regiona mtDNK vuka (Canis lupus) produkovanih u predstavljenom istraživanju i pripadnost određenom haplotipu i haplogrupi. II) Tabela haplotipova i broj sekvenci kontrolnog regiona mtDNK vuka (Canis lupus) Evropskog seta podataka preuzetih iz Banke Gena. ....</i>	114
<b>Prilog 4.</b> <i>Vrijednosti osnovnih genetičkih parametara vuka (Canis lupus) Bosne i Hercegovine detektovane analizom genetičke varijabilnosti 18 mikrosatelitskih lokusa .....</i>	127
<b>Prilog 5.</b> <i>Distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u dva pretpostavljena genetička klastera nakon sprovedenih analiza u sljedećim programskim paketima: Structure, Tess, DAPC; distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u konsenzus klasterima .....</i>	128

## Lista skraćenica

<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction (lančana reakcija polimeraze)</i>
<b>DNK</b>	<i>Dezoksiribonukleinska kiselina</i>
<b>STR</b>	<i>Short Tandem Repeat (kratki tandemski ponovci)</i>
<b>SSR</b>	<i>Simple Sequence Repeat (jednostavne ponavljajuće sekvence)</i>
<b>VNTR</b>	<i>Variable Number of Tandem Repeat (promjenjliv broj tandemskih ponovaka)</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate (natrijum dodecil sulfat)</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid (etidijum diamid tetrasirćetna kiselina)</i>
<b>Tris</b>	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris (hidroksimetil) aminoetan)</i>
<b>TE</b>	<i>Tris-EDTA</i>
<b>dNTPs</b>	<i>Deoxynucleotidetriphosphates (deoksinukleotid trifosfati)</i>
<b>TAE</b>	<i>Tris Ais EDTA</i>
<b>Taq</b>	<i>DNK polimeraza <i>Termus Aquaticus</i></i>
<b>MCMC</b>	<i>Marcov Chain Monte Carlo (Monte Karlo Markov lanac)</i>

# 1. UVOD

Vuk (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) predstavlja karnivornu i visoko mobilnu vrstu sa holarktičkom rasprostranjenošću, koja obuhvata različite tipove staništa, od tundri i tajgi na sjeveru do pustinja na jugu (Peters i Mech, 1975, Randi 2011), što se može objasniti velikom ekološkom fleksibilnošću vrste. Vuk se pojavio prije oko milion godina u Pleistocenu, najvjerojatnije u Evroaziji, odakle je preko Beringovog kopnenog mosta migrirao u Sjevernu Ameriku prije oko 750 000 godina (Kurten, 1968), te na taj način, već u kasnom Pleistocenu, postao kopnena vrsta sisara sa najširoom distribucijom (Kurtén i Anderson, 1980, Mech 1966, 1970). Konflikta sa ljudima zbog straha čovjeka za sopstvenu sigurnost, kompeticije za plijen sa lovcima i opasnosti za stoku uticali su na masovne i nemilosrdne progone vrste, naročito tokom 18. i 19. vijeka, što je posljedično dovelo do rapidnog opadanja brojnosti u Evropi, a u nekim područjima i istrebljenja vrste. Progon je naročito bio intenzivan na prostoru zapadne i centralne Evrope, gdje su preživjele samo male, izolovane populacije na Iberijskom i Apeninskom poluostrvu (Breitenmoser, 1998). U južnoj i istočnoj Evropi lovni pritisak na vuka bio je znatno manji tako da je vuk opstao na daleko širem prostoru, prije svega, Karpata, Dinarida i Balkanskih planina (Mech i Boitani, 2004). Nestanak vuka na većem dijelu njegovog istorijskog areala ostavio je značajne posljedice na strukturu i funkcionisanje ekosistema koje je vrsta prethodno naseljavala (Ripple i sar., 2014). Fragmentacija staništa usljed širenja poljoprivrednih površina i krčenje šuma, primarnog staništa vuka (Peters i Mech, 1975, Carbyn i Trottier, 1987, Voigt i Berg, 1987), faktori su koji su, pored gore navedenih, takođe uticali na smanjenje veličine populacija (Delibes, 1990) što je rezultiralo geografskom i genetičkom izolovanošću populacija koje su preživjele (Ginsberg i Macdonald, 1990, Wayne i sar., 1992) i bitno je uticalo na opadanje njihove genetičke varijabilnosti (Randi i sar., 1995, Ellegren, 1999).

U posljednjim decenijama razvijen je veliki broj genetičkih markera koji su našli primjenu u populaciono - genetičkim istraživanjima i omogućili da značajno poboljšamo saznanja o ekologiji, raznovrsnosti, evoluciji i filogeografskoj istoriji ove karnivorne vrste (Ersmark i sar., 2016). Najčešće primjenjivani genetički markeri u istraživanju populacione genetike vuka su mikrosateliti i mitohondrijalna DNK, pomoću kojih se nastoji utvrditi genetička varijabilnost i struktura populacija, protok gena između populacija, ukrštanje u srodstvu, efekat uskog grla, te filogenija i filogeografija vrste (Hindrikson i sar., 2016). Populaciona diferencijacija i genetička varijabilnost vuka najčešće su analizirani primjenom autozomalnih

mikrosatelita pri čemu je utvrđena jasna struktura vrste na nivou Evrope. Čak i na regionalnom nivou, u odsustvu velikih geografskih barijera, registrovano je postojanje lokalnih struktura, što se tumači uticajem ekoloških faktora, razlikom u plijenu, vrstom predjela, te razlikom u staništu (Pilot i sar., 2010, Muñoz-Fuentes i sar., 2009, Czarnomska, 2013). Iako su sprovedena brojna istraživanja na evropskom nivou, ostale su populacije koje nisu dovoljno istražene, među kojima se nalazi i dinarsko - balkanska populacija, čiji centralni dio naseljavaju vukovi Bosne i Hercegovine. Dosadašnja molekularno - genetička istraživanja sprovedena u okviru ove populacije ukazuju na postojanje lokalne genetičke strukture koja bi mogla imati značaja za buduće upravljanje i zaštitu vuka na ovom prostoru (Djan i sar., 2014). S obzirom da dinarsko - balkanska populacija vuka predstavlja važan izvor genetičke varijabilnosti za susjedne populacije (Fabbri i sar., 2014, Pilot i sar., 2010, Ražen i sar., 2016), neophodno je izvršiti obimnija istraživanja ove populacije. Filogeografske studije koje su podrazumijevale analizu sekvenci dijela kontrolnog regiona mitohondrijalne DNK (CR-1 mtDNK) vuka pokazale su da ne postoji jasan alopatrijski obrazac distribucije haplotipova na prostoru čitavog areala (Randi, 2011) te da se haplotipovi iz Evrope, Azije i Amerike ne mogu razdvojiti u različite genetičke klustere (Vilà i sar., 1999). Ipak, uočava se prisustvo strukture na lokalnom nivou, što je najvjerojatnije posljedica skorašnje restrikcije protoka gena (Pilot i sar., 2006, 2010). Pilot i sar. (2010) navode da se na nivou Evrope uočava distribucija haplotipova vuka u dvije haplogupe koje se razlikuju u frekvenciji haplotipova, ali se prostorno preklapaju. Filogenetička struktura vuka na globalnom nivou može predstavljati posljedicu posljednjeg glacijalnog maksimuma koji je dostigao svoj vrhunac u Pleistocenu. Promjene tokom ovog perioda uticale su na geografsku distribuciju, demografsku dinamiku i genetičku varijabilnost biljnih i životinjskih populacija (Hewitt, 2004, Stewart, 2010).

Vuk predstavlja ključnu vrstu za funkcionisanje i opstanak stabilnog ekosistema. Najbolji primjer prethodno navedenog predstavlja primjer reintrodukcije vukova u nacionalni park *Yellowstone* (Sjedinjene Američke Države). U cilju oporavka narušenog ekosistema nacionalnog parka vrsta je nakon 70 godina odsustva uzrokovanog uglavnom antropogenim aktivnostima vraćena na ovaj prostor. Nakon reintrodukcije zapaženi su efekti koji su iznenadili naučnike, jer je primjećeno da su vukovi imali izuzetno važnu ulogu u oporavku navedenog ekosistema, što je naknadno uočeno i u drugim svjetskim prirodnim rezervatima. Nakon reintrodukcije, uočene su kaskadne promjene u ekosistemu. Redukcijom brojnosti

biljojeda (dominantno krupnih ungulata) vukovi su doprinijeli oporavku travnatih područja, povećanju brojnosti drugih životinja, pa čak i smanjenju erozije tla, te izmjeni tokova rijeka usljed bujanja priobalne vegetacije. Primjer iz nacionalnog parka *Yellowstone* jasno ukazuje na tzv. kišobran efekat koji vuk ima u očuvanju drugih životinja, njihovih zajednica, ali i ekosistema u cjelini. Upravo zbog potrebe da se očuva stabilnost ekosistema koje vuk naseljava, neophodno je sprovesti posebne mjere aktivne zaštite ove harizmatične krupne karnivore. Zbog prethodno navedenog, u mnogim evropskim zemljama tokom 20. vijeka počeli su da se sprovedu programi monitoringa i zaštite vuka (Boitani i Paquet, 2009, Chapron i sar., 2014), pri čemu su za kreiranje globalne konzervacione strategije (Linell i sar., 2007) i monitoring lokalnih populacija (Caniglia i sar., 2010) korišćene genetičke informacije. Sprovedeni programi zaštite doveli su do uspješnog oporavka vrste u većini evropskih zemalja (Chapron i sar., 2014).

U Bosni i Hercegovini, za koju je evidentirano opadanje brojnosti od strane Zavoda za statistiku i Lovačkog saveza Bosne i Hercegovine, a dodatno potvrđeno preliminarnim genetičkim analizama (Boitani, 2000, Djan i sar., 2014, Šnjegota i sar., 2016), vuk i dalje predstavlja nezaštićenu lovnu divljač. Vukovi Bosne i Hercegovine su veoma malo istraženi u prethodnim studijama (Trbojević, 2015) i pored toga što predstavljaju centralnu subpopulaciju dinarsko - balkanske populacije vuka koja ima izuzetan značaj u povezivanju susjednih populacija. Iz navedenih razloga neophodno je izvršiti detaljniju genetičku karakterizaciju vukova Bosne i Hercegovine. Prethodno navedeno iniciralo je nastavak započetih molekularno - genetičkih istraživanja koja su podrazumijevala povećavanje veličine uzorka i proširivanje teritorije uzorkovanja, sa ciljem dobijanja rezultata koji su neophodni za uspostavljanje održivog menadžmenta vrste i kreiranja plana zaštite vuka Bosne i Hercegovine, ali i dinarsko - balkanske populacije u cjelini.



# 2. PREGLED LITERATURE



## 2.1. VUK

Vuk, *Canis lupus* Linnaeus, 1758 se prema biološkoj klasifikaciji svrstava u klasu sisara (Mammalia), red zvijeri (Carnivora), porodicu mesojeda (Canidae), rod *Canis*. Pored njega, u porodici Canidae nalaze se pored ostalih i: lisica, kojot, šakal, afrički divlji pas i australijski divlji pas dingo. Prema literaturnim navodima vuk ima 32 podvrste, među kojima je pet podvrsta izumrlo (Mech, 2001), a među podvrstama koje danas imaju najveće rasprostranjenje u prirodi su: *Canis lupus lupus* Linnaeus, 1758 (evroazijski vuk), *Canis lupus albus* Kerr, 1972 (tundra vuk), *Canis lupus campestris* Dwigubski, 1804 (stepski vuk) i *Canis lupus pallipes* Sykes, 1831 (indijski vuk) (Wilson i Reeder, 2005). Ranije opisana podvrsta *C. l. kurjak* (Bolkay, 1925) sa prostora Bosne i Hercegovine nije danas prihvaćena od strane vodećih taksonoma Wilson i Reeder (2005) koji navedenu podvrstu tretiraju kao jedan od brojnih sinonima nominotipske podvrste.

Prvi članovi podporodice Caninae, prema određenim autorima, su se pojavili tokom ranog Oligocena (prije oko 30 miliona godina) u Sjevernoj Americi, dok drugi pretpostavljaju da su se prvi predstavnici pojavili u Evropi i Sjevernoj Americi još tokom srednjeg Eocena (prije oko 35 miliona godina) (Figueirido i sar., 2015). Smatra se da se najstarija vrsta roda *Canis*, *C. lepophagus*, pojavila tokom ranog Pliocena u Sjevernoj Americi (Cherin i sar., 2013). Nesuglasice o vremenu pojave prvih *Caninae*-a javljaju se zbog nedovoljno istraženih fosilnih nalaza iz perioda kasnog Miocena i ranog Pliocena (Morales i Aguirre., 1976), te iz istog razloga određeni paleontolozi smatraju da je diverzitet podporodice *Caninae* tokom Pliocena u Holarktičkom području bio veći od dokumentovanog (Cherin i sar., 2013).

Prvi, pravi evropski predstavnik roda *Canis*, vrsta *C. estruscus*, pojavio se prije oko 1,8 miliona godina istovremeno sa promjenama faune koje su desile u tom periodu. Tokom tranzicije iz srednjeg u kasni *Villafranchian*<sup>1</sup> dešava se tzv. *wolf - event*<sup>2</sup> (Cherin i sar., 2013), a neki nalazi ukazuju da se *wolf - event* desio u Kini čak prije oko 3 miliona godina, tokom kasnog *Villafranchian*-a.

---

<sup>1</sup>*Villafranchian* je geološki period (3,5-1 milion godina) koji se preklapao sa završetkom Pliocena i početkom Pleistocena. Značajnost ovog perioda ogleda se u evoluciji najranijih hominida u modernog čovjeka - *australopitekus* (*Australopithecus*, lat.). Pored toga, u ovom periodu evoluirale su brojne životinjske vrste i njihovi preci, kao što su npr.: crvena lisica, mala (riđa) lasica, barska koka, Tuscany jaguar.

<sup>2</sup>*Wolf-event* predstavlja događaj koji označava evolucionu ekspanziju roda *Canis* u Evroaziji, tokom ranog Pleistocena, prije oko 1,8 miliona godina. Povezan je sa procesima formiranja mamutovskih stepa i kontinentalne glacijacije.



Stoga, opšte prihvaćeno mišljenje je da ovaj događaj nije bio trenutni, već je vremenski trajao i bio je praćen brojnim uzastopnim disperzijama. Najnoviji podaci ukazuju na prisustvo dvije vrste roda *Canis* tokom ranog Pleistocena u Evropi: *C. arnensis* (Francuska, Španija) i *C. estruscus* (Grčka). Za navedene vrste se zna da predstavljaju razvojne linije šakala, odnosno, vuka, ali evolutivna povezanost između navedenih vrsta još uvijek je nejasna (Cherin i sar., 2013). Evropske karnivorne vrste su tokom ranog Pleistocena doživjele ekspanziju u odnosu na ostale vrste sisara. Ipak, u srednjem Pleistocenu počeo je da jača uticaj roda *Homo* što se reflektovalo u smanjenju diverziteta roda *Canis*, te je u tom periodu umjesto dvije vrste sa početka epohe, preostala jedna, široko rasprostranjena vrsta *C. mosbachensis* (Von Koenigswald, 2003) koja je direktno evoluirala u vrstu *C. lupus*. Prema Kurtenu (1968) prvi vukovi (*C. lupus*) su se vjerovatno pojavili u Evroaziji, prije oko milion godina, u periodu između srednjeg i kasnog Pleistocena. U navedenom periodu Evroazija je bila povezana sa Sjevernom Amerikom Beringovim kopnenim mostom<sup>3</sup>, preko koga je vrsta, prije oko 750 000 godina, migrirala u Sjevernu Ameriku i na taj način postala kopnena vrsta sisara sa najširoom distribucijom u kasnom Pleistocenu (Kurtén i Anderson, 1980, Mech 1966, 1970).

Holarктиčka rasprostranjenost vuka u prošlosti podrazumijevala je njegovo prisustvo u različitim tipovima staništa, od tundri i tajgi na sjeveru do pustinja na jugu (Peters i Mech, 1975, Randi, 2011) što se može objasniti velikom ekološkom fleksibilnošću vrste. Osim toga vukovi mogu tokom života prelaziti velika geografska rastojanja. U Skandinaviji su dokumentovane jedinice koje su tokom života prelazile distance u rasponu od 200 do 1000 km, a u sjevernoj Americi od 500 do 900 km (Fritts, 1983, Mech i sar., 1995, Wabakken i sar., 2001, Walton i sar., 2001). Vukovi prelaze ogromna rastojanja iz tri osnovna razloga: kompeticije za prirodne resurse, kompeticije za partnera, te izbjegavanja ukrštanja u srodstvu. Postoje podaci (Nelson i Mech, 1984, Person i sar., 1996) da su sposobni prevazići i vodene barijere i da mogu plivati i do 4 km da bi se domogli kopna ili plijena.

Danas, vukovi naseljavaju široko rasprostranjena staništa umjerene i hladne klimatske zone. Naseljavaju tundre, šume, planine i stepe cijele sjeverne hemisfere (sjever Azije, Evropa, Sjeverna Amerika), te na taj način pokazuju mogućnost adaptacije na različite klimatske i

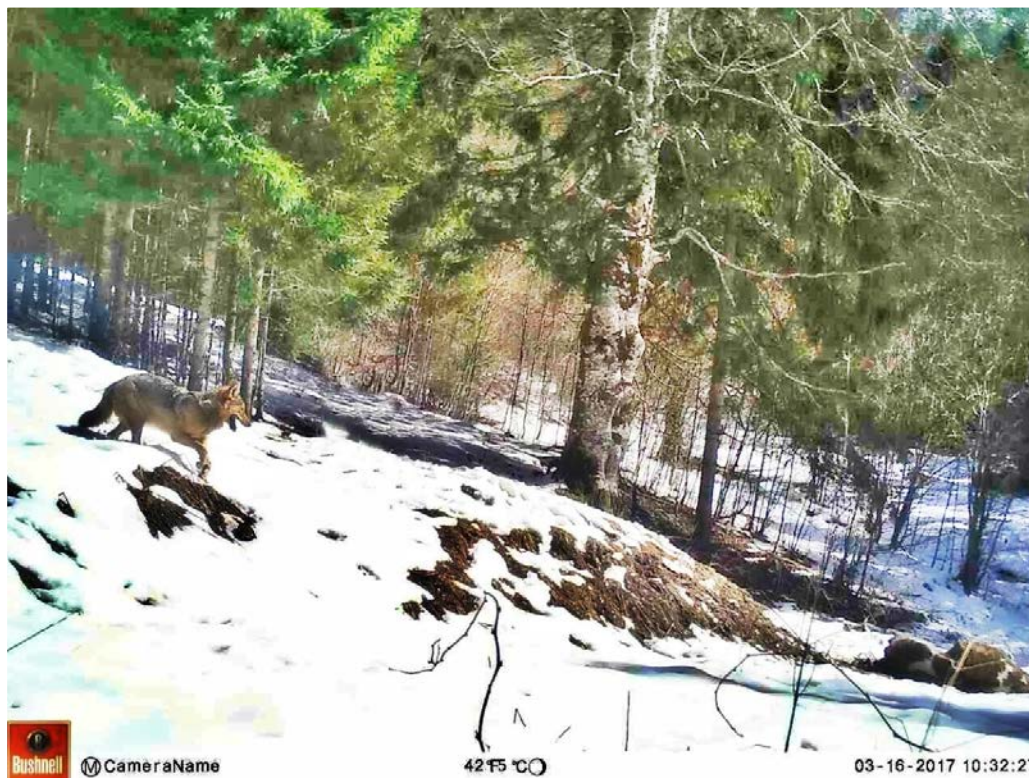
---

<sup>3</sup>Beringov kopneni most ili Beringija predstavlja potopljeni kopneni most koji je postojao u Pleistocenu, tokom posljednjeg ledenog doba i povezivao je Sjevernu Ameriku i Aziju. Preko njega su se prije 10 000 godina prvi ljudi naselili u Sjevernu Ameriku. Nije poznata precizna putanja kojom su se kretali iz razloga što su svi arheološki i drugi tragovi potopljeni. završetka ledenog doba i podizanja nivoa mora.

ostale uslove spoljašnje sredine. Nisu prisutni samo u zonama tropskih kišnih šuma i pustinja. Smatra se da ove biomske oblasti predstavljaju fizičke barijere za njihov prodor u južnu hemisferu (Butzeck i sar., 1988). Prema IUCN-u vuk ne spada u kategoriju ugroženih vrsta, ali ipak postoje lokalne populacije koje su još uvijek ugrožene.

Na području evropskog kontinenta, u 28 evropskih zemalja, prema Chapron i sar. (2014), prisutno je oko 12000 vukova, na teritoriji preko 8000000 km<sup>2</sup>. Od toga, oko 3900 jedinki naseljava područje Dinarida smještenih na jugu Evrope, u zapadnom dijelu Balkanskog poluostrva. Ove jedinke formiraju dinarsko - balkansku populaciju vuka. Ovoj velikoj evropskoj populaciji pripadaju i vukovi sa teritorije Bosne i Hercegovine (Chapron i sar. 2014). Hindrikson i sar. (2016) navode da je dinarsko - balkanska populacija bila izolovana više od jednog vijeka, te da vjerovatno sadrži značajan dio genetičke varijabilnosti koja je u prošlosti bila prisutna u široko rasprostranjenoj evropskoj populaciji (Gomerčić i sar., 2010, Djan i sar., 2014, Fabbri i sar., 2014, Moura i sar., 2014, Pilot i sar., 2010). Pored toga, uočeno je da ima veoma važnu ulogu u rekolonizaciji susjednih populacija (Fabbri i sar., 2014, Pilot i sar., 2010, Ražen i sar., 2016). Činjenica da je Balkan bio jedan od glavnih refugijuma tokom posljednjeg ledenog doba u potpunosti opravdava potrebu da se detaljnije istraži ova evropska populacija. I pored svega navedenog genetička struktura dinarsko - balkanske populacije vuka nije u potpunosti istražena, a među najmanje istraženima su vukovi sa teritorije Bosne i Hercegovine, koji zauzimaju centralnu poziciju u okviru navedene populacije. Areal vuka u Bosni i Hercegovini obuhvata čitav planinski pojas Dinarida. Na sjeveru zemlje prisutan je samo sporadično ili u potpunosti odsustvuje (Sofradžija i Muzaferović, 2007, Chapron i sar. 2014, Trbojević, 2015). Dokumentovani protok gena između subpopulacija na prostoru čitavog Balkanskog poluostrva ukazuje da oni pripadaju istoj – dinarsko - balkanskoj populaciji (Štrbenac i sar. 2005, 2008, Gomerčić i sar. 2010, Moura i sar., 2014; Pilot i sar., 2006, 2010). Neusaglašenost o brojnosti vukova na teritoriji Bosne i Hercegovine (350 jedinki Lovački Savez Bosne i Hercegovine; 400 jedinki (Boitani, 2000, Milenković i sar., 2007); 650 jedinki (Chapron i sar., (2014)) proističe zbog nepostojanja kontinuiranog monitoringa i istraživanja ove populacije. Nekoliko autora (Boitani, 2000, Djan i sar., 2014, Trbojević, 2015, Šnjegota i sar., 2016) uočilo je pad brojnosti navedene populacije i potencijalnu diferencijaciju (substrukturiranje). I pored evidentnog pada brojnosti ne postoje napori da se upravljačkim i/ili konzervacionim mjerama zaštiti i oporavi populacija vuka u Bosni i Hercegovini.

Vuk (Sl. 1) predstavlja, poslije smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*), najvećeg kopnenog predatora u Evropi. S obzirom da ima širok areal i naseljava različita staništa, odlikuje ga izuzetan fenotipski diverzitet u pogledu veličine tijela, mase i boje krzna (Mech, 1970, Boitani, 1995, 2000).



Slika 1. Vuk (*Canis lupus*). Lokalitet: Kupreška rijeka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina (fotozapis sa Bushnell Trophy Cam kamere; Rufford Small Grant projekat - *The Grey Wolf Conservation in Bosnia & Herzegovina: The Next Step*)

Prosječna dužina tijela vuka iznosi od 1 do 1,6 m (od glave do repa); dužina repa od 30 do 50 cm. Visina ramena se kreće između 65 i 80 cm, s tim da su ženke sitnije u odnosu na mužjake. Tjelesna masa varira između 20 i 80 kg kod mužjaka, odnosno, 18 i 50 kg kod ženki. Veoma dobro su im razvijena čula sluha, mirisa i vida. Najkrupnije jedinice naseljavaju Arktička područja, a krenuvši ka jugu smanjuje im se veličina tijela što predstavlja adaptaciju na specifične klimatske uslove (Bergmanovo ekogeografsko pravilo). Maksimalan životni vijek im je oko 16 ljudskih godina (Mech i Boitani, 2003). Vuk u divljini vodi socijalni način života; živi u grupama - čoporima (Sl. 2) koji se sastoje od 2 do 36 jedinki koje saraduju u lovu, reprodukciji i odbrani teritorije. U osnovi, čopor je porodica koju je formirao

reproduktivni par (alfa mužjak i ženka), a pored njih tu se nalaze i mladunci i nekoliko odraslih jedinki koji predstavljaju potomke reproduktivnog para iz prethodnih godina (Mech, 1970, Rothman i Mech, 1979).



**Slika 2.** Čopor. Lokalitet: Janj, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina (fotozapis sa Bushnell Trophy Cam kamere; Rufford Small Grant projekat - *The Grey Wolf Conservation in Bosnia & Herzegovina: The Next Step*).

Stabilnost i dinamiku čopora reguliše stroga hijerarhija; alfa par je visoko pozicioniran, koordiniše svaku aktivnost čopora i ima najveću privilegiju prilikom ishrane i reprodukcije. Alfa ženka je jedina ženka u čoporu koja se pari. Ona agresivnim ponašanjem sprječava ostale ženke da se pare (Olson, 1938, Murie, 1944, Young i Goldman, 1944). Vukovi postaju reproduktivno sposobni u životnoj dobi od dvije godine starosti. Pare se jednom godišnje (Fritts i Mech, 1981, Mech i Hertel, 1983, Mech, 1995) u periodu od januara do aprila, što zavisi od klimatske zone koju naseljavaju (Rosenzweig, 1968). Estrusni ciklus ženki traje 5 do 7 dana, a bremenitost oko 2 mjeseca, nakon čega okote od 1 do 11 mladunčadi o kojima brine cijeli čopor (Mech, 1970, 1973, Mech i Hertel, 1983, Stahler i sar., 2002). Smatra se da su vukovi počeli da vode socijalan način života, praćen kooperativnošću u lovu, čuvanju i zaštiti

teritorije, te brizi o mladima, u periodu tokom tranzicije Miocena u Pliocen, istovremeno sa povećanjem veličine mozga grupe kojoj pripadaju (Cherin i sar., 2013).

Pored toga što vode socijalni način života, vukovi su izuzetno teritorijalne životinje (Mech, 1973, Mech i sar., 1988). Veličina teritorije može da im varira od 80 do 2500 km<sup>2</sup> (Sjeverna Amerika) ili od 100 do 500 km<sup>2</sup> (Evropa). Veličina teritorije zavisi od: veličine čopora (Mech, 1970, Peterson, Woolington i Bailey, 1984), gustine plijena (Walters i sar., 1981), vrste reljefa, geografskih i morfoloških karakteristika (Peterson, Woolington i Bailey, 1984, Peterson i Page, 1988), ali i antropogenog uticaja. Teritorija svakog čopora se stoga može smatrati malim ekosistemom (Haber, 1977). Svaki čopor ograničava svoju teritoriju markiranjem pomoću fecesa i urina (Eisenberg i Kleiman, 1972, Johnson i sar., 1972, Peters i Mech, 1975, Gosling, 1982, Doty, 1986). Ukoliko se desi kontakt između susjednih čopora dolazi do sukoba koji se ponekad završavaju smrtnim ishodom (Peters i Mech, 1975, Zimen, 1976, Harrington i Mech, 1979).

Ono što vukove dodatno izdvaja i čini posebnim u odnosu na većinu drugih životinjskih vrsta je način komunikacije. Vukovi imaju razvijen kompleksan sistem komunikacije koji je zasnovan na stavu tijela, facijalnoj ekspresiji (Schenkel, 1947, Zimen, 1981), zvučnim signalima - načinu zavijanja (Mech, 1970, 1988, Harrington i Mech, 1979, Schassburger, 1993, Coscia i sar., 1991, Coscia, 1995) i olfaktornoj komunikaciji (Montagna i Parks, 1948, Parks, 1950, Aoki i Wada, 1951, Brown i Johnston, 1983, Mech, 2001).

U pogledu ishrane vukovi su oportunisti; hrane se onim što im je dostupno u području koje naseljavaju. Metabolizam im je prilagođen na bilo koju vrstu i na bilo koji izvor hrane da bi preživjeli i opstali. Pretežno se hrane krupnim biljojedima kao što su: divlja svinja (*Sus scrofa*), srna (*Capreolus capreolus*), jelen (*Cervus elaphus*), jelen lopatar (*Dama dama*); ali i sitnijim kičmenjacima, beskičmenjacima, povrćem i voćem (Ciucci i sar., 1996, Meriggi i sar., 1996, Pezzo i sar., 2003, Peterson i Ciucci, 2003). Ukoliko nemaju drugi izvor hrane mogu se hraniti i leševima uginulih životinja. U slučaju da je trofička baza jako oskudna, hranu mogu pronalaziti i na lokalnim deponijama. U područjima sa razvijenim ekstenzivnim stočarstvom plijen im je i stoka koju, ako nije dobro čuvana, lakše love nego divljač. Tom prilikom vukovi mogu nanijeti velike štete lokalnim stočarima (Castroviejo, 1975, Reig i Palacios, 1985, Cuesta i sar., 1991, Barrientos, 1993). Na Aljasci, i u Kanadi se hrane i ribom.

## 2.2. MOLEKULARNI MARKERI U POPULACIONO-GENETIČKIM ANALIZAMA DIVLJIH ŽIVOTINJA

Primjena molekularnih markera u populaciono - genetičkim studijama počela je 60-ih godina 20. vijeka analizama polimorfizama proteinskih molekula - alozima, upotrebom multilokusne enzimske elektroforeze, te objavljivanjem prvih podataka o nivou genetičke varijabilnosti, dobijenih navedenim molekularnim pristupom (Harris 1966, Johnson i sar., 1966, Lewontin i Hubby 1966). Iako su predstavljali revoluciju u analizi genetičke varijabilnosti, nizak nivo polimorfnosti proteinskih molekula te činjenica da su pod pritiskom selekcije<sup>4</sup> predstavljali su limitirajuće faktore u njihovoj široj upotrebi. Dvije decenije nakon njihovog otkrića, američki naučnik, biohemičar Kary Mullis, predstavio je novu, revolucionarnu - PCR metodu kojom je omogućeno analiziranje genetičke varijabilnosti na nivou DNK. Daljnji razvoj PCR metode, a zatim i tehnologija sekvenciranja, te njihova automatizacija, doveli su do prave molekularno - genetičke revolucije što je za posljedicu imalo pojavu i unapređenje velikog broja molekularnih markera baziranih na polimorfizmu DNK, npr. mitohondrijalna DNK, mikrosateliti, polimorfizam pojedinačnih nukleotida (*SNP - single nucleotide polymorphism*, engl.), itd. Shodno tome, razvijali su se i novi analitički pristupi i programski paketi za analizu molekularnih podataka (Luikart i England, 1999; Sunnucks, 2000), te nove naučne discipline (molekularna ekologija, konzervaciona genetika, prediona genetika)<sup>5</sup> koje su dale odgovore na brojna pitanja o biologiji neke vrste. Konstantan razvoj molekularnih metoda bio je značajan i u istraživanju populacija divljih životinja (Honeycutt i sar., 1999) što je ranije bilo ograničeno isključivo na primjenu ekoloških metoda.

Analiziranjem polimorfnosti molekularnih markera dobijaju se informacije o nivou genetičke varijabilnosti, odnosno, evolucionom potencijalu određene vrste, populacije ili ekosistema (Frankham i sar., 2002). Genetička varijabilnost ostaje neizmijenjena tokom vremena isključivo u slučaju idealne, *Hardy - Weinbergove*, populacije, dok u prirodnim populacijama

---

<sup>4</sup>Varijabilnost kodirajućih regiona smanjuje se usljed selekcionog pritiska kojim se nastoje ukloniti mutacije iz navedenih regiona, tako da varijabilnost kodirajućih regiona predstavlja samo mali fragment ukupne genomske varijabilnosti. Sa druge strane selekciono pritisak u nekodirajućim regionima je nizak te se u ovim regionima akumuliraju mutacije, a samim tim povećava se genetička varijabilnost. Iz tog razloga nekodirajući regioni se uglavnom koriste u populaciono - genetičkim analizama.

<sup>5</sup>Istraživanja u okviru Molekularne ekologije daju nam podatke o ekologiji i evoluciji divljih životinja (Freeland, 2005). Konzervaciona genetika istražuje faktore koji dovode do potencijalnog izumiranja vrste i aktivnosti koje je potrebno sprovesti u cilju oporavka populacije te vrste (Frankham i sar., 2002). Prediona genetika istražuje uticaj geografskih i uslova spoljašnje sredine na strukturiranje genetičke varijabilnosti na populacionom i nivou jedinki (Manel i sar., 2003).



brojni faktori (veličina populacije, mutacije, genetički drift, prirodna selekcija, migracije, neslučajno ukrštanje, raznovrsnost sredine) utiču na genetičku kompoziciju određene grupe jedinki i dovode do izmjene nivoa genetičke varijabilnosti. Gubitkom genetičke varijabilnosti u prirodnim populacijama vrsta povećava se rizik od njihovog iščezavanja (Saccheri i sar., 1998). Filogeografskim analizama prostorne distribucije genetičkih linija, odnosno filogeografskih obrazaca nastalih djelovanjem evolucionih faktora, objedinjuju se rezultati istraživanja brojnih bioloških disciplina: molekularne genetike, populacione genetike, demografije, filogenetike, paleontologije i sl., te se nastoji izvršiti rekonstrukcija istorijske distribucije vrsta na Zemlji, puteva migracija i povezanosti između vrsta (Avice, 2000). Egzaktna populaciono - genetička istraživanja određene vrste povećavaju naša znanja o samoj vrsti i omogućavaju kreiranje i primjenu adekvatnog monitoringa i odgovarajućih mjera zaštite (Russello i Amato, 2004).

### **2.2.1. Mikrosateliti**

Mikrosateliti su otkriveni u kasnim 80-im godinama 20. vijeka (Litt i Luty, 1989, Tautz, 1989, Weber i May, 1989), a otkrićem PCR metode počinje njihova izuzetno široka primjena u oblasti medicine, poljoprivrede, populacione i konzervacione genetike. Uskoro po otkriću utvrđeno je da su gusto rasuti u nuklearnom genomu biljaka (Morgante i sar., 1998, Nybom i sar., 1992, Squirrell i sar., 2003), životinja (Fries i sar., 1990, Ellegren, 1991, Stallings i sar., 1991) i ljudi (Valdes i sar., 1993), ali da se nalaze i u genomima organela, uključujući i animalnu mtDNK (Lunt i sar., 1998). Poslednjih nekoliko decenija privlače pažnju istraživača zbog višestruke primjene: mapiranja gena, dokazivanja očinstva, forenzičkih analiza, utvrđivanja demografskih procesa (Ellegren, 2004), te praktične i jednostavne primjene u populaciono - genetičkim istraživanjima (Wright i Bentzen, 1995, Schlötterer, 2000). Iako su prajmeri za amplifikaciju mikrosatelita i protokoli za njihovu primjenu prvenstveno razvijeni u oblasti humane genetike, razvoj novih protokola omogućio je da postanu moćan alat i u istraživanjima genoma životinja (Schlötterer, 2000).

Mikrosateliti (STR, SSR, VNTR) su kratke nekodirajuće DNK sekvence čiji se osnovni motiv dužine od 1 do 9 nukleotida. Ove kratke nekodirajuće sekvence se tandemski ponavljaju 10 do 100 puta, a broj ponavaka rijetko prelazi 70 puta (Page i Holmes, 1998). Predstavljaju veliku frakciju nekodirajuće DNK, gdje im je očuvana pozicija u genomu, dok se u kodirajućim

regionima relativno rijetko uočavaju (Stallings i sar., 1991). Najzastupljeniji ponovci su dinukleotidi, rijede tri- i tetranukleotidi. Kod primata su registrovani i mononukleotidni ponovci (Tóth i sar., 2000). Najčešći motiv u genomima sisara, prema Schlötterer-u (1998), je GT/AC i javlja se na svakih 30 kb. S obzirom na strukturu osnovnog motiva, mikrosatelitski regioni mogu biti potpuni (jednostavni), (npr.  $(TG)_{14}$ ) i kompozitni (složeni). Kod složenih mikrosatelita motiv koji se ponavlja predstavlja kombinaciju ponovaka (npr.  $(TA)_5(TG)_{14}$ ) ili je prekinut nukleotidima koji se ne ponavljaju (npr.  $(GA)_4TCC(GA)_{10}$ ). Gotovo ravnomjerna distribucija po cijelom genomu, visok stepen polimorfizma, mala veličina (uglavnom <300 nukleotida), kodominantnost i biparentalno nasljeđivanje čini ih veoma pogodnim za genetička istraživanja. Posebno važna karakteristika je da su granične sekvence mikrosatelitskih lokusa visoko konzervativne unutar, ali i između srodnih vrsta. Zato se prajmeri koji se sintetišu za amplifikaciju lokusa određene vrste uglavnom mogu primijeniti za širok spektar srodnih taksona (Awise, 2000).

Nekodirajući mikrosatelitski lokusi odlikuju se visokom stopom mutacija, od  $10^{-5}$  do  $10^{-3}$  po generaciji, po lokusu (Weber i Wong, 1993, Primmer i sar., 1996, Schug i sar., 1997), te su zbog toga visoko polimorfni. Polimorfizam se ogleda u različitom broju ponovaka, odnosno, različitoj dužini alela (različitom alelu). Smatra se da su osnovni mutacioni mehanizmi koji dovode do polimorfizama mikrosatelitskih lokusa replikativno proklizavanje (*replication slippage*, engl.) i nejednak *crossing-over*. Faktori koji dovode do ovih mehanizama su brojni i različiti (npr. veličina alela, lokacija, sadržaj GC ponovaka u graničnim regionima). Replikativno proklizavanje predstavlja osnovni mutacioni mehanizam mikrosatelitskih lokusa (Wolff i sar., 1989) i dešava se tokom replikacije DNK. Kada dođe do privremenog razdvajanja DNK lanaca, jedan lanac formira "lupu", strukturu koja onemogućava ponovno, pravilno spajanje novosintetisanog lanca sa lancem matricom. Pretpostavlja se da se proklizavanje primarno dešava tokom sinteze lanca koji zaostaje (*lagging strand*, engl.), (Schlötterer i Tautz, 1992). Ukoliko se nakon pogrešnog sparivanja lanaca nastavi sinteza ovog DNK molekula dolazi do promjene broja ponovaka (dužine) lokusa u smislu da će se broj ponovaka povećati ili smanjiti u zavisnosti na kojem lancu se formirala lupa (Schlötterer i Tautz, 1992, Ellegren, 2004). Rekombinacije, drugi mutacioni mehanizam, mogu uticati na izmjenu dužine mikrosatelitskih lokusa nejednakim *crossing-over*-om ili genskom

konverzijom, tokom mitoze ili mejoze. U zavisnosti od motiva, nejednaka izmjena može biti jednosmjerna (kontrakcija ili ekspanzija) i dvosmjerna (istovremeno kontrakcija i ekspanzija).

Mutacioni modeli, kojima se objašnjava evolucija mikrosatelita, veoma su bitni u statističkoj analizi podataka jer brojni parametri genetičke udaljenosti i populacione substrukturiranosti zavise upravo od primijenjenog modela. Prvi ustanovljeni model, model neograničenog broja alela (IAM - *infinite alleles model*, engl.), pretpostavlja da mutacijom lokusa sa određenim brojem ponovaka dolazi do stvaranja novog alela sa neodređenim brojem ponovaka (Kimura i Crow, 1964). S obzirom da je prvenstveno razvijen za alozime, IAM model ne posmatra mogućnost pojave homoplazije<sup>6</sup>. Zbog ograničene veličine i visoke stope mutacija ona je veoma čest fenomen kod mikrosatelita, te iz tog razloga ovaj model nije u potpunosti adekvatan za mikrosatelitske lokuse. Pojavljivanje homoplazije dovodi do podcjenjivanja ukupne genetičke varijabilnosti i genetičke udaljenosti sa jedne, a precjenjivanja nivoa sličnosti između populacija sa druge strane, te je za mikrosatelitske lokuse bilo potrebno razviti adekvatniji mutacioni model. Drugi model, model postepenih mutacija (SMM - *stepwise mutation model*, engl.) (Ohta i Kimura, 1973, 1978, Ellegren, 1999), koji se bazira na pretpostavci da novi aleli nastaju dodavanjem ili oduzimanjem jednog ponovka konstantnom brzinom tokom replikacija (Ellegren, 2004, Li i sar., 2001), pokazao se adekvatnijim za mikrosatelite. Prema ovom modelu, što je veća razlika u dužini između alela veći je broj mutacionih događaja i više vremena je proteklo od razdvajanja od zajedničkog pretka. Za razliku od IAM modela, SMM model uzima u obzir homoplaziju. Treći, prelazni dvofazni model (TPM - *two - phase mutation model*, engl.) pretpostavlja da novi aleli nastaju uglavnom putem SMM modela, ali mogu povremeno nastati i putem IAM modela i za njega važi da najrealnije prikazuje evoluciju mikrosatelita. Smatra se da mikrosatelitski lokusi sa dužinom ponovaka od 3 do 5 bp evoluiraju po SMM modelu, a mono- i dinukleotidni po TPM modelu. Zbog očekivano niskog niva homoplazije u pomenutim analizama sugerise se da se prilikom istraživanja genetičkih veza i strukture populacije primjenjuje IAM model (Estoup i sar., 1995).

---

<sup>6</sup>Homoplazija je fenomen koji nastaje kada mutacijom mikrosatelitskih lokusa, koji vode porijeklo od različitih predaka, nastanu isti aleli (isti po dužini, različiti po porijeklu; dužina alela nije informativna i ne ukazuje na stepen srodstva), (Estoup i Cornuet, 1999). Određen stepen homoplazije postoji i kod alozima, ali IAM modelom se, bez obzira na nju, uspješno objašnjava uočena alozimska varijabilnost (Nei, 1987).



### 2.2.2. Mitohondrijalna DNK

Široka primjena mitohondrijalne DNK (mtDNK) kao molekularnog markera počinje 80-ih godina 20. vijeka, kada postaje najpopularniji marker u genetičkim analizama prirodnih populacija (Galtier i sar., 2009). Prvobitno, varijabilnost mtDNK analizirana je primjenom RFLP metode<sup>7</sup>, a nakon otkrića PCR metode, ovaj genom organele i njegovi fragmenti postaju nezaobilazan genetički marker u istraživanjima genetičke strukture populacija i filogeografske historije vrste. Razvojem tehnologija sekvenciranja povećava se njena informativnost kao molekularnog markera. RFLP metoda se u analizi varijabilnosti mtDNK počela primijenjivati još krajem 60-ih godina prošlog vijeka, a prve statističke analize za izračunavanje stepena različitosti između sekvenci mtDNK razvijene su 1977. godine (Upholt, 1977). Stoga, ne čudi da su struktura i genetička osnova varijabilnosti animalne mtDNK razjašnjene mnogo prije nego što je sekvenciranje kompletnog genoma mtDNK postalo gotovo rutina (Brown i Simpson, 1982, Attardi, 1985, Wallace, 1982, 1986, Cantatore i Saccone, 1987, Gray, 1989, Wolstenholme, 1992, Miya i sar., 2003). Danas se zna da je animalna mtDNK kružna, dvolančana molekula, dužine od 15 do 20 kb (kilobaza), ne sadrži introne i nasljeđuje se preko majke. Spoznaja da se nasljeđuje maternalno<sup>8</sup> i ženskom linijom prenosi na potomke predstavlja njenu najvažniju osobinu u svojstvu genetičkog markera (Dawid i Blackler, 1972, Hutchinson i sar., 1974, Giles i sar., 1980, Gyllensten i sar., 1985, Avise i Vrijenhoek, 1987). Iz tog razloga mtDNK genotipovi se posmatraju kao haplotipovi (molekularni klonovi), a uočene evolutivne veze između njih kao procjene matrijarhalne filogenije (Avise i sar., 1979). Za mtDNK je karakteristično odsustvo rekombinacija (Bruford i sar., 2003) što olakšava filogenetičke i filogeografske analize. Sa funkcionalnog aspekta, sastoji se iz 37 gena (22 tRNK gena, 2 rRNK gena i 13 protein-kodirajućih gena) koji se nalaze u kodirajućem regionu. Sa filogenetičkog aspekta, s obzirom na uniparentalnu transmisiju molekula, kompletan mtDNK genom predstavlja jednu povezanu genealošku jedinicu sa velikim brojem alela (Avise, 2000). Pored kodirajućeg, mtDNK sadrži i nekodirajući region koji se naziva kontrolni

<sup>7</sup>RFLP metoda se primjenjuje u analiziranju stepena varijabilnosti homolognih DNK sekvenci. Podrazumijeva fragmentisanje molekula DNK restrikcionim endonukleazama, nakon čega se dobijeni fragmenti elektroforetski razdvajaju. U zavisnosti od prisustva restrikcionih mjesta dobijaju se fragmenti DNK različite dužine čijim se poređenjem uočava stepen varijabilnosti sekvenci.

<sup>8</sup>Prema literaturnim navodima (Kondo i sar., 1990, Avise, 1991, Gyllensten i sar., 1991) biparentalno nasljeđivanje mtDNK je karakteristično kod nekih kvasaca, nekih školjki i miševa (1/1000 mtDNK je porijeklom od oca).

ili region D - petlja (*D loop*, engl.), i sadrži hipervarijabilni region koji je podijeljen na hipervarijabilni region 1 (HV1) i hipervarijabilni region 2 (HV2). Predstavlja mjesto početka procesa replikacije i transkripcije, tako da je u ovom regionu varijabilnost nukleotida i dužina sekvenci najveća (Hoelzel i sar., 1994). Dužina mu iznosi oko 1 kb. Za kičmenjake je u ovom regionu karakteristično prisustvo tročlane strukture - D petlje, po kojoj se kontrolni region često i naziva u literaturi (Taberlet, 1996). U genetičkim analizama značajan je zato što se u njemu akumuliraju mutacije (najčešće tačkaste) što predstavlja osnovu za razlikovanje haplotipova (Awise i sar., 1994). Brzina stope supstitucije nukleotida kontrolnog regiona je tri do pet puta veća u odnosu na preostali dio mtDNK genoma, a pet do deset puta veća u odnosu na jedarnu DNK (Lee i sar., 1997). S obzirom da brzo akumulira informacije, može se koristiti za opisivanje relativno skorašnjih evolutivnih događaja (Kim i sar., 1998) na nižim organizacionim nivoima (vrsta ili populacija) (Zhang i Hewitt, 1996, Brudford i sar., 2003).

### **2.3. POPULACIONO - GENETIČKA ISTRAŽIVANJA VUKA**

Populacija vuka iz Kanade (Kennedy i sar., 1991) je među prvim u kojoj je proučavana genetička varijabilnost primjenom proteinskih polimorfizama - alozima. Ovim analizama je detektovan umjeren nivo heterozigotnosti populacije u poređenju sa prirodnim populacijama ostalih članova reda Carnivora. U paralelnoj studiji varijabilnosti 40 alozimskih lokusa kod italijanskih vukova, uočen je sličan nivo varijabilnosti (Randi i sar., 1993). S obzirom na malu rezoluciju navedenih markera u daljnja istraživanja je bilo potrebno uvesti markere veće rezolucije. Danas se populaciono - genetička istraživanja vuka sprovode primjenom različitih molekularnih markera: autozomalnih mikrosatelita, polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP), gena glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC - *major histocompatibility complex*, engl.), mitohondrijalne DNK, mikrosatelitskih regiona Y hromozoma i SNP-ova Y hromozoma (Hindrikson i sar., 2016).

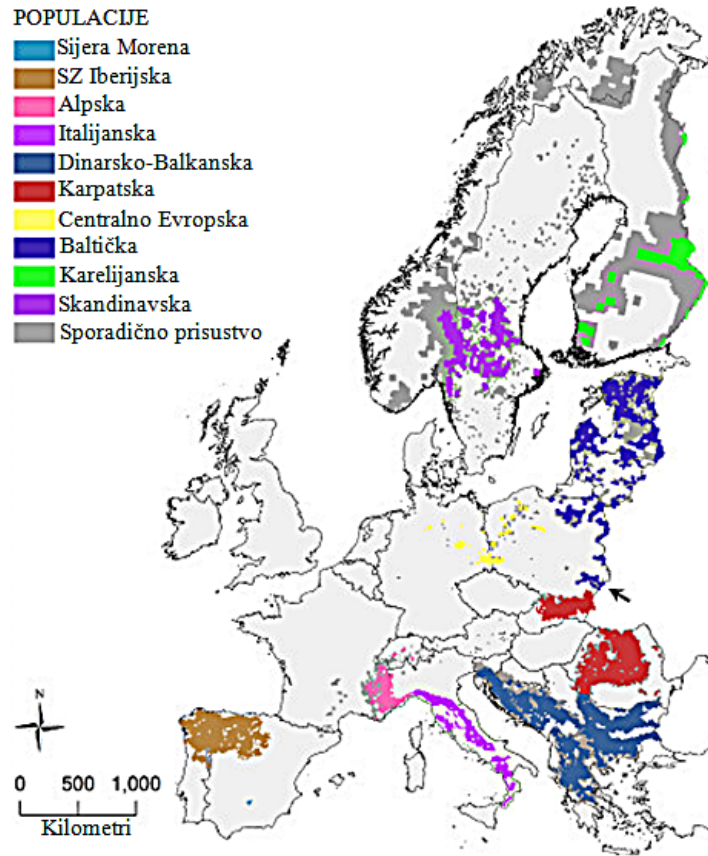
#### **2.3.1. Mikrosateliti u populaciono - genetičkim istraživanjima vuka**

Primjena autozomalnih mikrosatelitskih lokusa u populaciono - genetičkim istraživanjima vuka primarno je počela sa ciljem detekcije genetičke varijabilnosti unutar prirodnih populacija. Navedeni markeri korišćeni su i u analizi prostorne strukture populacija vuka u Evropi. Najveći procenat analiza koje su do sada sprovedene bio je ograničen na određenu



zemlju ili limitirani region (Flagstad i Røed, 2003, Jędrzejewski i sar., 2005, Fabbri i sar., 2007, Godinho i sar., 2011, Jansson i sar., 2012, 2014, Hindrikson i sar., 2013, Plumer i sar., 2016, Djan i sar., 2016, Šnjegota i sar., 2016), a mali je broj obimnijih istraživanja koja su u analiziranju populacione strukture vukova podrazumijevala veću teritoriju (Pilot i sar. 2006; Aspi i sar. 2009, Sastre i sar., 2011, Fabbri i sar., 2014, Pilot i sar., 2010, Montana i sar., 2017). Analizom mikrosatelitskih lokusa utvrđeno je da metapopulaciju vuka Evrope čini 10 populacija (Sl. 3): Sijera Morena (južna Španija), sjevero - zapadno iberijska (sjeverna Španija i Portugalija), alpska (Francuska, Švicarska, Italija), italijanska (Apenini, Italija), dinarsko - balkanska (područje od Slovenije na sjeveru do Bugarske i Grčke na jugu), karpatska (Rumunija, Češka, Slovačka, Poljska, Srbija), centralno evropska (zapadna Poljska, Njemačka i Danska), baltička (Estonija, Letonija, Istočna Poljska), karelijanska (Finska) i skandinavjska (Norveška i Švedska) (Kaczensky i sar., 2013). Brojnost navedenih populacija je različita i varira od nekoliko hiljada jedinki (npr. na Karpatima i Balkanu) do svega par jedinki u jednom čoporu (npr. planine Sijera Morene) (López - Bao i sar., 2015). Trenutni genetički status populacija vuka u Evropi najvjerojatnije je posljedica fragmentisanosti i prolongirane izolacije (Vilà i sar., 1999, Vonholdt i sar., 2008, Pilot i sar., 2010).

Primjenom navedenih markera uočena je varijabilnost veća u sjevero - istočnim, a manja u jugo - zapadnim dijelovima areala. Najmanja ukupna genetička varijabilnost uočena je u populacijama u Italiji i na Iberijskom poluostrvu (gdje se uočava i najmanji broj alela), a najveća u dinarsko - balkanskoj populaciji vuka. Navedena distribucija genetičke varijabilnosti može biti posljedica skorašnje demografske istorije (nekontrolisanog lova i prolaska populacija kroz usko grlo), slabije povezanosti (izolacije u perifernim područjima areala vuka u Evropi) i uslova spoljašnje sredine (Hindrikson i sar., 2016).



**Slika 3.** Distribucija vuka u Evropi (modifikovano iz Chapron i sar., 2014)

Istraživanje genetičke varijabilnosti i populacione strukture vuka Bosne i Hercegovine u većem obimu, primjenom mikrosatelitskih lokusa, sprovedeno je od strane Šnjegota i sar. (2016). U navedenom istraživanju korišćen je panel od 18 autozomalnih mikrosatelitskih lokusa (The Canine Genotypes™ Panel 1.1 kit) proizvođača *Finnzymes Diagnostics*, sa ciljem utvrđivanja nivoa genetičke varijabilnosti, detekcije populacione strukture, te određivanja protoka gena. Istraživanje je sprovedeno na uzorku od 20 jedinki za koje je, prema osnovnim parametrima genetičke varijabilnosti ( $H_o=0,66$ ;  $H_e=0,76$ ), detektovan umjeren nivo varijabilnosti, slično kao i tokom istraživanja genetičke varijabilnosti vuka u Hrvatskoj ( $H_o=0,66$ ,  $H_e=0,72$ ), gdje se varijabilnost povećavala tokom vremena i dostigla komparativni nivo sa varijabilnošću vuka Bosne i Hercegovine (Fabbri i sar., 2012, 2014). Uočene vrijednosti neznatno su veće od vrijednosti koje su uočili Lucchini i sar. (2004) i Fabbri i sar. (2014), analiziranjem malog broja jedinki vuka ograničenog dijela teritorije Bosne i Hercegovine. Primjenom istog panela mikrosatelitskih lokusa Djan i sar. (2016) su uočili sličan nivo genetičke varijabilnosti u populaciji vuka u Srbiji.

Šnjegota i sar. (2016) detektovali su statistički značajnu manju heterozigotnost populacije vuka Bosne i Hercegovine, te strukturiranje i izdvajanje dva genetička klastera koji se geografski preklapaju. Uočeno preklapanje dva genetička klastera može biti posljedica Valundovog efekta<sup>9</sup> ali i malog broj jedinki uključenih u istraživanje. Djan i sar. (2016) su takođe uočili strukturiranje populacije vuka Srbije, gdje se klasteri takođe geografski preklapaju, što je ukazalo da se vukovi Srbije mogu posmatrati kao jedna konzervaciona jedinica. Za vuka Bosne i Hercegovine uočene su visoke vrijednosti  $F_{IS}$  koeficijenta. Ove vrijednosti mogu ukazati na ukrštanje u srodstvu, ali i biti signal povećanja homozigotnosti. Slični rezultati registrovani su i unutar populacije vuka iz Hrvatske (Lucchini i sar., 2004, Fabbri i sar., 2014), Bugarske i Grčke (Moura i sar., 2014) i Srbije (Djan i sar., 2016). Detektovan genetički signal skorašnjeg opadanja brojnosti populacije može biti posljedica genetičkog uskog grla populacije vuka na teritoriji Bosne i Hercegovine. Uočene promjene ističu potrebu za njihovim daljnjim istraživanjem i monitoringom u cilju kreiranja plana zaštite i sprovođenja odgovarajućih konzervacionih mjera.

### **2.3.2. Mitohondrijalna DNK u populaciono - genetičkim istraživanjima vuka**

I pored velikog rasprostranjenja i kompleksne evolucione istorije vuka većina genetičkih analiza sprovedenih primjenom kontrolnog regiona mtDNK ograničena je na specifične geografske regione (Randi i sar., 2000, Aggarwal i sar., 2007, Weckworth i sar., 2010, Djan i sar., 2014). U najvećem broju studija analizirani su kratki, ali visoko informativni, fragmenti kontrolnog regiona mtDNK (Vilà i sar., 1999, Valière i sar., 2003, Sharma i sar., 2004, Jędrzejewski i sar., 2005). Opsežna istraživanja, koja su obuhvatila veći broj uzoraka i širu teritoriju, sprovedena su od strane Vilà i sar. (1999) i Pilot i sar. (2010). U istraživanju sprovedenom od strane Vilà i sar. (1999) analizirano je 259 uzoraka sa 30 lokacija širom svijeta, pri čemu su detektovana 34 haplotipa. Pored toga, utvrđeno je da su fluktuacije u veličini populacije tokom kasnog Pleistocena ostavile posljedice na genetičku varijabilnost vrste. Pilot i sar. (2010) sproveli su istraživanje na evropskom nivou, na uzorku od 947 jedinki iz 23 evropske zemlje. U navedenom istraživanju detektovana su 23 haplotipa na nivou Evrope i njihova distribucija u 2 haplogrupe koje se geografski preklapaju, ali imaju različitu

---

<sup>9</sup>Valundov efekat (Wahlund effect) predstavlja opadanje heterozigotnosti populacije uzrokovano strukturiranjem populacije. Ukoliko dvije ili više subpopulacija imaju različite frekvencije alela ukupna heterozigotnost se smanjuje bez obzira što su subpopulacije u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Smatra se da uzrok Valundovog efekta može biti geografska barijera protoka gena.





frekvenciju između populacija u jugozapadnom, odnosno, istočnom dijelu Evrope. Poređenjem sa sekvencama na svjetskom nivou, u istom istraživanju, detektovano je 30 haplotipova u Aziji, 18 u Sjevernoj Americi, 3 zajednička haplotipa za Evropu i Aziju, te 1 zajednički za Evropu i Sjevernu Ameriku. Hindrikson i sar. (2016) navode da su na nivou Evrope, uključujući Rusiju i Kavkaz, detektovana 43 različita haplotipa.

Dosadašnje filogeografske studije vrste *Canis lupus* ukazale su na odsustvo jasne strukture na globalnom nivou, te na stvaranje strukture na lokalnom nivou (Vilà i sar., 1999, Pilot i sar., 2010). Za razliku od Evroazije gdje su prisutne obje haplogrupe, u Sjevernoj Americi se uočava samo jedna haplogrupa (haplogrupa 1). Analiza istorijskih uzoraka vuka u Evropi pokazala je da su svi drevni vukovi Evrope pripadali haplogrupi 2, koja je imala dugoročnu prevlast na ovim područjima (40 000 godina prije, ali i poslije posljednjeg glacijalnog maksimuma). Međutim, poređenjem frekvencija haplotipova recentnih i predačkih vukova uočeno je da je haplogrupa 2 zamijenjena haplogrupom 1 tokom poslednjih nekoliko hiljada godina. Haplogrupa 2 danas se može uglavnom uočiti kod vukova u Italiji, na Balkanu i Karpatima, a u Aziji su identifikovana samo 4 haplotipa koja pripadaju navedenoj haplogrupi. Paralelna izmjena haplogrupa, uočena i kod vukova u Sjevernoj Americi, dovela je do nestanka haplogrupe 2 na tom području i potpune dominacije haplogrupe 1. Sličnost u ishrani vukova Evrope i Sjeverne Amerike u kasnom Pleistocenu, kada se desila izmjena u frekvenciji haplotipova, ukazuje na mogući uticaj ekoloških faktora na navedene izmjene (Pilot i sar., 2010).

Prvobitna genetička karakterizacija vukova Bosne i Hercegovine izvršena je analizama dijela kontrolnog regiona mtDNK. Navedena istraživanja vršena su na malom uzorku (po nekoliko jedinki) u okviru istraživanja dinarsko - balkanske populacije vuka (Lucchini i sar., 2004, Gomerčić i sar., 2010, Fabbri i sar., 2014, Moura i sar., 2014), a istraživanje sprovedeno od strane Djan i sar. (2014) na nivou centralnog Balkana, uključilo je, do tada, najveći broj jedinki iz Bosne i Hercegovine. Navedeno istraživanje (Djan i sar., 2014) sprovedeno je na uzorku od 87 vukova (53 iz Srbije, 18 iz Makedonije, 16 iz Bosne i Hercegovine) za koje je amplifikovan dio kontrolnog regiona mtDNK i dodatno su preuzete sekvence iz banke gena (*GenBank*, engl.), tako da se ukupan set podataka sastojao iz 192 sekvence. Cilj istraživanja bio je utvrđivanje nivoa genetičke varijabilnosti, uočavanje potencijalne substrukture i

genetičkih signala ekspanzije ili genetičkog uskog grla populacije, te evaluacija filogeografske pozicije populacije vuka na području centralnog Balkana. Djan i sar. (2014) detektovali su visok nivo genetičke varijabilnosti koji je bio u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja na Balkanu i Evropi (Ellegren i sar., 1996, Randi i sar., 2000, Valière i sar., 2003, Pilot i sar., 2010, Gomerčić i sar., 2010, Hausknecht i sar., 2010, Sastre i sar., 2011, Moura i sar., 2014, Fabbri i sar., 2014), što je vjerovatno posljedica postojanja kontinuirane metapopulacije vuka na nivou Evrope u prošlosti. Morfološka istraživanja populacije vuka sa područja Srbije (Milenković, 1997) ukazala su na diferenciranost ove populacije, a kao glavni uzrok diferenciranja navedeno je postojanje geografske barijere - doline rijeke Morave. Sa istom pretpostavkom testirana je hipoteza o diferenciranosti vukova centralnog Balkana primjenom mtDNK (Djan i sar., 2014) ali nije statistički podržana. Ipak, utvrđeno je diferenciranje vuka centralnog Balkana na dvije grupe: zapadnu - u kojoj se nalaze vukovi Bosne i Hercegovine i Hrvatske, te istočnu - u kojoj se nalaze vukovi Srbije i Makedonije, a kao potencijalan (iako malo vjerovatan) uzrok ovakve podjele navodi se rijeka Drina, koja predstavlja fizičku granicu između Srbije sa jedne, odnosno, Bosne i Hercegovine sa druge strane. Za zapadnu grupu, u kojoj se nalaze vukovi Bosne i Hercegovine, utvrđena je veća genetička varijabilnost, te jasni signali genetičkog uskog grla, što može biti posljedica pada brojnosti populacije koji se desio 1980. godine, na šta je potencijalno uticao lovni pritisak ovog dijela populacije. Šnjegota i sar. (2014) nastavili su genetička istraživanja vuka Bosne i Hercegovine, te su analizirali kontrolni region mtDNK 17 jedinki, za koje su (na osnovu 4 detektovana haplotipa) potvrdili visok nivo genetičke varijabilnosti. Analiziranje demografske istorije ukazalo je na opadanje brojnosti populacije, što je u skladu sa prethodno utvrđenim rezultatima (Fabbri i sar., 2014, Djan i sar., 2014). Pored toga, testirali su i hipotezu o postojanju substrukturiranosti populacije, zasnovanu na rezultatima filogeografskih istraživanja određenih biljnih i životinjskih vrsta sa područja Bosne i Hercegovine, prema kojima dolina rijeke Neretve predstavlja granicu razdvajanja filogenetičkih grupa (Buzan i sar., 2010, Surina i sar., 2014). Ipak, substrukturiranost analizirane populacije vuka nije uočena što može biti i posljedica primjene neadekvatnog markera (mtDNK) za istraživanje strukture populacije, sa jedne strane, te malog broja analiziranih jedinki sa druge strane. Sličan obrazac registrovan je morfometrijskom analizom vukova iz Bosne i Hercegovine i Srbije (Trbojević i Ćirović, 2016).

## 2.4. UTICAJ LEDENIH DOBA NA VUKA

U epohi Pleistocena, u periodu između 50000 i 10000 godina, brojne vrste tadašnje megafaune su iščezle, uključujući mamute, velike kopnene ljenjivce i sabljozube tigrove. Navedene promjene veoma dugo intrigiraju naučnike koji neprestano pokušavaju naći razloge za njih, te ih uglavnom objašnjavaju posljedicama klimatskih promjena i antropogenih uticaja - kao što su deforestacija i/ili pretjerano izlovljavanje (Hofreiter i sar., 2015). Prema Hewittu (1999) ledena doba tokom Pleistocena imala su izuzetan uticaj na iščezavanje vrsta te oblikovanje današnje megafaune, odnosno, tadašnjeg biodiverziteta. Ipak, ni jedno od ovih objašnjenja nije u potpunosti prihvaćeno iz razloga što su na kontinentima različiti uticaji vjerovatno doveli do drugačijih efekata na pleistocensku megafaunu (Barnosky i sar., 2004). Leonard i sar. (2007) proučavali su populacije vukova kasnog Pleistocena Istočne Beringije i sjeverozapadnog dijela Sjeverne Amerike. Podaci dobijeni navedenim proučavanjem ukazali su da su u određenom periodu tokom Pleistocena vukovi migrirali iz Evroazije u Ameriku, preko Beringovog kopnenog mosta. Kasnije tokom Pleistocena, na području Sjeverne Amerike i Evroazije, uporedno sa adaptiranjem na lokalne ekološke uslove, razvijale su se različite ekomorfološke varijante. Krajem Pleistocena, tadašnja populacija vuka sjeverne hemisfere je iščezla, zajedno sa iščezavanjem brojnih vrsta tadašnje megafaune, nakon čega je došlo do najezde savremenog sivog vuka (*Canis lupus*) na navedenom području.

Wayne (1993) navodi da je posljednja glacijacija u Novom i Starom svijetu veoma redukovala geografski opseg kretanja vuka i veličinu populacije. Ovo smanjivanje veličine populacije tokom maksimuma glacijacije praćeno je ekspanzijom tokom interglacijala. Vuk je veoma adaptibilna vrsta i visoko - mobilni predator za koga je utvrđeno da tokom života prelazi razdaljine i po 1000 km (Fritts, 1983, Delgiudice i sar., 1987, Mech, 1995). Zahvaljujući velikoj pokretljivosti njegove populacije su se tokom interglacijalnih perioda rapidno širile u pogodna staništa što je rezultovalo admiksijom i povećanjem genetičke varijabilnosti u određenim populacijama. Kontrakcije populacija tokom glacijacija drastično su uticale na opadanje genetičke varijabilnosti vrste tokom Pleistocena, a admiksija u periodima interglacijala onemogućila je razjašnjenje strukture u prošlosti. Vilà i sar. (1999) su uočili drastičan pad genetičke varijabilnosti u populaciji vuka tokom perioda glacijacija, a Randi (2011) navodi da su klimatske i ekološke promjene kao i sastav plijena mogli imati presudan uticaj na nestanak i



izmjenu genotipova i ekotipova vukova u prošlosti, kao i na procese adaptacije modernog, recentnog vuka. Leonard i sar. (2007) su proučavanjem genetičkog diverziteta, morfologije i ishrane vuka kasnog Pleistocena iz Istočne Beringije došli do veoma zanimljivih rezultata. Autori su uočili razlike u morfologiji između savremenih vukova Sjeverne Amerike i pleistocenskih vukova iz južnijih područja. Pored toga, uočili su nepodudarnost 16 haplotipova kontrolnog regiona mitohondrijalne DNK istorijskih vukova sa haplotipovima savremenih vukova navedenog područja što je dovelo do velike genetičke udaljenosti između njih. Sa druge strane, uočili su savršenu podudarnost sekvenci/haplotipova pleistocenskih vukova sjevernog dijela Evroazije i Amerike. Predstavlja se da su oni tada vjerovatno predstavljali kontinuiranu i gotovo panmiktičnu populaciju koja se u ekološkom i genetičkom pogledu znatno razlikovala od populacije savremenog vuka. Ipak, i pored velike mobilnosti, pleistocenske populacije vuka su iščezle krajem ove epohe. Iz tog razloga nisu doprinijeli genetičkom diverzitetu modernih vukova. Smatra se da su savremeni holarktički vukovi, vjerovatnije, potomci vukova iz južnih refugijuma (Leonard i sar., 2005), odnosno, Balkanskog, Pirinejskog i Apeninskog poluostrva (Hewitt, 1999), što nije slučaj samo sa vukovima već i ostalim biljnim i životinjskim vrstama koje su učestvovala u postglacijalnim rekolonizacijama.

Iako ne postoji dovoljno dokaza, u naučnoj literaturi je opšte prihvaćeno da su na današnju intraspecijsku genetičku diferencijaciju bitno uticala glacijacija, odnosno, populaciono - genetički procesi koji su se odigrali u metapopulaciji vuka tokom pleistocenske glacijacije.

# 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Dosadašnja istraživanja vuka Bosne i Hercegovine sprovedena su uglavnom u okviru širih analiza dinarsko - balkanske populacije. Rezultati ovih studija imaju ograničeni domet u genetičkoj karakterizaciji vukova na prostoru Bosne i Hercegovine jer su bili bazirani na malom uzorku (svega nekoliko jedinki) koji je porijeklom samo sa dijela areala (Lucchini i sar., 2004; Gomerčić i sar., 2010; Fabbri i sar., 2014; Djan i sar., 2014). Vukovi Bosne i Hercegovine predstavljaju centralnu, a najmanje istraženu subpopulaciju dinarsko - balkanske populacije vuka, za koju je utvrđeno da ima izuzetan značaj u rekolonizaciji susjednih populacija. Radi preciznije i detaljnije genetičke karakterizacije navedenih populacija, bilo je neophodno povećati uzorak i prostorni obim uzorkovanja na prostoru sa koga nedostaju informacije (Bosna i Hercegovina).

Ciljevi ovog istraživanja, baziranog na analizama varijabilnosti autozomalnih mikrosatelitskih lokusa i sekvenci dijela kontrolnog regiona (CR) mitohondrijalne DNK vuka Bosne i Hercegovine su:

- utvrđivanje nivoa genetičke varijabilnosti vukova Bosne i Hercegovine analiziranjem 18 mikrosatelitskih lokusa i amelogenina (lokusa specifičnog za determinaciju pola) nuklearne DNK i dijela kontrolnog regiona (CR-1) mitohondrijalne DNK
- detekcija prostornog obrasca genetičke varijabilnosti vukova Bosne i Hercegovine analiziranjem mikrosatelitskih lokusa
- analiza srodstva između jedinki vukova sa teritorije Bosne i Hercegovine primjenom mikrosatelitskih lokusa
- detekcija genetičkih signala prolaska vukova Bosne i Hercegovine kroz usko grlo
- određivanja efektivne veličine populacije ( $N_e$ ) vukova Bosne i Hercegovine
- definisanje haplotipova mtDNK kod vukova sa teritorije Bosne i Hercegovine i definisanje filogeografskog položaja vukova Bosne i Hercegovine u evropskom kontekstu

Rezultati ovog istraživanja bi trebalo da imaju aplikativni značaj. Dobijeni podaci se mogu koristiti za kreiranje budućeg monitoringa, ali mogu predstavljati i dobru osnovu za izradu nacionalnog Akcionog plana i Plana upravljanja vukom u Bosni i Hercegovini.

# 4. RADNA HIPOTEZA

U ovom istraživanju postavljeno je nekoliko radnih hipoteza:

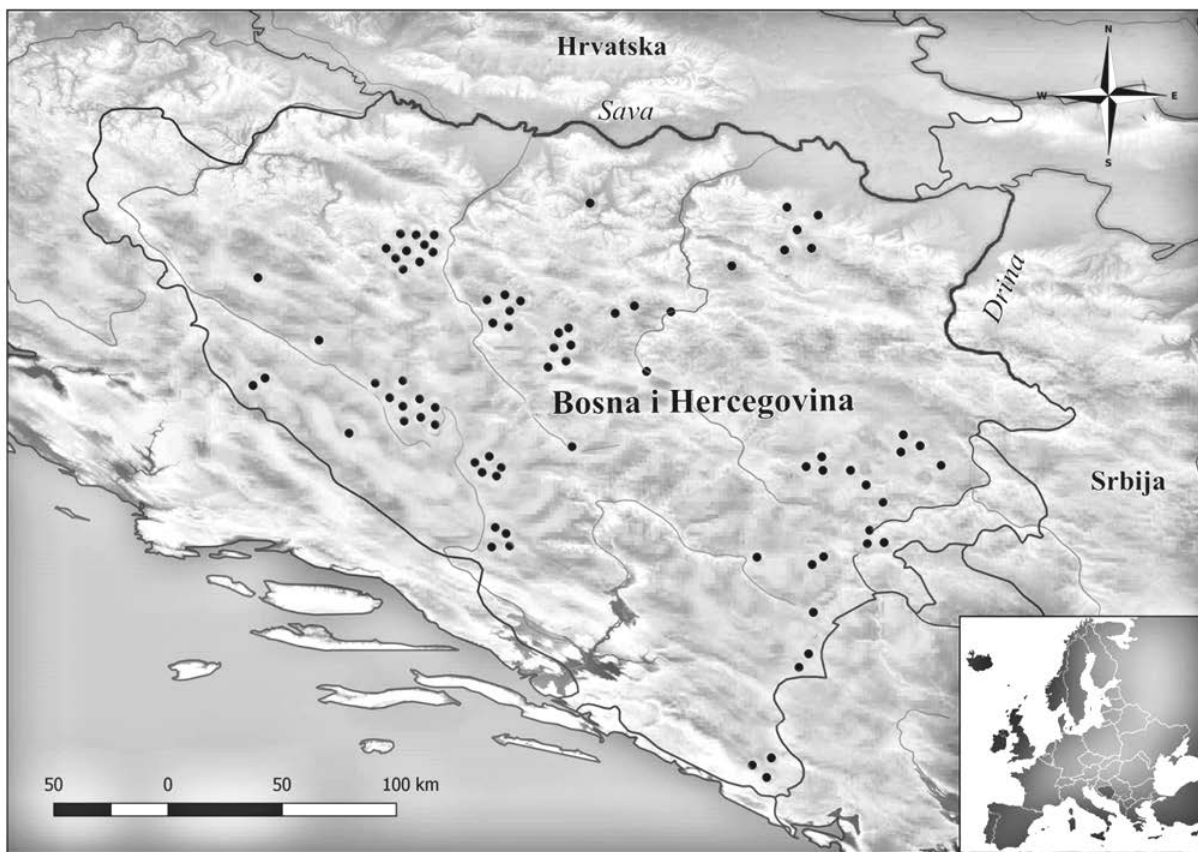
1. primijenjeni autozomalni mikrosatelitski lokusi, dostupni u komercijalnom kompletu hemikalija - *The Canine Genotypes™ Panel 1.1* kit (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) adekvatni su i pokazuju zadovoljavajući nivo polimorfnosti neophodan za: analizu genetičke varijabilnosti, detekciju populacione strukture, analizu srodstva, detekciju ukrštanja u srodstvu i uočavanje prolaska populacije vuka Bosne i Hercegovine kroz genetičko usko grlo;
2. primjenjeni prajmeri (CR1 i CR2R) adekvatni su za produkovanje sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK, dovoljno informativnih za detekciju nivoa genetičke varijabilnosti, detekciju mtDNK haplotipova i filogeografske analize;
3. primjenom oba molekularna markera moguće je detektovati nivo genetičke varijabilnosti proučavane populacije vuka Bosne i Hercegovine, za koji se očekuje da će biti u skladu sa rezultatima varijabilnosti koje su detektovane u prethodnim analizama u dinarsko - balkanskoj populaciji, u odnosu na ostale evropske populacije vuka;
4. populacija vuka Bosne i Hercegovine, kao i dinarsko - balkanska populacija vuka, pokazuju lokalnu strukturiranost i distribuciju mtDNK haplotipova u dvije haplogrupe, što je detektovano i za populaciju vuka na nivou Evrope;
5. populacija vuka Bosne i Hercegovine prošla je kroz genetičko usko grlo u skorijoj prošlosti, a istorijska demografska rekonstrukcija ukazuje da se ekspanzija haplogrupe 2 desila mnogo ranije u prošlosti u odnosu na ekspanziju haplogrupe 1, koja se veže za period posljednjeg glacijalnog maksimuma;
6. rezultati dobijeni u ovom istraživanju informativni su za uspostavljanje pravilnog menadžmenta vrste i kreiranja plana zaštite populacije vuka Bosne i Hercegovine.



# 5. MATERIJAL I METODE

## 5.1. MATERIJAL

U istraživanju su korišćeni uzorci mišićnog tkiva 79 jedinki vuka, sakupljenih na različitim lokalitetima na teritoriji Bosne i Hercegovine (Sl. 4). Uzorci mišićnog tkiva sakupljeni su u periodu od 2008. do 2017. godine, od jedinki koje su odstrijeljene tokom lova ili su slučajno nastradale (pored saobraćajnica i sl.); nijedna jedinka nije žrtvovana u cilju izrade disertacije. Nakon uzorkovanja, uzorci su konzervirani u 96% etanolu, u plastičnim kivetama zapremine 1,5-2 ml i čuvani na temperaturi od -20°C.



**Slika 4.** Karta lokaliteta sakupljenih i analiziranih uzoraka vuka (*Canis lupus*) sa područja Bosne i Hercegovine

## 5.2. METODE

### 5.2.1. Izolacija DNK

Amplifikaciji i analiziranju mikrosatelitskih lokusa i kontrolnog regiona mtDNK vuka, sa područja Bosne i Hercegovine, prethodila je ekstrakcija ukupne, genomske DNK. DNK je ekstrahovana iz uzoraka mišićnog tkiva metodom fenol-hloroform-izoamilalkohol (organske) ekstrakcije, modifikovanoj prema Sambrook i Russell (2001).

Postupak ekstrakcije započet je odmjeravanjem i maceriranjem oko 25 mg mišićnog tkiva na staklenoj podlozi, nakon čega je macerat prebačen u plastičnu, sterilnu kivetu, zapremine 1,5 ml. U kivetu sa maceratom dodato je 380 µl digestionog pufera (0,1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0), 10 µl rastvora proteinaze K (40mg/ml) i 10 µl β - merkaptetoetanol. Sadržaj svake kivete promiješan je na vorteksu i inkubiran 45 minuta na 65°C (na svakih 15 minuta sadržaj u kivetama je kratko promiješan na vorteksu). Nakon inkubacije, kivete sa sadržajem su centrifugirane 5 minuta na 12000 rpm, tokom čega se izdvojio supernatant (oko 400 µl) koji je prebačen u novu, sterilnu kivetu (1,5 ml). U svaku kivetu dodata je jedna zapremina fenola, sadržaj je ponovo promiješan na vorteksu, a zatim centrifugiran 4 minute na 12000 rpm, tokom čega se izdvojila gornja - vodena faza, koja je pažljivo prebačena (bez zadiranja u donju vodenu fazu) u novu sterilnu kivetu (1,5 ml). Dodata je jedna zapremina hloroform:izoamilalkohol (24:1) smješe, sadržaj je blago promiješan na vorteksu i centrifugiran 4 minuta na 12000 rpm, nakon čega se izdvojila gornja vodena faza (u slučaju da gornja - vodena faza nije bila dovoljno čista ponovljeni su koraci ispiranja fenolom i hloroform:izoamilalkohol smješom) koja je prebačena u novu sterilnu kivetu (1,5 ml). U nju je dodata 0,1 zapremina 3 M Na-acetata i dvije zapremine 95% etanola, prethodno rashlađenog na -20°C. Potom je izvršena precipitacija DNK, 20 minuta na -70°C, nakon čega je precipitat centrifugiran 20 minuta, na 12000 rpm. Etanol (dodat u prethodnom koraku) je nakon centrifugiranja odliven iz kiveta, a pelet je ispran sa 1 ml 70% rashlađenog etanola. Precipitat je zatim centrifugiran 5 minuta na 12000 rpm, nakon čega je etanol ponovo odliven. Pelet je osušen u termobloku, na 55°C, a sušenje je trajalo par minuta, dok etanol nije ispario. Nakon sušenja, pelet je resuspendovan u 50 µl 0,1xTE pufera (1M Tris-HCL, 0,5M EDTA pH 8,0, destH<sub>2</sub>O), a zatim inkubiran na 45-60°C, 1-2 minuta u cilju ubrzavanja rastvaranja peleta. Ekstrahovana DNK je pohranjena na -20°C.



Koncentracija i čistoća ekstrahovane DNK određena je pomoću BioSpec-nano spektrofotometra (Shimatzu, Japan), mjerenjem apsorbanci na 230 nm, 260 nm i 280 nm u cilju detekcije proteina i drugih kontaminata koji apsorbuju na talasnim dužinama manjim od 260 nm. Vrijednosti  $A_{260}/A_{280}$  u opsegu 1,7-2,0 ukazuju na optimalni kvalitet izolovane DNK (Glasel, 1995). Vrijednosti odnosa absorbance  $A_{260}/A_{280}$  ispod 1,8 ukazuju na kontaminaciju proteinima i/ili fenolom, dok vrijednosti odnosa absorbance  $A_{260}/A_{280}$  iznad 1,8 ukazuju na kontaminaciju RNK molekulama (Stephenson, 2010). Za sve uzorke pripremljena su radna razblaženja koncentracije 2 ng/ $\mu$ l (analiza mikrosatelita), odnosno, 50 ng/ $\mu$ l (analiza mtDNK).

### 5.2.2. Analiza mikrosatelita

Genotipizacija 79 uzoraka vuka sa područja Bosne i Hercegovine, izvršena je amplifikacijom nuklearnih, autozomalnih mikrosatelitskih lokusa, dostupnih u komercijalnom kompletu hemikalija - *The Canine Genotypes™ Panel 1.1* kit (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland). Navedeni komplet sadrži set hemikalija kojima se simultano, multipleks PCR reakcijom, amplifikuje 19 lokusa (18 mikrosatelitskih lokusa i Amelogenin - lokus za određivanje pola analiziranih jedinki) (Prilog 1), a preporučen je za upotrebu od strane ISAG-a (*Applied Genetics Committee of Companioning Animals of the International Society for Animal Genetics*, engl.). Navedeni kit je kreiran za analiziranje DNK iz dlake, pljuvačke i krvi pasa, sa ciljem njihove identifikacije i detekcije njihovog porijekla. S obzirom da vukovi i psi imaju isti broj hromozoma (78 hromozoma: 38 parova autozomalnih hromozoma i 2 polna hromozoma), te da su se međusobno razdvojili veoma skoro u evolutivnom pogledu (prije  $\leq$  16 300 godina (Pang i sar., 2009, Druzhkova i sar., 2013)) genomi navedenih vrsta su u visokom procentu slični tako da se veliki broj polimorfnih markera, razvijenih kod pasa, mogu direktno primijeniti u genetičkim istraživanjima vukova. Mikrosatelitski lokusi navedenog panela pokazali su se pogodnim za genetičke analize Canidae-a s obzirom na visok nivo polimorfizma i klasično mendelovsko nasljeđivanje, te veoma jednostavnu amplifikaciju iz DNK izolovane iz uzoraka mišićnog tkiva vuka u cilju populaciono - genetičkih studija (Druzhkova i sar., 2013).

Jedna multipleks PCR reakcija, zapremine 20  $\mu$ l, sadržavala je sljedeće komponente: 9  $\mu$ l master miksa (MgCl<sub>2</sub>, dNTP miks, 0,05 U/ $\mu$ l hot start Taq DNK polimeraza), 9  $\mu$ l prajmer miksa (direktni (F) i povratni (R) prajmeri za svaki lokus; jedan prajmer iz svakog para



prajmera obilježen je fluorescentnim bojama) i 2  $\mu$ L genomske DNK (2ng/ $\mu$ L). Uslovi PCR reakcije predstavljeni su u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Uslovi multipleks PCR amplifikacije 19 lokusa komercijalnog kita - *The Canine Genotypes™ Panel 1.1*

Korak	Vrijeme	Temperatura	Broj ciklusa
Inicijalni korak (denaturacija; aktivacija hot start Taq DNK polimeraze)	3 min	98°C	1x
<i>Denaturacija</i>	15s	98°C	
<i>Vezivanje prajmera</i>	75s	60°C	30x
<i>Elongacija</i>	30s	72°C	
Finalna elongacija	5 min	72°C	1x
Hlađenje	-	4°C	-

Vizualizacija PCR produkata (provjera uspješnosti reakcije i kvaliteta produkta), izvršena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Tokom pripreme gela, u smješu agaroze i 0,1xTAE pufera (2M trizma baza, 1M glacijalna sirćetna kiselina, 0,5M EDTA pH8,0) dodana je boja za gel *Roti-Safe GelStain* (Carl Roth GmbH+Co. KG, Njemačka). Uzorci su mješani sa 1  $\mu$ l 6x *Orange Loading Dye* (*ThermoScientific*, Litvanija), u svrhu vizualizacije DNK produkata na gelu. Veličina produkata provjerena je dodavanjem 1 $\mu$ l 100bp DNK markera (*ThermoScientific*, Litvanija). Na gel je, pored uzoraka koji su ispitivani, nanošena i negativna kontrola PCR reakcije u cilju provjere kontaminacije, te kontrolna DNK (koja se dobija u kompletu hemikalija) za verifikaciju uslova PCR reakcije i elektroforeze. Za elektroforezu, koja je sprovedena na sobnoj temperaturi, pri naponu od 140 V, korišćen je 1xTAE pufer. Vizualizacija produkata izvršena je pomoću UV transiluminatora, a gelovi su fotografisani digitalnim fotoaparatom.

Uspješno amplifikovani produkti razdvojeni su kapilarnom elektroforezom (fragmentna analiza) u cilju genotipizacije i daljnje analize na ABI3730xl sekvenceru (*Applied Biosystems, Foster City, Ca, SAD*), na Institutu za molekularnu medicinu u Helsinkiju, Finska. Priprema produkata za navedenu analizu podrazumijevala je dodavanje 11  $\mu$ l HiDi formamida i 0,3  $\mu$ l standarda (*GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, Ca, SAD*) u svaki produkt. Dodavanjem 500 LIZ standarda omogućena je precizna genotipizacija



amplifikovanih produkata. Genotipizacija produkata izvršena je u GeneMarker v2.6.7. (*Softgenetics, LLC State College, PA, SAD*) programskom paketu, a provjera grešaka genotipizacije urađena je ponavljanjem 10% svih genotipizacija, prema Bonin i sar. (2004).

### 5.2.3. Analiza kontrolnog regiona mtDNK

Amplifikacija dijela kontrolnog regiona analiziranog u istraživanju, koji se na osnovu kompletne sekvence mitohondrijalnog genoma vuka nalazi između 15413. i 15721. nukleotidne pozicije (Banka Gena br. [KT901460](#)), izvršena je PCR metodom, primjenom prajmera dizajniranih od strane Palomares i sar. (2002):

Direktni (*forward*) prajmer: CR1 (5'-CCACTATCAGCACCCAAAGC-3')

Povratni (*reverse*) prajmer: CR2R (5'-CCCGGAGCGAGAAGAGG-3')

PCR reakcija, zapremine 25  $\mu$ l, sadržavala je sljedeće komponente: 2,5  $\mu$ l 10x Taq pufera, 2,5  $\mu$ l smješe nukleotida (2mM), 1  $\mu$ l svakog prajmera (10 pM), 1,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (2,5mM), 1U Taq DNK polimeraze, 14,3  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O i 2  $\mu$ l genomske DNK (50ng/ $\mu$ l). Uslovi PCR reakcije predstavljeni su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Uslovi PCR amplifikacije dijela kontrolnog regiona mtDNK

Korak	Vrijeme	Temperatura	Broj ciklusa
Inicijalni korak (denaturacija)	5 min	95°C	1x
<i>Denaturacija</i>	<i>40s</i>	<i>94°C</i>	
<i>Vezivanje prajmera</i>	<i>50s</i>	<i>55°C</i>	30x
<i>Elongacija</i>	<i>1 min</i>	<i>72°C</i>	
Finalna elongacija	10 min	72°C	1x
Hlađenje	-	4°C	-

Vizualizacija PCR produkata (provjera uspješnosti reakcije i kvaliteta produkta), izvršena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Tokom pripreme gela, u smještu agaroze i 0,1xTAE pufera (2M trizma baza, 1M glacijalna sirćetna kiselina, 0,5M EDTA pH8,0) dodana je boja za gel *Roti-Safe GelStain* (Carl Roth GmbH+Co. KG, Njemačka). Uzorci su mješani sa 1  $\mu$ l 6x *Orange Loading Dye* (*ThermoScientific*, Litvanija), u svrhu vizualizacije DNK produkata na gelu. Veličina produkata provjerena je dodavanjem 1  $\mu$ l 100bp DNK markera



(*ThermoScientific*, Litvanija). U gel je nanošena i negativna kontrola u cilju provjere kontaminacije. Za elektroforezu, koja je sprovedena na sobnoj temperaturi i naponu od 100 V, korišćen je 1xTAE pufer. Vizualizacija fragmenata izvršena je pomoću UV transiluminatora, a gelovi su fotografisani digitalnim fotoaparatom.

Uspješno amplifikovani produkti su nakon provjere prečišćeni primjenom ExoSap seta hemikalija prema uputstvu proizvođača (*ThermoScientific*, Litvanija). Za svaki produkt sekvenciran je lanac umnožen *forward* prajmerom, na ABI3730xl sekvenceru (*Applied Biosystems*, Foster City, Ca, SAD), na Institutu za molekularnu medicinu u Helsinkiju, Finska, odnosno, u kompaniji *Macrogen Europe*, Holandija (<http://www.macrogen.com>).

### **5.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA O VARIJABILNOSTI MIKROSATELITA POPULACIJE VUKA BOSNE I HERCEGOVINE**

#### **5.3.1. Detekcija nultih alela**

Prvi korak u statističkoj analizi varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa podrazumijevao je detekciju prisustva nultih alela (Callen i sar., 1993), a za navedenu analizu primijenjen je MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout i sar., 2004) programski paket. Statistička značajnost dobijenih podataka utvrđena je primjenom testa permutacija (1000 permutacija), a vrijednosti su korigovane Boniferonijevom korekcijom p vrijednosti (Rice, 1989). Nulti aleli najčešće nastaju mutacijama graničnih regiona mikrosatelitskih lokusa, a kao posljedica dešava se da prajmer ne umnoži dati alel te se iz tog razloga lokus, na kome se nalazi mutirani alel, pogrešno očita kao homozigotan. Pored toga, ponekad može i slučajno da izostane amplifikacija jednog od alela istog lokusa te se, posljedično, pogrešno očitava homozigotni genotip. Ukoliko je frekvencija nultih alela u populaciji velika, podcjenjuje se ukupna heterozigotnost i povećava se homozigotnost (lažna homozigotnost) što može dovesti do prividnog odstupanja populacije od Hardi - Vajnbergove ravnoteže (HWE). Pored toga, nulti aleli mogu značajno uticati na izmjenu vrijednosti koeficijenta inbridinga ( $F_{IS}$ ) i indeksa fiksacije  $F_{ST}$  (Pemberton, 1995, Allendorf i Luikart, 2007), što može voditi stvaranju prividne strukturiranosti analiziranog uzorka.



### 5.3.2. Analiza genetičke varijabilnosti

Vrijednosti osnovnih parametara genetičke varijabilnosti: prosječan broj alela po lokusu ( $N_A$ ), uočene ( $H_O$ ) i očekivane ( $H_E$ ) heterozigotnosti, izračunati su u ARLEQUIN v.3.5.2 (Excoffier i Lischer, 2010) programskom paketu. Odstupanje učestalosti genotipova svakog lokusa od Hardy-Vajnbergove ravnoteže, neravnoteža vezanosti gena (LD - *linkage disequilibrium*, engl.) i vrijednosti koeficijenta inbridinga ( $F_{IS}$ ) izračunati su u istom programskom paketu. Testiranje značajnosti dobijenih rezultata je izvršeno primjenom testa permutacija, a vrijednosti su korigovane Boniferonijevom korekcijom p vrijednosti (Rice, 1989).

### 5.3.3. Analiza strukturiranosti populacije vuka Bosne i Hercegovine

Strukturiranost populacije vuka Bosne i Hercegovine analizirana je primjenom različitih multivarijantnih metoda statističke analize. Klaster analiza, zasnovana na Bajesovom pristupu kroz MCMC simulacije sprovedena je pomoću programskih paketa: STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard et al. 2007), TESS 2.3.1 (Chen i sar., 2007) i GENELAND v.4.0.5 (Guillot i sar., 2005) u okviru R programskog jezika (<http://www.R-project.org/>). Osnovni zadatak algoritama navedenih programskih paketa je određivanje broja genetičkih klastera (K), odnosno, potencijalnih subpopulacija analizirane populacije vuka, primjenom različitih modela srodnosti jedinki i različitih modela korelacije alela. Pored klaster multivarijantne analize, u cilju utvrđivanja strukturiranosti, sprovedena je i analiza glavnih komponenti primjenom DAPC i sPCA metoda u ADEGENET programskom paketu (Jombart, 2008, 2010) u okviru R programskog jezika (<http://www.R-project.org/>).

STRUCTURE programski paket primijenjen je sa ciljem raspoređivanja jedinki u određeni broj genetičkih klastera, bez prethodnih informacija o njihovoj geografskoj distribuciji. Mješoviti model (*admixture model*, engl.) primijenjen u analizi pretpostavlja da jedinke mogu imati miješano porijeklo, odnosno, dio genoma svake jedinke može biti naslijeđen od predaka koji su porijeklom iz različitih genetičkih klastera. Dodatni primijenjeni model, model koreliranih (zavisnih) frekvencija alela (*correlated allele frequencies model*, engl.) pretpostavlja da su frekvencije alela različitih klastera u određenom stepenu međusobno zavisne, stoga, donekle i slične. Navedeni model je odgovarajući u istraživanju populacija iste vrste jer omogućava bolje grupisanje blisko srodnih klastera/subpopulacija. Ostali parametri korišćeni u





STRUCTURE analizi predstavljeni su u Tabeli 3. Najvjerojatniji broj genetičkih klastera određen je prema najvišim srednjim vrijednostima *posterior* vjerovatnoća ( $\ln \Pr(X|K)$ ) (Pritchard i sar., 2000) i  $\Delta K$  metodi (Evanno i sar., 2005) u POPHELPER (<http://pophelper.com/>) R programskom paketu. U istom programskom paketu grafički su predstavljene srednje vrijednosti vjerovatnoće pripadnosti svake jedinke utvrđenim klasterima ( $Q$  - *individual membership coefficient*, engl.) - prethodno izračunate u CLUMPAK programskom paketu (Kopelman i sar., 2015).

U TESS programskom paketu, u cilju detekcije klastera, uključene su informacije o geografskoj distribuciji jedinki. U analizi su primijenjena oba modela srodnosti jedinki: *admixture* (BYM, CAR) i *No Admixture* model. *Admixture* model je osjetljiviji u slučajevima ravnomjerne geografske distribucije jedinki u uzorku, dok je *No Admixture* model manje osjetljiv u odnosu na izolaciju distancom (IBD) i omogućava detektovanje maksimalnog broja genetičkih klastera. U analizi je primijenjena Dirlehtova distribucija alelnih frekvencija, parametar  $\Psi$  (stepen uticanja geografskih podataka na raspoređivanje jedinki u klastera) podešen je na 0,6 (prema Chen i sar., 2007), a ostali parametri su predstavljeni u Tabeli 3. Broj genetičkih klastera određen je prema najvišim vrijednostima *log-likelihood* vjerovatnoća, te sumiranjem 20% najnižih DIC vrijednosti (*Deviance Information Criterion*, engl.) za svako  $K$  za koje su određene srednje vrijednosti koje su zatim predstavljene u koordinatnom sistemu u odnosu na maksimalnu vrijednost  $K$ . Optimalan broj klastera predstavljen je najnižom DIC vrijednošću (Durand i sar., 2009). Pored toga, detektovana je i stabilizacija vjerovatnoće pripadnosti koeficijenta  $Q$  u grafikonima (stabilizacija je postignuta kada se broj klastera prestao mijenjati, bez obzira na  $K$  maksimalno), a rezultati srednjih vrijednosti  $Q$  koeficijenta za detektovano  $K$ , izračunatih u CLUMPAK-u, grafički su interpretirani u POPHELPER programskom paketu. Pored toga izvršena je i interpolacija *log-likelihood* vjerovatnoća Krining metodom u okviru R paketa "*maps*".

GENELAND, kao i TESS, koristi informacije o geografskoj distribuciji jedinki prilikom određivanja broja klastera. Analiza je sprovedena primjenom oba modela korelacije alela (*correlated* i *uncorrelated*) prema parametrima predstavljenim u Tabeli 3. *Correlated* model je adekvatniji za detekciju fine strukture, ali ima nestabilniji algoritam u odnosu na *uncorrelated* model. Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K$ ) određen je na osnovu: histograma



procijenjene vrijednosti K za svako ponavljanje, najveće srednje *posterior* vjerovatnoće, te mape pripadnosti jedinki određenom genetičkom klasteru. Nakon toga, u cilju provjere geografske koherentnosti detektovanih klastera analiza je ponovljena 10 puta sa fiksnom K vrijednošću (prethodno procijenjena K vrijednost) i neizmijenjenim parametrima, a kao najbolji rezultat izabran je onaj sa najvećom srednjom vrijednošću *posterior* vjerovatnoće.

**Tabela 3.** Parametri koji su primijenjeni u analizi strukturiranosti populacije vuka Bosne i Hercegovine u STRUCTURE, TESS i GENELAND programskim paketima.

Programski paket	Primijenjeni model	Broj pretpostavljenih klastera (K)	Broj ponavljanja za svako K
STRUCTURE	<i>Admixture/Correlated allele frequencies</i> 1 000 000 MCMC 100 000 burn-in	1-5	10
	<i>No admixture model</i>		
TESS	<i>Admixture models (CAR, BYM)</i> 50 000 sweeps 10 000 burn-in	2-5	10
	<i>Uncorrelated frequencies</i> <i>Correlated frequencies</i>		
GENELAND	<i>Spatial model - coordinate uncertainty (nepouzdanost koordinata) 10 km</i> <i>Maximum rate of Poisson process = broj uzoraka (79)</i>	1-5	10
	<i>Maximum number of nuclei = 3x veličina uzorka (237)</i> 1 000 000 iteracija <i>Thining 100; post process 5 000</i> <i>Null alleles: true</i>		

Diskriminantna analiza glavnih komponenti (DAPC - *Discriminant Analysis of Principal Components*, engl.) primijenjena je u cilju detekcije broja genetičkih klastera prema Bajesovom informacionom kriterijumu (BIC - *Bayesian information criterion*, engl.). Ovom metodom nastoji se objasniti genetička varijabilnost između grupa (pri čemu se ne obraća pažnja na unutar - grupnu varijabilnost) analizom sintetičkih varijabli (glavne komponente; PC - *principal components*, engl.). Značajnost metode je u tome što ne zahtijeva HWE i LE (*linkage equilibrium*, engl.) između analiziranih populacija, za razliku od npr. STRUCTURE analize čiji algoritmi pretpostavljaju da je analizirana populacija u HWE i LE jer u suprotnom može doći do ispoljavanja pogrešnih rezultata. Analiza je zasnovana na sekvencijalnoj klasterizaciji k - srednjih vrijednosti (*k - means*, engl.) uz simultano povećanje k vrijednosti i



poređenje sa BIC, a sprovedena je bez informacija o pripadnosti jedinki pojedinačnim populacijama. Za identifikaciju klastera, korišćena je funkcija *find.clusters* kojom su genetički podaci prvo transformisani, primjenom PCA metode u PC (zadržan je maksimalan broj PC) čime je obezbijedeno: nepovezanost varijabli koje se u nastavku analiziraju, njihova redukcija (broj varijabli mora biti manji od uzorka) i ubrzavanje analize. Zatim, analiziran je dijapazon k vrijednosti uz računanje BIC, a optimalan broj klastera određen je prema najnižoj BIC vrijednosti. Pripadnost jedinki detektovanim klasterima i njihove *posterior* vjerovatnoće određene su diskriminantnom analizom glavnih komponenti, primjenom funkcije *dapc*, a da bi se izbjeglo precjenjivanje vrijednosti određen je optimalan broj zadržanih glavnih komponenti utvrđivanjem  $\alpha$  - vrijednosti (mjera razlike između uočene i nasumične diskriminacije).

sPCA metoda pored *adegenet*, zahtijeva primjenu *ade4* (Jombart, 2008) i *spdp* (Bivand, 2007) R-programskih paketa. Ova metoda predstavlja modifikovanu PCA metodu koja u istraživanju kriptične populacione strukture, pored podataka o varijansama između različitih entiteta, dodatno koristi i informacije o prostornoj distribuciji jedinki. Analiza se zasniva na načinu modelovanja prostornih informacija pomoću *connection network* mreže (Legendre i Legendre, 1998), a zatim se na osnovu Moranovog I indeksa prostorne autokorelacije (Moran, 1948, 1950) detektuje prostorni obrazac genotipova. Rezultat se interpretira vizualizacijom globalne i lokalne strukture (Thioulouse i sar., 1995). Globalna struktura je grafički predstavljena pozitivnim *eigenvalues* vrijednostima koje ukazuju na pozitivnu prostornu autokorelaciju (*positive spatial correlation*, engl.) i daje informacije o klinalnoj raspodjeli genetičke varijabilnosti. Ukoliko je prisutna globalna struktura to znači da su jedinke koje su geografski bliže i genetički sličnije. Lokalna struktura je predstavljena negativnim *eigenvalues* vrijednostima koje ukazuju na negativnu prostornu autokorelaciju (*negative spatial autocorrelation*, engl.) i veću genetičku različitost između susjednih jedinki. U analizi prostorne strukturiranosti populacije vuka Bosne i Hercegovine sPCA metodom primijenjen je *connection network* tip 1, baziran na *Delaunay*-evoj triangulaciji. Za provjeru signifikantnosti globalne i lokalne strukture primijenjena su 2 Monte Karlo permutaciona testa (9999 permutacija).

U cilju sagledavanja položaja vuka Bosne i Hercegovine u širem geografskom kontekstu, dodatno su sprovedene analize prostornog obrasca genetičke varijabilnosti, uključivanjem



jedinki sa teritorije Srbije, koje čine kontinuiranu dinarsko - balkansku populaciju, u analizirani set podataka. Novi, dinarsko - balkanski set podataka sastojao se iz 214 jedinki, a uključivao je: 79 jedinki vuka Bosne i Hercegovine koje su analizirane u istraživanju, 74 jedinke iz Srbije (Djan i sar., 2016), te 45 jedinki sa područja Srbije, koje nisu prethodno analizirane (Prilog 2). Za amplifikaciju mikrosatelitskih lokusa jedinki iz Srbije upotrebljen je isti komplet hemikalija kao i za uzorak populacije vuka Bosne i Hercegovine. Kao *a priori* korak u analizama prostorne strukture novog seta podataka izvršena je detekcija nulnih alela pomoću MICRO-CHECKER-a. Parametri korišćeni u analizama prostornog obrasca genetičke varijabilnosti novog seta podataka, primjenom svih prethodno korišćenih programskih paketa, ostali su isti kao i u analizi prostornog obrasca genetičke varijabilnosti vuka Bosne i Hercegovine (Tab. 3).

Genetička diferencijacija vukova Bosne i Hercegovine, te dinarsko - balkanskog seta podataka, dodatno je analizirana izračunavanjem indeksa genetičke diferencijacije ( $F_{st}$ ), a pored toga, sprovedena je i analiza molekularne varijanse (AMOVA - *analysis of molecular variance*, engl.) u cilju procjene distribucije genetičke varijabilnosti unutar i između populacija (Excoffier i sar., 1992). Obje analize sprovedene su u ARLEQUIN programskom paketu, a statistička značajnost dobijenih rezultata određena je testom permutacija (10 000 permutacija).

#### **5.3.4. Određivanje efektivne veličine populacije ( $N_e$ )**

LDNe v1.31 (Do i sar., 2014) programski paket primijenjen je u svrhu određivanja efektivne veličine ( $N_e$ ) populacije vuka sa teritorije Bosne i Hercegovine. Navedenim programskim paketom određen je LD analiziranog uzorka uz korekciju grešaka koje se javljaju zbog prisustva rijetkih alela, tako da su iz analize isključeni aleli sa frekvencijom manjom od 0,02 (Waples i Do, 2010). Rezultati analize provjereni su *Jaccknife* metodom ponovnog uzorkovanja u intervalu povjerenja od 95%.

#### **5.3.5. Detekcija prolaska populacije kroz genetičko usko grlo**

Detekcija prolaska populacije vuka Bosne i Hercegovine kroz genetičko usko grlo u skorijoj prošlosti na osnovu varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa, analizirana je primjenom BOTTLENECK v.1.2.02 (Cornuet i Luikart, 1996) programskog paketa. BOTTLENECK



program računa za svaki lokus u populaciji vrijednosti uočene heterozigotnosti ( $H_o$ ), broj alela ( $k_o$ ) i broj genskih kopija ( $n$ ) pod pretpostavkom ekvilibrijuma između mutacija i genetičkog drifta (*mutation - drift equilibrium*, engl.), za različite modele mutacije mikrosatelitskih lokusa (objašnjeno u poglavlju Pregled literature: mikrosatelitski lokusi). Dodatno, u programu se određuje standardna devijacija (SD) očekivane ravnoteže heterozigotnosti pomoću koje se zatim računa standardizovana devijacija ( $DH/sd = H_e - H_{eq}/sd$ ) za svaki lokus i vjerovatnoća ( $p$ ) ove devijacije (Piry i sar., 1999). Pozitivna vrijednost  $DH/sd$  ukazuje na postojanja povećanja heterozigotnosti, a negativna na deficit heterozigotnosti. U analiziranju prolaska populacije vuka Bosne i Hercegovine kroz genetičko usko grlo u skorijoj prošlosti, primjenjena su sva tri modela mutacija, sa varijansom TPM modela od 30 i zastupljenošću 70% SMM u TPM modelu mutacija, uz 10 000 iteracija. Značajnost dobijenih rezultata, odnosno procjena prolaska populacije kroz genetičko usko grlo, određuje se *Sign*, *Standardized differences* i *Wilcoxon* testovima (Cornuet i Luikart (1996), koji izračunavaju da li u populaciji postoji značajno povećanje heterozigotnosti, što ukazuje na skorašnji prolazak populacija kroz genetičko usko grlo. Ukoliko je populacija u ravnoteži, u nekim lokusima će postojati povećanje, a u nekim smanjenje heterozigotnosti. U ovom istraživanju je primjenjen *Wilcoxon* test, s obzirom da se on predlaže kao najpogodniji u slučaju kada je broj analiziranih lokusa manji od 20 (Luikart i Cornuet, 1998).

### 5.3.6. Analiza srodstva

Srodstvo između jedinki analizirane populacije vuka sa područja Bosne i Hercegovine, analizirano je u KINALYZER programskom paketu, dostupnom u vidu internet programskog paketa (<http://kinalyzer.cs.uic.edu/index.php>). U navedenom programskom paketu, razvijenom za kodominantne markere poput mikrosatelita, vrši se rekonstrukcija punih srodnika (*full sibling*, engl.) bez prethodnih informacija o roditeljima. Za razliku od ostalih programskih paketa koji se primjenjuju u analizi srodstva, KINALYZER ne zahtijeva informacije o frekvenciji alela u populaciji, te ne kreira pretpostavke u odnosu na način/sistem parenja vrste. Rekonstrukcija srodstva u navedenom programskom paketu, vrši se primjenom *2-Allele Set Cover* i *Greedy Consensus* pristupa. *2-Allele Set Cover* pristupom, primjenjenim u ovom istraživanju, a koji je zasnovan na jednostavnom Mendelovom pravilu nasljeđivanja alela diploidnih organizama - potomak nasljeđuje po alel svakog lokusa, od svakog roditelja,



određen je najmanji broj grupa srodnika tehnikama kombinatorijalne optimizacije<sup>10</sup> (Ashley i sar., 2009).

---

<sup>10</sup> *Kombinatorijalna optimizacija predstavlja klasu problema gdje je kvalitativna (kombinatorijalna) struktura bitnija od numeričkih vrijednosti. Cilj navedenih problema je pronaći soluciju koja optimizuje (minimizira/maksimizira) rezultat/riješnje.*

## 5.4. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA O VARIJABILNOSTI MITOHONDRIJALNE DNK POPULACIJE VUKA BOSNE I HERCEGOVINE

### 5.4.1. Poređenje i analiziranje sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK vuka

U cilju utvrđivanja homologije nukleotida i detektovanja polimorfizama, uspješno sekvencirani dijelovi kontrolnog regiona mtDNK vuka Bosne i Hercegovine poravnati su (*multiple alignment*, engl.) primjenom ClustalW algoritma (Thompson i sar., 1997) implementiranom u BioEdit v.7.7.0 (Hall, 1999) programskom paketu. Sekvence su analizirane i korigovane provjerom hromatograma, nakon čega su poređene sa sekvencama haplotipova navedenog regiona mtDNK vuka koji su do sada detektovani na nivou Evrope, a preuzeti su iz Banke Gena (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, engl., baza podataka). Broj sekvenci svakog preuzetog haplotipa određen je prema podacima iz objavljenih publikacija (Vilà i sar., 1999, Randi i sar., 2000, Flagstad i sar., 2003, Valiere i sar., 2003, Gomerčić i sar., 2010, Pilot i sar. 2010, Baltrūnaite i sar., 2013, Hindrikson i sar., 2013, Djan i sar., 2014, Jansson i sar., 2014, Koblmüller i sar., 2016, Ersmark i sar., 2016, Montana i sar., 2017, Pires i sar., 2017) (Prilog 3). Finalni - evropski set sastojao se iz ukupno 1640 sekvenci: 56 sekvenci vukova iz ovog istraživanja, 49 neobjavljenih sekvenci kontrolnog regiona mtDNK vuka sa područja Srbije, te 1535 preuzetih sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK vuka sa područja Evrope. Nakon poravnanja, sekvence navedenog seta su skraćene na konačnu dužinu od 225 bp.

Vrijednosti osnovnih parametara genetičke varijabilnosti: broj haplotipova (h), diverzitet haplotipova (Hd), diverzitet nukleotida ( $\pi$ ) i prosječan broj nukleotidnih razlika (k) određene su u DnaSp 5 (Rozas i sar., 2003) programskom paketu.

### 5.4.2. Filogeografska analiza na osnovu mtDNK haplotipova vuka

Filogeografska analiza na osnovu haplotipova dijela kontrolnog regiona mtDNK vuka urađena je sa ciljem detektovanja filogeografske strukture, te rasvjetljavanja filogeografskih odnosa vukova Bosne i Hercegovine u evropskom kontekstu. Ova analiza je sprovedena konstrukcijom filogenetskog stabla primjenom Bajesove metode, čemu je prethodilo određivanje evolutivnog modela koji najbolje objašnjava način nukleotidnih promjena analiziranih sekvenci. Evolutivni model određen je u MEGA v. 6 (Kumar i sar., 2004)

programskom paketu primjenom Bajesovog informacionog kriterija (BIC), a kao najadekvatniji pokazao se *Hasegawa - Kishino - Yano* model (HKY; Hasegawa i sar., 1985), koji dozvoljava različite stope transverzija i tranzicija, sa *Gamma* distribucijom stope varijacije između nukleotidnih pozicija. Filogenetsko stablo je konstruisano primjenom MrBayes v.3.2 (Ronquist i sar, 2012) programskog paketa. U analizi, simultano su generisana dva MCMC lanca, broj generacija - neophodan za održavanje stabilne distribucije dovoljno dugo nakon konvergencije - podešen je na 10 000 000, *burn in* vrijednost je obuhvatala prvih 10% iteracija, a svaka 100-ta iteracija je sačuvana. U Tracer v.1.5 (Rambaut i Drummond, 2007) programskom paketu izvršeno je sumiranje rezultata analize i provjera kompatibilnosti parametara. Kao outgrupa u analizi korišćena je sekvenca kojota (*Canis latrans*, Banka Gena br. DQ480510), a analiza je sprovedena na CIPRES internet platformi (<http://www.phylo.org/>) u cilju prevazilaženja tehničkih ograničenja snage računara. Detektovano stablo vizualizovano je i editovano u FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012) programskom paketu. Potvrda pouzdanosti položaja grana konstruisanog stabla izvršena je na osnovu *posterior* vjerovatnoća; vrijednosti sa *posterior* vjerovatnoćom preko 90% smatrane su odgovarajućima za potvrdu pouzdanosti.

Filogeografska analiza haplotipova vuka Evropskog seta sekvenci sprovedena je i konstrukcijom Median - Joining mreže (*MJ network*, engl.) u PopArt v.1.7 (Bandelt i i sar., 1999) programskom paketu, gdje je kao outgrupa korišćena ista sekvenca kojota kao i u konstrukciji filogenetskog stabla. Mutacioni koraci između detektovanih haplotipova predstavljeni su kosim, kratkim linijama koje se nalaze na punim linijama koje povezuju haplotipove. Pored toga, u istom programskom paketu, kreirani su kružni grafikoni koji prikazuju zastupljenost svih detektovanih haplotipova vuka u okviru proučavane države/regije na nivou Evrope i predstavljeni su na mapi.

Za haplogrupe, detektovane konstruisanjem Bajesovog filogenetičkog stabla i MJ mreže, izračunati su osnovni parametri genetičke varijabilnosti u DnaSp programskom paketu, a varijabilnost između i unutar definisanih haplogrupa određene su analizom molekularne varijanse (AMOVA) (Excoffier i sar.,1992) u ARLEQUIN programskom paketu. U istom programskom paketu na osnovu prosječnog broja nukleotidnih razlika (*pairwise differences*, engl.) određena je vrijednost indeksa genetičke diferencijacije ( $\Phi_{st}$ ), a statistička značajnost rezultata određena je testom permutacija (10 000 permutacija).





### 5.4.3. Rekonstrukcija demografskih promjena populacije vuka Evrope

Rekonstrukcija demografskih promjena populacije vuka na nivou Evrope sprovedena je analizom *mismatch* distribucije u ARLEQUIN programskom paketu, te primjenom Bajesove skyline plot metode (BSP – *Bayesian skyline plot*, engl.) u BEAST v1.8.0 (Drummond i sar., 2012) programskom paketu.

*Mismatch* analiza, zasnovana na analizi distribucije parova nukleotidnih razlika, sprovedena je na kompletnom setu podataka, te definisanim haplogrupama sa ciljem utvrđivanja statistički značajnog odstupanja parametara *mismatch* distribucije u odnosu na očekivane vrijednosti, pod pretpostavkom modela nagle ekspanzije (*sudden expansion model*, engl.). Procjena *mismatch* odstupanja izvršena je na osnovu statistički značajnih rezultata vrijednosti sume kvadratnih odstupanja (SSD - *sum squared deviations*, engl.). Dodatno, u cilju uvrđivanja demografske ekspanzije sprovedeni su testovi selektivne neutralnosti: Tajima's D test (Tajima, 1989) i Fu's Fs test (Fu, 1997), kako za kompletan uzorak, tako i za detektovane haplogrupe pojedinačno. Statistički značajne negativne D i Fs vrijednosti testova neutralnosti predstavljaju pokazatelj nagle ekspanzije populacije.

Bajesova skyline plot (BSP - *Bayesian skyline plot*, engl.) metoda predstavlja grafički prikaz istorijske efektivne veličine populacije u funkciji vremena. Navedena metoda je primjenjena u cilju rekonstrukcije demografske istorije vuka na nivou Evrope, odnosno, u cilju detekcije perioda izmjene haplogrupa vuka I i II na navedenoj teritoriji, a sprovedena je u BEAST v1.8.0 (Drummond i sar., 2012) programskom paketu. Analiza je sprovedena za obje detektovane haplogrupe, pri čemu je za svaku haplogrupu kreiran set od 100 slučajno odabranih sekvenci u okviru analizirane haplogrupe, sa ciljem prevazilaženja ograničenja računara. Za oba seta sekvenci uradjene su po tri uzastopne analize nakon čega su dobijeni output fajlovi koji su kombinovani u LogCombiner v.1.8.0 programskom paketu (u okviru BEAST programskog paketa), u po jedan jedinstveni log i tree fajl, koji su nakon toga analizirani u Tracer programskom paketu, u kome su kreirani i BSP za svaku haplogrupu. Za konstrukciju BSP obje haplogrupe odabran je *relaxed lognormal clock* model uz mutacionu stopu za kontrolni region mtDNK vuka ( $\mu$ ) od  $2.9 \times 10^{-6}$  po nukleotidu, po godini, prema postojećim literaturnim podacima (Pilot i sar., 2010), uz pretpostavku konstantne populacione veličine kroz vrijeme - modela koji se pokazao najadekvatnijim za objašnjavanje veza između



jedinki iste vrste prema Drummond i Rambaut (2007). Mutacioni model koji najbolje objašnjava nukleotidne supstitucije analiziranih sekvenci u predstavljenoj analizi je HKY + G model, određen u MEGA programskom paketu. Dužina analize oba seta sekvenci iznosila je 100 miliona iteracija, od kojih je prvih 10% odbačeno kao *burn-in*, a parametri modela su uzorkovani na svakih 1000 generacija.

# 6. REZULTATI

## 6.1. VARIJABILNOST MIKROSATELITA POPULACIJE VUKA BOSNE I HERCEGOVINE

U ukupnom uzorku od 79 jedinki vuka sa teritorije Bosne i Hercegovine uspješno su amplifikovani svi mikrosatelitski lokusi i amelogenin gen, na osnovu koga je utvrđeno da je uzorak sastavljen iz 38 ženki (0,48%) i 41 mušjaka (0,52%).

Statistički značajno prisustvo nultih alela u setu podataka vuka Bosne i Hercegovine detektovano je za 6 mikrosatelitskih lokusa: AHTk211, INRA21, AHTh260, AHT121, FH2054 i AHTh171. S obzirom da statistički značajno prisustvo nultih alela može uticati na dobijanje pogrešnih rezultata osnovnih parametara genetičke varijabilnosti (smanjenje heterozigotnosti, povećanje inbridinga, odstupanje od HWE), te u cilju komparacije rezultata, analize genetičke varijabilnosti sprovedene su sa (Prilog 4) i bez (Tab. 4) navedenih lokusa. Uočena je razlika u dobijenim rezultatima, te su sve daljnje analize sprovedene na setu od 12 mikrosatelitskih lokusa za koje nije utvrđeno statistički značajno prisustvo nultih alela.

### 6.1.1. Genetička varijabilnost populacije vuka Bosne i Hercegovine

Analizom genetičke varijabilnosti proučavanog uzorka utvrđeno je da je svih 12 lokusa, uključenih u daljnje analize - polimorfno. Ukupno su detektovana 103 alela, najmanji broj alela ( $N_A=6$ ) nađen je u lokusu REN162C04, a najveći ( $N_A=12$ ) u lokusu AHT137, pri čemu srednja vrijednost ukupnog broja alela iznosi 8,58. Srednja vrijednost uočene heterozigotnosti ( $H_o=0,73$ ) manja je od srednje vrijednosti očekivane heterozigotnosti ( $H_e=0,76$ ), a statistički značajno odstupanje od HWE detektovano je samo u jednom lokusu (REN54P11). Ukupno 3/64 kombinacije genotipova pokazale su statistički značajnu neravnotežu vezanosti gena. Nije uočeno statistički značajno povećanje koeficijenta inbridinga (Tab. 4).

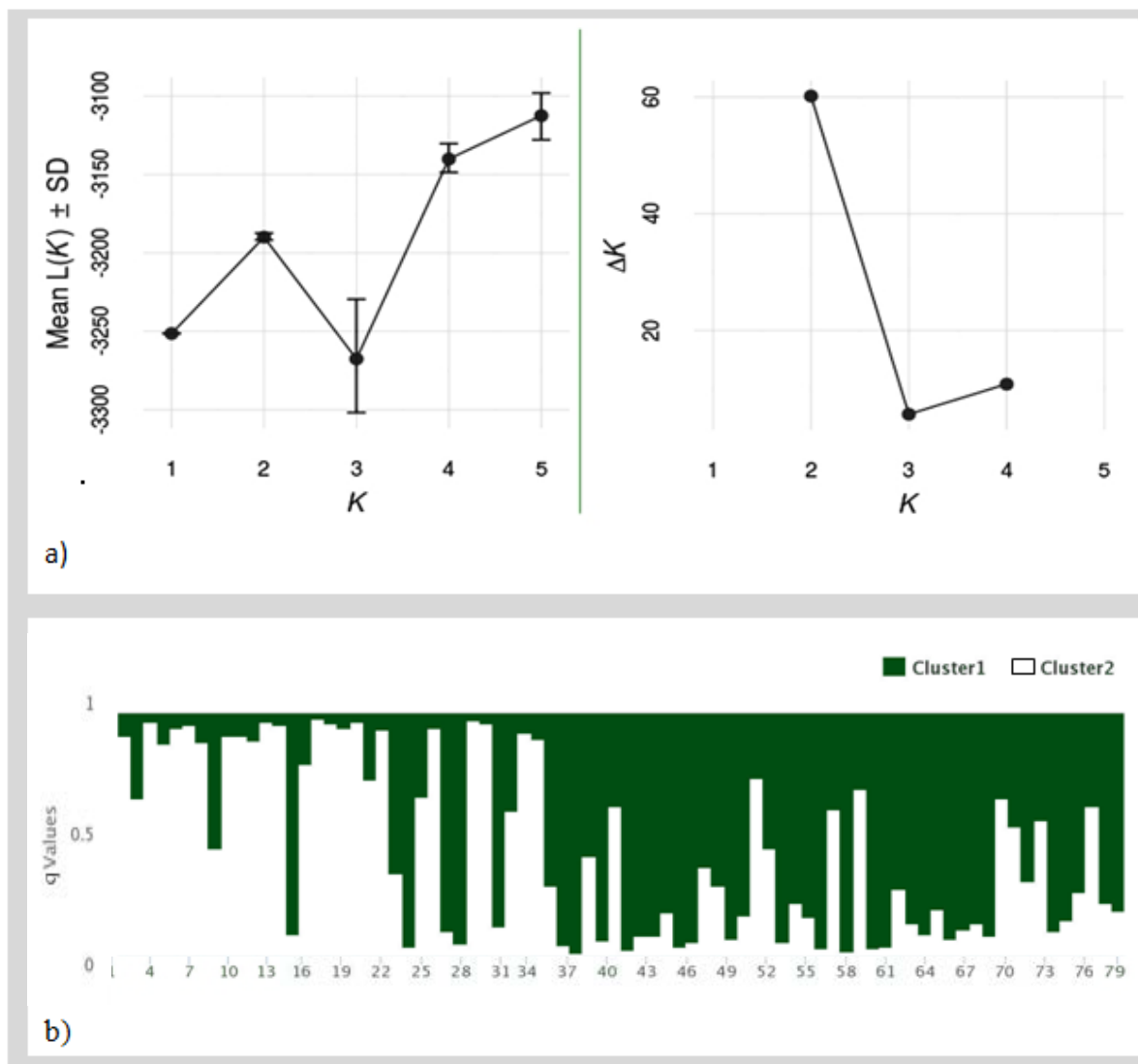
**Tabela 4.** Vrijednosti osnovnih genetičkih parametara populacije vuka (*Canis lupus*) Bosne i Hercegovine utvrđene analizom polimorfnosti mikrosatelita.

Lokus	$N_A$	$H_o$	$H_e$	HWE	$F_{IS}$
<b>CXX279</b>	9	0,6962	0,7626	-	0,0876
<b>REN169O18</b>	9	0,7088	0,6883	-	-0,0299
<b>INU055</b>	8	0,7215	0,7483	-	0,0361
<b>REN54P11</b>	8	0,6962	0,7628	*	0,0878
<b>AHT137</b>	12	0,8734	0,8729	-	-0,0005
<b>REN169D01</b>	10	0,8227	0,8709	-	0,0556
<b>AHTk253</b>	7	0,6835	0,7617	-	0,1032
<b>INU005</b>	11	0,8354	0,8572	-	0,0255
<b>INU030</b>	8	0,7848	0,7216	-	-0,0880
<b>FH2848</b>	7	0,6708	0,7177	-	0,0656
<b>REN162C04</b>	6	0,5189	0,5620	-	0,0770
<b>REN247M23</b>	8	0,8354	0,8501	-	0,0173
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>8,583</b>	<b>0,7373</b>	<b>0,7647</b>	-	<b>0,0364</b>

$N_A$  - broj alela po lokusu,  $H_o$  - uočena heterozigotnost,  $H_e$  - očekivana heterozigotnost,  $HWE$  - Hardy - Weinberg ekvilibrijum,  $F_{IS}$  - koeficijent inbridinga; - nije statistički značajno, \* $p < 0.05$  statistički značajno nakon Boniferonijeve korekcije p vrijednosti.

### 6.1.2. Strukturiranost populacije vuka Bosne i Hercegovine

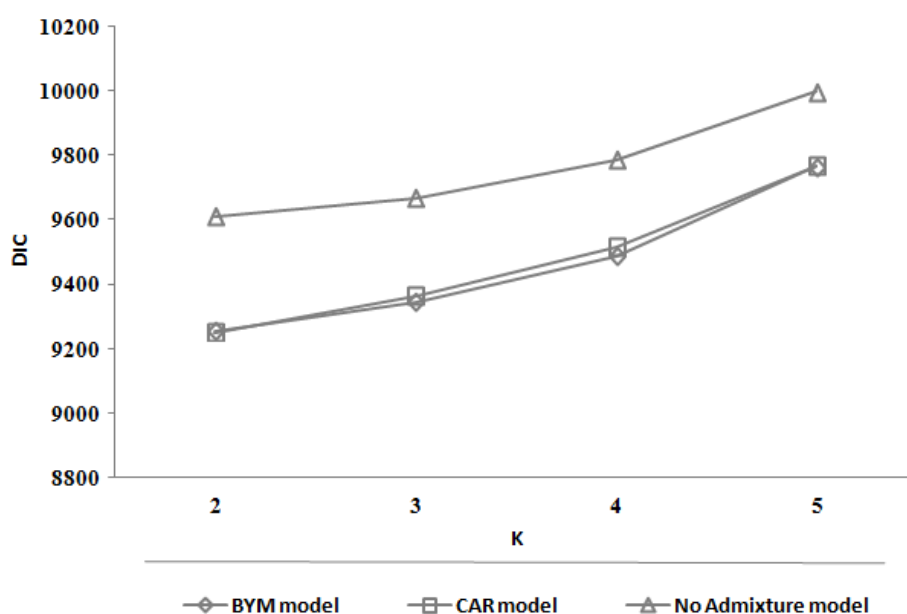
STRUCTURE analizom u populaciji vuka Bosne i Hercegovine, na osnovu najviših srednjih vrijednosti *posterior* vjerovatnoća ( $\ln \Pr(X|K)$ ) i  $\Delta K$  metode, detektovana su dva ( $K=2$ ) genetička klastera (Sl. 5a). Na grafikonu (Sl. 5b) jedan genetički klaster je predstavljen bijelom bojom i prema vrijednostima  $q$  koeficijenta ( $q \geq 0,8$ ) pripadaju mu 22 jedinke (27,8%) koje su uglavnom distribuirane u istočnom i jugoistočnom dijelu Bosne i Hercegovine (Prilog 5a). Drugi genetički klaster je predstavljen zelenom bojom i prema vrijednostima  $q$  koeficijenta ( $q \geq 0,8$ ) pripada mu 29 jedinki (36,7%) koje su distribuirane u ostalim dijelovima navedene teritoriji (Prilog 5a). 28 jedinki (35,4%) pokazuje vrijednosti  $q$  koeficijenta koje su manje od 0,8 ( $q < 0,8$ ) te se ne mogu pouzdano svrstati ni u jedan od detektovanih genetičkih klastera i čine grupu jedinki u admiksiji.



**Slika 5.** a) Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K=2$ ) u populaciji vuka Bosne i Hercegovine detektovanih u STRUCTURE analizi na osnovu najviših srednjih vrijednosti posterior vjerovatnoća ( $\ln Pr(X/K)$ ) i  $\Delta K$  metode b) Grafički prikaz pripadnosti jedinki pretpostavljenim genetičkim klasterima na osnovu srednjih vrijednosti pripadnosti jedinki ( $q$  koeficijent;  $q \geq 0,8$ ). Genetički klasteri su predstavljeni različitim bojama. Jedan genetički klaster je predstavljen bijelom bojom i prema  $q$  koeficijentu ( $q \geq 0,8$ ) pripada ju mu 22 jedinke (27,8%) (1-2, 4-8, 10-14, 16-20, 22, 26, 29- 30, 33- 34). Drugi genetički klaster je predstavljen zelenom bojom i prema  $q$  koeficijentu ( $q \geq 0,8$ ) pripada mu 29 jedinki (36,7%) (15, 24, 27-28, 31, 36- 37, 39, 41-46, 49, 50, 52, 55, 57, 59-60, 62-63, 65-68). Jedinke koje imaju  $q < 0,8$  se smatraju jedinkama u admiksiji i ukupno ih je 28 (35,4%) (3, 9, 21, 23, 25, 32, 35, 38, 40, 47- 48, 52, 51, 53-54, 56, 58, 61, 64, 69- 79).

Detektovani genetički klasteri se sporadično - geografski preklapaju, ali primjetno je da jedinke iz istočnog i jugoistočnog regiona Bosne i Hercegovine većinski formiraju jedan zajednički klaster, dok se jedinke drugog detektovanog klastera, koje su distribuirane u ostalim dijelovima Bosne i Hercegovine, prostorno preklapaju sa jedinkama u admiksiji (Prilog 5a).

Analizom prostornog obrasca genetičke varijabilnosti proučavanog uzorka sprovedenoj u TESS programskom paketu primjenom sva tri modela srodnosti jedinki i na osnovu najniže vrijednosti DIC, uočena je distribucija vukova Bosne i Hercegovine u dva genetička klastera ( $K=2$ ) (Sl. 6), kao i u STRUCTURE analizi.



**Slika 6.** Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K=2$ ) u populaciji vuka Bosne i Hercegovine detektovanih u TESS analizi na osnovu najnižih vrijednosti DIC

Svrstavanjem jedinki, primjenom TESS analize, u pretpostavljene genetičke klastere na osnovu srednje vrijednosti pripadnosti jedinki detektovanim klasterima ( $q \geq 0,8$ ), uočeno je da jedinke imaju sličan obrazac grupisanja kao i u STRUCTURE analizi. Grafički prikaz rezultata TESS analize odgovara prikazu STRUCTURE analize, gdje je jedan genetički klaster predstavljen bijelom bojom, a drugi zelenom bojom. Rezultati TESS analize ukazuju da se jedinke iz istočnog dijela Bosne i Hercegovine uglavnom grupišu u jedan genetički klaster



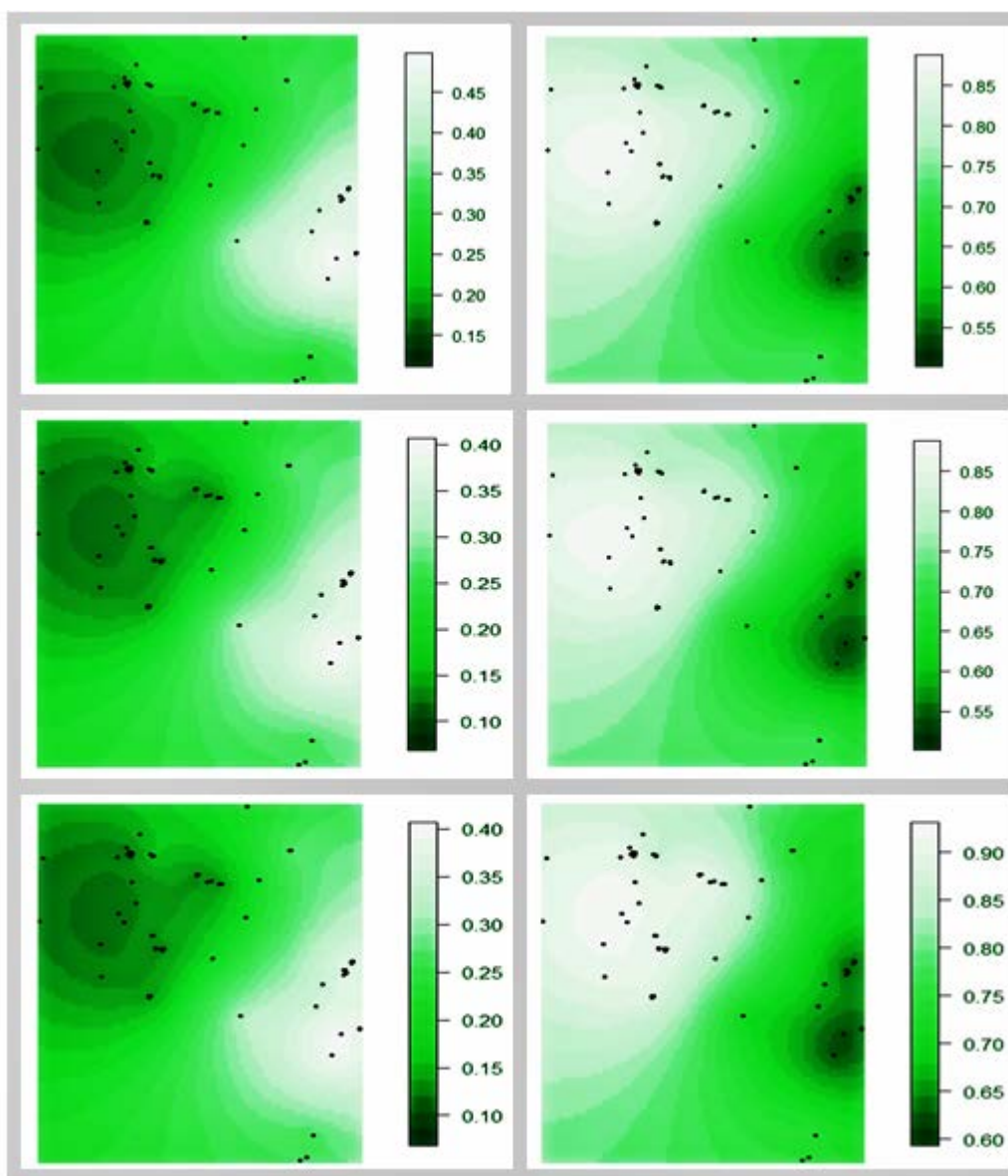
(bijeli dio grafikona), a jedinke iz ostalih dijelova Bosne i Hercegovine većinski u drugi genetički klaster (zeleni dio grafikona) (Prilog 5b, 5c).



**Slika 7.** Grafički prikaz pripadnosti jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine detektovanim genetičkim klasterima u TESS analizi, primjenom sva tri modela srodnosti jedinki (redno: BYM, CAR i No Admixture modeli) na osnovu srednjih vrijednosti pripadnosti jedinki određenom genetičkom klasteru ( $q$  koeficijent;  $q \geq 0,8$ ). Genetički klasteri su predstavljani različitim bojama. Jedan genetički klaster je predstavljen bijelom bojom i prema  $q$  koeficijentu ( $q \geq 0,8$ ) pripada mu 13 jedinki (20,2%) (BYM i CAR model: 5- 6, 8-10, 12- 13, 16- 22), a prema No Admixture modelu 14 jedinki (17,7%) (5-10, 12-13, 16-20, 22). Drugi genetički klaster je predstavljen zelenom bojom i prema  $q$  koeficijentu ( $q \geq 0,8$ ) pripada mu 49 jedinki (64,5%) prema BYM i CAR modelima (2, 4, 11, 23, 24, 27, 29-41, 43-49, 51-55, 57,

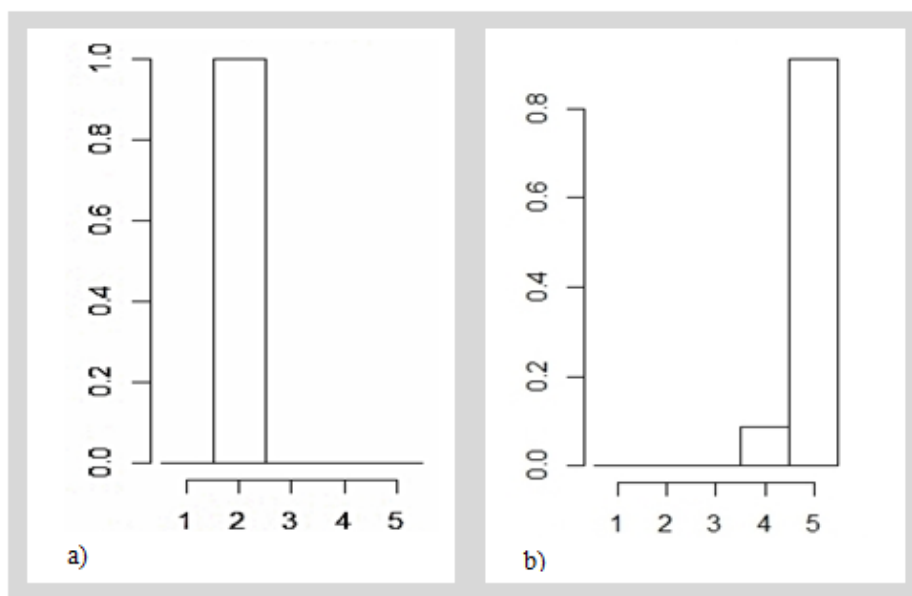
60-64, 66-79), odnosno 64 (81%) prema No Admixture modelu (1-4, 11, 14, 15, 21, 23-41, 43-79). Jedinke koje imaju  $q < 0,8$  se smatraju jedinkama u admiksiji; u BYM i CAR modelima 15 jedinki (18.9%; 1, 3, 7, 14, 15, 21, 25, 26, 28, 43, 48, 50, 56, 58-59, 65), a u No Admixture modelu 1 jedinka (1%; 42)

Interpolacijom *log - likelihood* vjerovatnoća, dobijena je slaba statistička podržanost za klaster u kome se nalaze jedinke iz istočnog/jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine, dok drugi klaster, u kome se nalaze jedinke iz ostalih dijelova Bosne i Hercegovine ima visoku statističku podržanost (Sl. 8).

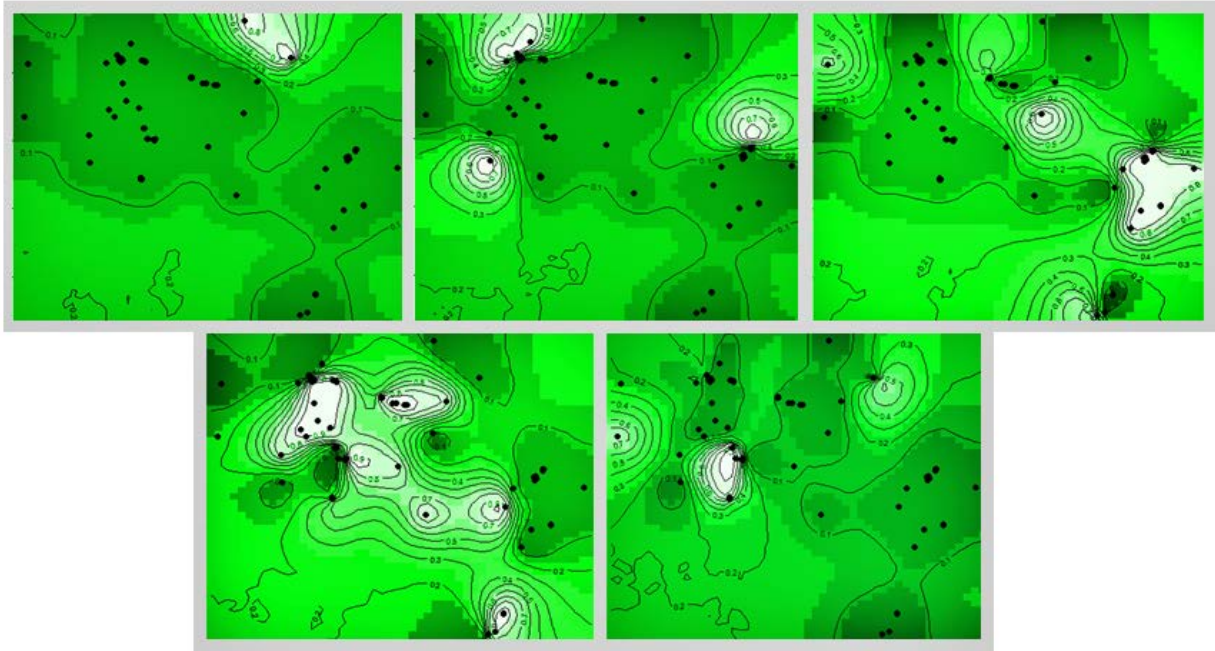


**Slika 8.** Interpolirane log - likelihood vjerovatnoće pripadnosti jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine pretpostavljenim genetičkim klasterima (redno: BYM, CAR i No Admixture modeli). Svijetliji dijelovi na mapi označavaju pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru; na mapama koje se nalaze na lijevoj strani slike svijetli dijelovi označavaju pripadnost jedinki vuka istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine jednom genetičkom klasteru, a na desnoj strani pripadnost jedinki vuka ostatka navedenog područja drugom genetičkom klasteru.

GENELAND analizom, primjenom oba modela korelacije alela, uočeni su različiti rezultati prostorne strukture vuka Bosne i Hercegovine, kako u međusobnom, tako i u odnosu na rezultate prethodnih analiza. Primijenjeni *uncorrelated* model ukazuje na prisustvo dva genetička klastera ( $K=2$ ) (Sl. 9a), dok analiza sprovedena primjenom *correlated* modela frekvencije alela ukazuje na distribuciju proučavanog uzorka u pet genetičkih klastera ( $K=5$ ) (Sl. 9b), koji se međusobno, geografski, preklapaju (Sl. 10).

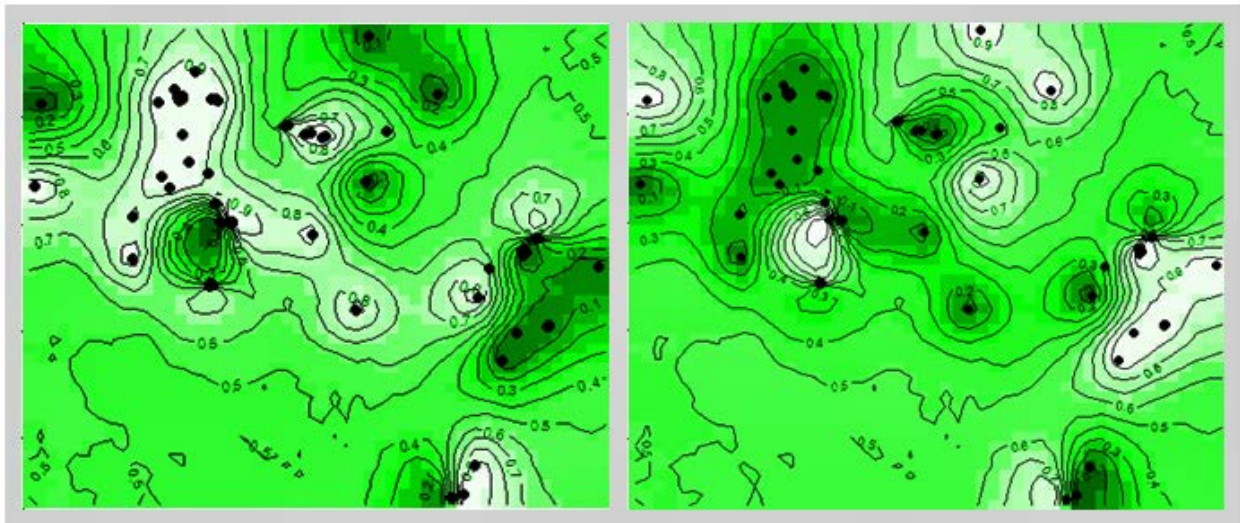


**Slika 9.** Broj pretpostavljenih genetičkih klastera u populaciji vuka Bosne i Hercegovine detektovanih primjenom a) *uncorrelated* ( $K=2$ ) i b) *correlated* ( $K=5$ ) modela korelacije alela u GENELAND analizi



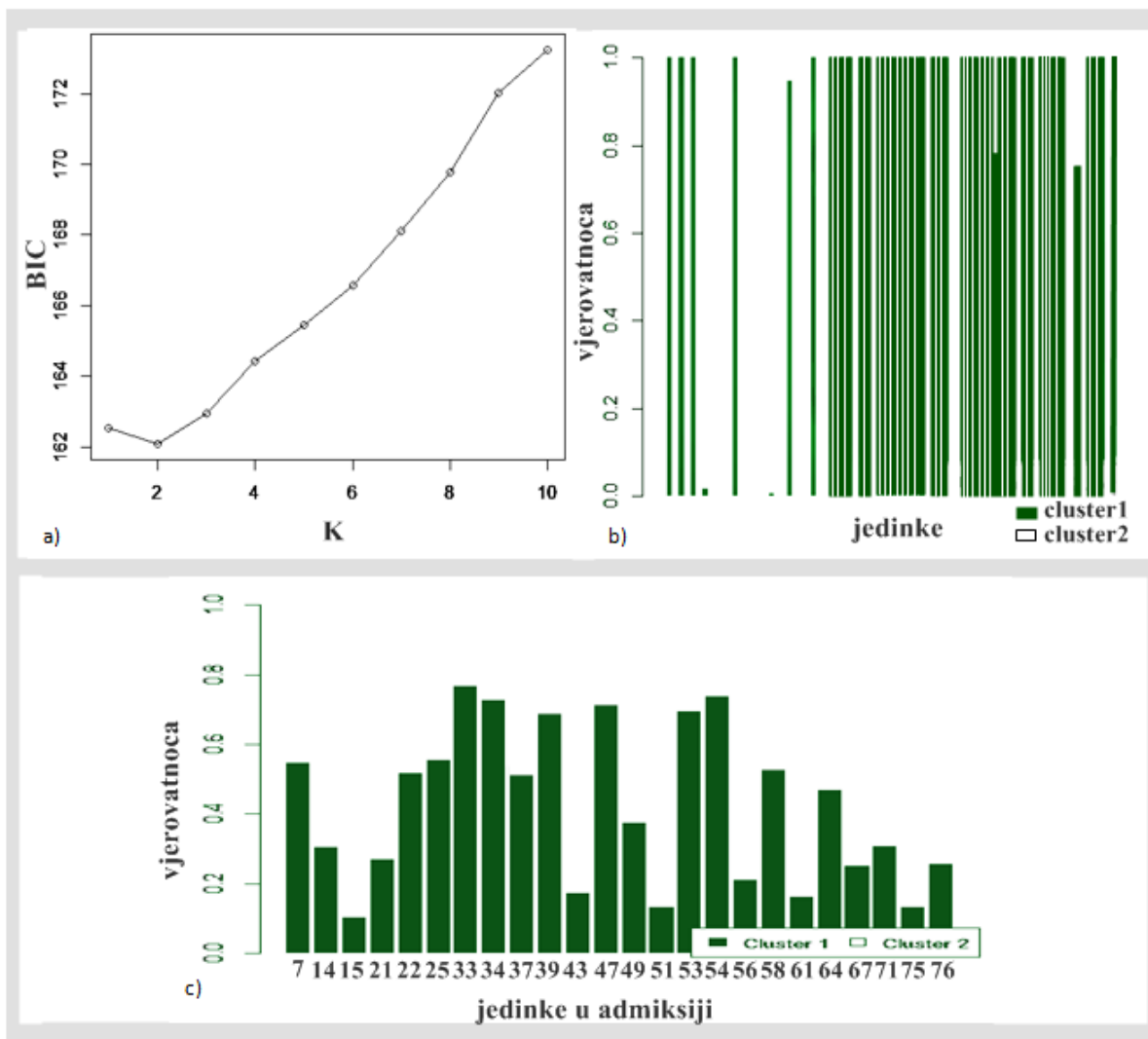
**Slika 10.** Distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u pretpostavljene genetičke klastere ( $K=5$ ) detektovane Geneland analizom, primjenom *correlated modela* frekvencije alela. Svjetliji dijelovi na mapi označavaju veću pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru.

Primijenjeni *uncorrelated* model ukazuje na prisustvo dva genetička klastera ( $K=2$ ), ali iz Slike 11. može se uočiti da nema jasne geografske distribucije jedinki, kao što je djelimično uočeno u rezultatima prethodnih analiza populacione strukture, te da se klasteri geografski preklapaju, pri čemu je navedena distribucija statistički podržana veoma visokim vrijednostima *posterior* vjerovatnoća pripadnosti jedinki klasteru ( $p \geq 0,8$ ).



**Slika 11.** Distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u pretpostavljene genetičke klastere ( $K=2$ ) detektovane Geneland analizom, primjenom uncorrelated modela frekvencije alela. Svijetliji dijelovi na mapi označavaju veću pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru

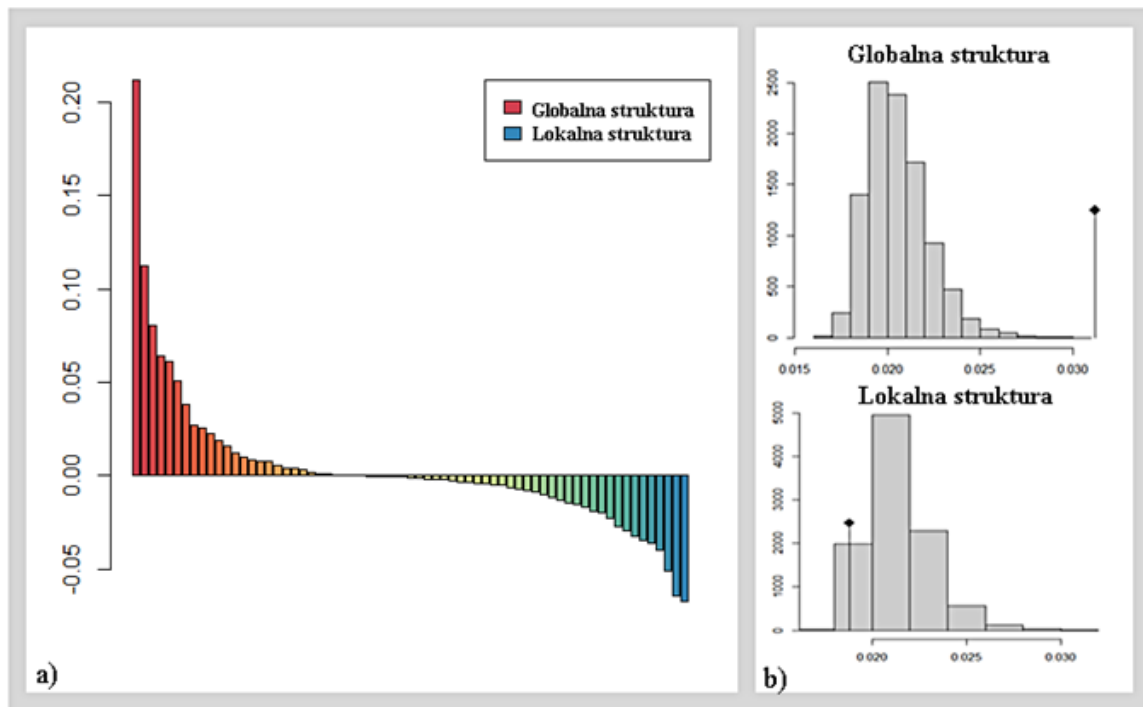
Rezultati dobijeni analizom glavnih komponenti, primjenom DAPC i sPCA metoda, takođe ukazuju na postojanje dva genetička klastera u proučavanom uzorku. DAPC analizom, primjenom funkcije *find.clusters*, na osnovu najniže BIC vrijednosti, detektuju se dva genetička klastera ( $K=2$ ) (Sl. 12a), a svrstavanjem jedinki u detektovane klastere (Sl. 12b), te određivanjem jedinki u admiksiji (Sl. 12c), primjenom *dapc* funkcije, uočava se distribucija jedinki koja je u saglasnosti sa distribucijom uočenom u STRUCTURE i TESS analizama (Prilog 5c).



**Slika 12.** a) Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K=2$ ) u populaciji vuka Bosne i Hercegovine detektovanih primjenom funkcije *find.clusters* u DAPC analizi na osnovu najnižih vrijednosti BIC b) pripadnost jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine genetičkim klasterima; genetički klasteri su predstavljeni različitim bojama. Nakon svrstavanja jedinki u pretpostavljene klastere i određivanja c) jedinki u admiksiji, uočavaju se 24 jedinke (30.3%) sa očekivanom vjerovatnoćom pripadnosti određenom genetičkom klasteru manjom od 0,8 ( $<0,8$ ) koje se smatraju jedinkama u admiksiji. Jedan genetički klaster je predstavljen bijelom bojom i s obzirom na vrijednosti vjerovatnoće pripadnosti jedinki određenoj genetičkoj grupi ( $\geq 0,8$ ) pripadaju mu 24 jedinke (30,3%) iz istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine. Drugi genetički klaster je predstavljen zelenom bojom, i na osnovu vrijednosti vjerovatnoće

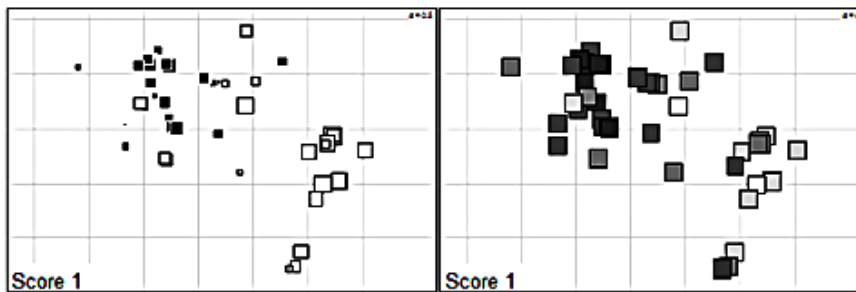
pripadnosti ( $\geq 0,8$ ) pripada mu 31 jedinka (39,2%) iz ostalih dijelova Bosne i Hercegovine, a u geografskom pogledu se preklapaju sa jedinkama u admiksiji.

Rezultati sPCA analize ukazuju na prisustvo jedne globalne, te odsustvo lokalne strukture (Sl. 13a), što je statistički potvrđeno Monte Karlo permutacionim testovima (Sl. 13b).

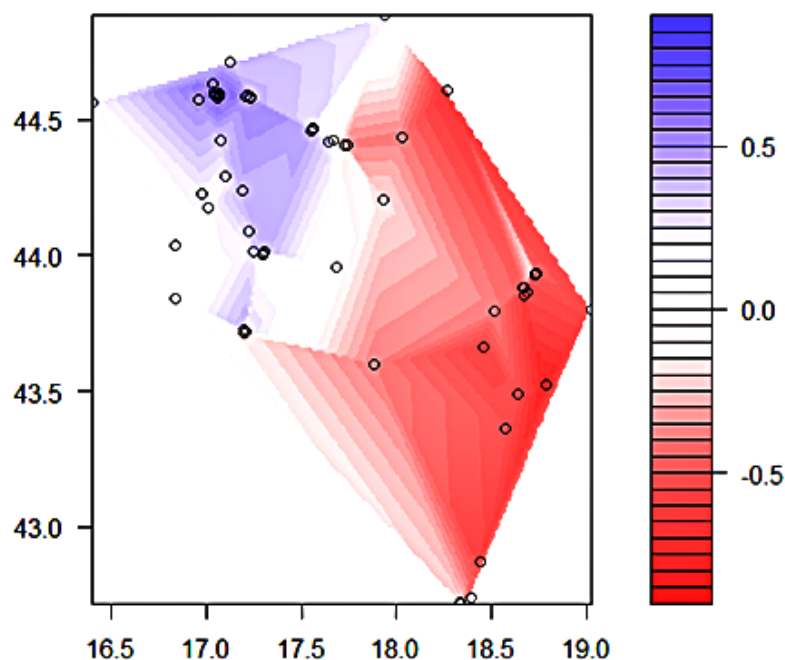


**Slika 13.** a) Rezultati sPCA analize i detekcija globalne i/ili lokalne strukture u populaciji vuka Bosne i Hercegovine b) statistička značajnost uočenih rezultata

U sPCA analizi uočena je geografska distribucija jedinki u dva genetička klastera, u skladu sa distribucijom detektovanom u prethodnim analizama, pri čemu se jedinke istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine zajedno grupišu u jedan genetički klaster u odnosu na jedinke preostalog dijela proučavane teritorije (Sl. 14a). Interpolacijom vjerovatnoća pripadnosti određenoj grupi, uočava se slaba statistička podržanost navedene distribucije jedinki (Sl. 14b).



a)



b)

**Slika 14.** a) Distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u dva pretpostavljena genetička klastera detektovana u sPCA analizi. Veća razlika u veličini, odnosno, boji kvadratića, ukazuje na veću diferencijaciju među jedinkama b) Intrepolirana mapa distribucije jedinki

Nakon sprovedenih prethodnih analiza definisani su konsenzus genetički klasteri na osnovu rezultata STRUCTURE i TESS analiza koji su se pokazali najslabijim; u svaki od definisanih klastera svrstane su isključivo jedinke koje su u obje analize imale vrijednosti vjerovatnoće pripadnosti utvrđenim klasterima veće ili jednake 0,8 ( $q \geq 0,8$ ) (Prilog 5e). Jedinke koje su imale vrijednosti  $q$  koeficijenta manje od 0,8 ( $q < 0,8$ ) ne mogu se pouzdano svrstati ni u jedan genetički klaster, posmatraju se kao jedinke u admiksiji i isključene su iz narednih analiza.



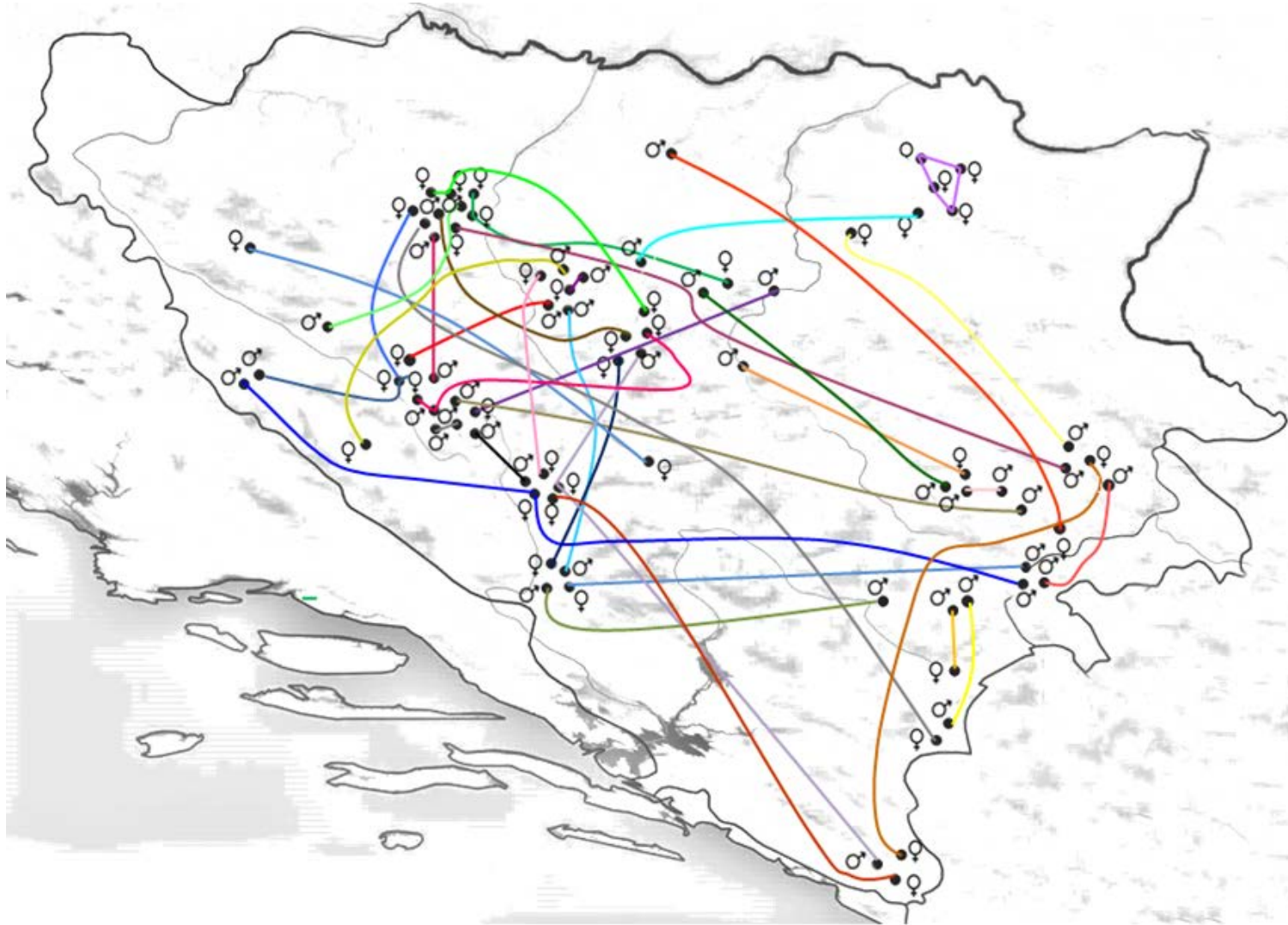
Prema prethodno navedenom jedan genetički klaster sastojao se iz 15,2% jedinki vuka iz istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine, drugi genetički klaster iz 27,8% jedinki iz ostalih dijelova Bosne i Hercegovine, koje su se geografski preklapale sa jedinkama u admiksiji (56,9 %). Za detektovane genetičke klastere izračunate su  $F_{ST}$  vrijednosti i urađena je AMOVA. S obzirom na nivoe genetičke diferencijacije definisane prema Wright-u (1978), uočena  $F_{ST}$  vrijednost između detektovanih genetičkih klastera vuka Bosne i Hercegovine umjereno je niska, ali statistički značajna ( $F_{ST} = 0,1$ ;  $p > 0,01$ ). Rezultati hijerarhijske AMOVA analize ukazali su na veću varijabilnost između grupa (detektovanih genetičkih klastera) u odnosu na varijabilnost unutar grupa, dok je najveća uočena varijabilnost bila između jedinki, a sve vrijednosti statistički su podržane (Tab. 5).

**Tabela 5.** Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za detektovane genetičke klastere u populaciji vuka Bosne i Hercegovine.

Izvor varijabilnosti	Varijabilnost komponenti	Procenat varijabilnosti (%)	$F_{ST}$	p
Između grupa	0,75	10,80	0,108	0,00001
Unutar grupa	0,38	5,27		
Između jedinki	6,21	83,93		

### 6.1.3. Analiza srodstva

Analizom srodstva vukova Bosne i Hercegovine detektovano je 36 grupa jedinki koje pokazuju najbliže srodstvo (Sl. 15). U analizi je utvrđeno da je: najviše grupa sa jednim parom srodnika - mužjak/ženka (14 grupa), mužjak/mužjak (11 grupa), ženka/ženka (5 grupa); pet grupa je sa po tri člana srodnika - mužjak/ženka/mužjak (2 grupe), ženka/mužjak/ženka (2 grupe), ženka/ženka/ženka (1 grupa) i jedna grupa ima četiri člana srodnika - četiri ženke. Sumiranjem rezultata, a s obzirom na visoku mobilnost proučavane vrste, uočen je očekivan obrazac srodstva jedinki, pri čemu su jedinke iz svih dijelova Bosne i Hercegovine većinski pokazale puno međusobno srodstvo što ukazuje na visok protok gena između vukova Bosne i Hercegovine. Analiza srodstva, pored primarnog cilja, ukazala je na nesistematičnost i nepravilnost u planiranju odstrela jedinki proučavane vrste, na šta ukazuje odstrel npr. 4 ženke sa Ozrena u istom danu, a koje su navedenom analizom pokazale puno srodstvo.



**Slika 15.** Prikaz srodnika u populaciji vuka Bosne i Hercegovine. Svaka linija predstavlja puno srodstvo između jedinki. Različite boje linija odgovaraju uočenim grupama srodnika



#### **6.1.4. Efektivna veličina populacije ( $N_e$ ) i detekcija prolaska populacije vuka Bosne i Hercegovine kroz genetičko usko grlo**

Srednja vrijednost efektivne veličine populacije vuka Bosne i Hercegovine, detektovane u LDNe programskom paketu, iznosi 41,5 ( $N_e=41,5$ ) u intervalu povjerenja 95% (42,2 - 54,7).

Rezultati analiziranja prolaska populacije vuka Bosne i Hercegovine kroz genetičko usko grlo (*bottleneck*, engl.) u skorijoj prošlosti prikazani su u Tabeli 6. Nakon Boniferonijeve korekcije p vrijednosti *Wilcoxon* testa uočava se statistički značajan deficit heterozigota za populaciju vuka Bosne i Hercegovine za IAM model mutacija, što ukazuje na prolazak populacije kroz genetičko usko grlo (Cornuet i Luikart, 1996). Za TPM i SMM modele mutacija ne uočava se statistički značajan deficit heterozigota.

Tabela 6. Rezultati bottleneck analize za populaciju vuka Bosne i Hercegovine za IAM, TPM i SMM modele mutacija i vrijednosti Wilcoxon testa

Lokus	Uočena heterozigotnost			IAM model mutacija				TPM model mutacija				SMM model mutacija			
	n	ko	He	Heq	S.D.	DH/sd	P	Heq	S.D.	DH/sd	Prob	Heq	S.D.	DH/sd	P
<b>CXX279</b>	156	9	0.76	0.67	0.12	0.73	0.25	0.75	0.07	0.13	0.45	0.816	0.039	-1.36	0.09
<b>REN169O18</b>	156	9	0.69	0.67	0.12	0.17	0.49	0.75	0.07	-0.87	0.17	0.817	0.039	-3.26	0.01
<b>INU055</b>	156	8	0.75	0.63	0.14	0.84	0.20	0.72	0.08	0.29	0.48	0.791	0.048	-0.96	0.131
<b>REN54P11</b>	156	8	0.76	0.64	0.13	0.93	0.15	0.72	0.08	0.45	0.38	0.793	0.047	-0.69	0.191
<b>AHT137</b>	156	12	0.87	0.75	0.09	1.34	0.01	0.82	0.05	1.07	0.09	0.866	0.026	0.28	0.49
<b>REN169D01</b>	156	10	0.87	0.70	0.11	1.53	0.00	0.77	0.07	1.29	0.01	0.836	0.034	0.977	0.134
<b>AHTk253</b>	156	7	0.76	0.59	0.14	1.19	0.07	0.68	0.09	0.81	0.20	0.759	0.054	0.068	0.452
<b>INU005</b>	156	11	0.85	0.73	0.09	1.31	0.02	0.80	0.05	0.99	0.13	0.852	0.03	0.1	0.457
<b>INU030</b>	156	8	0.72	0.63	0.14	0.67	0.28	0.72	0.08	0.06	0.45	0.793	0.047	-1.53	0.064
<b>FH2848</b>	156	7	0.72	0.59	0.14	0.82	0.21	0.68	0.09	0.33	0.45	0.762	0.056	-0.83	0.167
<b>REN162C04</b>	156	6	0.57	0.54	0.16	0.18	0.49	0.63	0.11	-0.6	0.23	0.715	0.071	-2.1	0.048
<b>REN247M23</b>	156	8	0.85	0.63	0.14	1.55	0.00	0.72	0.09	1.51	0.00	0.792	0.049	1.205	0.04
<b>Wilcoxon test (p)</b>				0.00024*				0.05225				0.17627			

He - uočena heterozigotnost; Heq - heterozigotnost nakon uspostavljanja ekvilibrija između genetičkog drifta i mutacija; S.D. - standardna devijacija; DH/sd - standardizovana devijacija; P - vjerovatnoća; \* $p < 0.05$  statistički značajno nakon Bonifronijeve korekcije p vrijednosti.

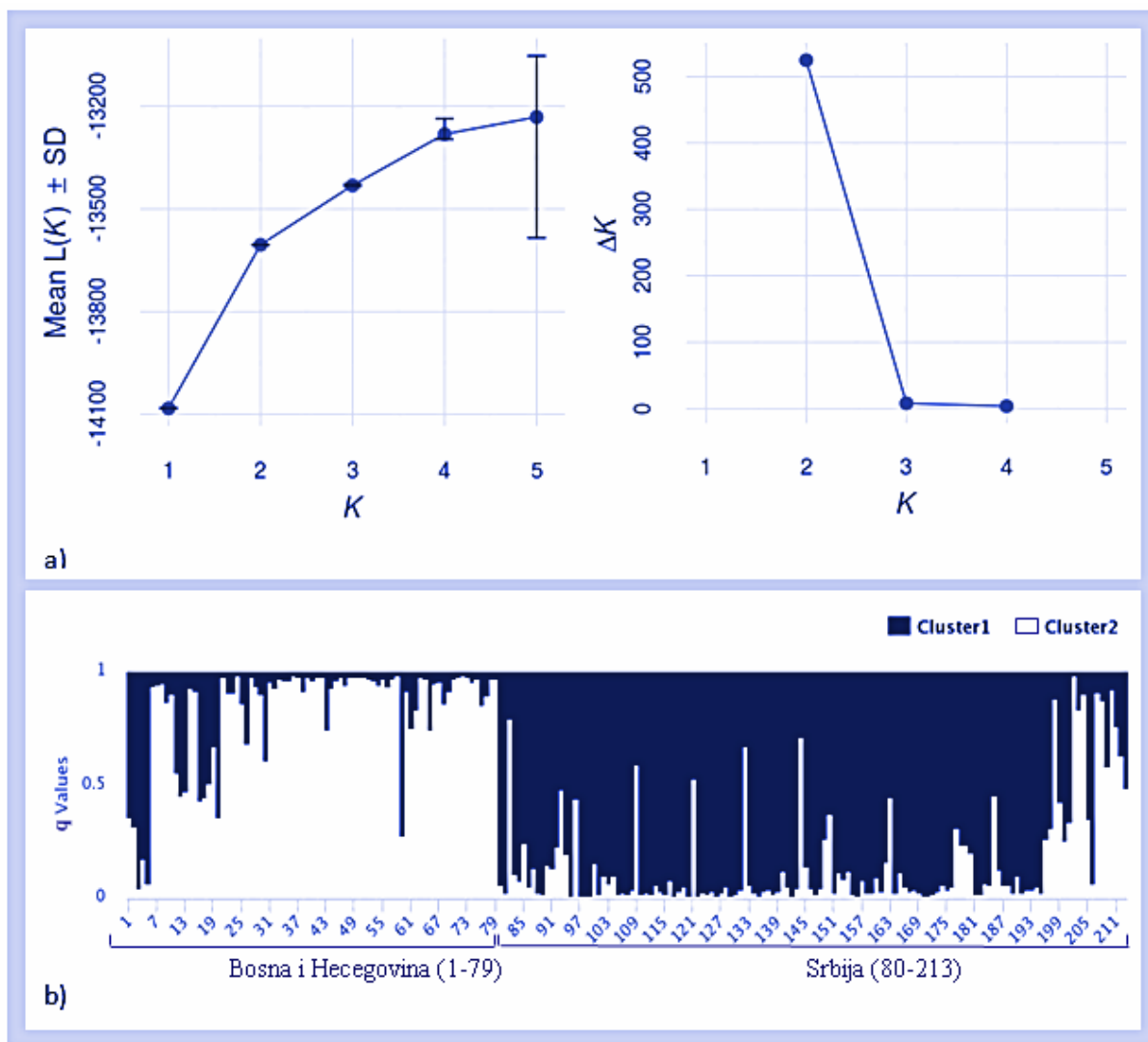
## 6.2. STRUKTURIRANOST POPULACIJE VUKA BOSNE I HERCEGOVINE U DINARSKO - BALKANSKOM KONTEKSTU

Iako se u prethodno navedenim rezultatima u većini analiza prostornog obrasca genetičke varijabilnosti populacije vuka Bosne i Hercegovine uočava distribucija jedinki u dva genetička klastera, slaba statistička podržanost, te odsustvo jasne geografske distribucije jedinki analiziranog uzorka, ukazuju na odsustvo stvarne strukture. Ipak, grupisanje jedinki iz istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine u isti genetički klaster konstantno je kroz sve analize, što ne bi trebalo zanemariti. Da bi se utvrdilo da li se uočena strukturiranost ( $K=2$ ) zadržava i na višem nivou, kada se poveća uzorak i geografsko područje analiziranja, strukturiranost populacije vuka Bosne i Hercegovine istražena je u širem, dinarsko - balkanskom kontekstu.

Prisustvo multih alela detektovano je za iste lokuse kao i u setu podataka populacije vuka Bosne i Hercegovine, stoga su analize strukturiranosti dinarsko - balkanske populacije sprovedene na setu od 12 lokusa za koje nije utvrđeno statistički značajno prisustvo multih alela. Analizama sprovedenim u STRUCTURE, TESS, GENELAND, sPCA i DAPC programskim paketima, primjećena je saglasnost u dobijenim rezultatima, gdje su sve analize ukazale na prisustvo dva genetička klastera ( $K=2$ ) u uzorku dinarsko - balkanske populacije vuka.

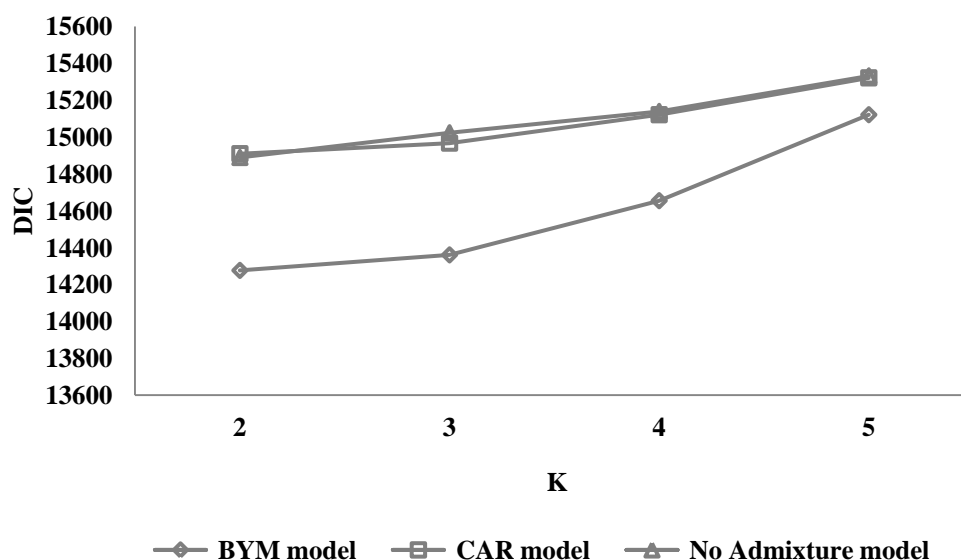
Analiza strukturiranosti sprovedena u STRUCTURE programskom paketu ukazala je, na osnovu najviših srednjih vrijednosti *posterior* vjerovatnoća ( $\ln \Pr(X|K)$ ) i  $\Delta K$  metode, na distribuciju vukova dinarsko - balkanske populacije, sa teritorija Bosne i Hercegovine i Srbije, u dva genetička klastera (Sl. 16a). Izračunavanjem srednjih vrijednosti pripadnosti jedinki određenom klasteru ( $q$  koeficijent;  $q \geq 0,8$ ) za determinisano  $K$ , uočeno je grupisanje jedinki vuka Bosne i Hercegovine u jedan, odnosno, jedinki vuka Srbije u drugi genetički klaster (Sl. 16b). Dvije jedinke iz istočnog dijela Bosne i Hercegovine grupišu se u isti genetički klaster kome pripadaju jedinke iz Srbije, a 15 jedinki sa područja istočnog dijela Bosne i Hercegovine nalazi se u admiksiji sa jedinkama vuka Srbije. Sedam jedinki vuka iz zapadnog dijela Srbije grupiše se u isti genetički klaster sa jedinkama iz Bosne i Hercegovine, a 28 jedinki je u admiksiji sa vukovima Bosne i Hercegovine. Relativno mali broj jedinki u admiksiji, koje uglavnom obuhvataju jedinke istočnog dijela Bosne i Hercegovine, sa jedne, odnosno,

zapadnog dijela Srbije sa druge strane, ukazuje na nizak protok gena između vukova proučavanog dijela teritorije dinarsko - balkanske populacije vuka.

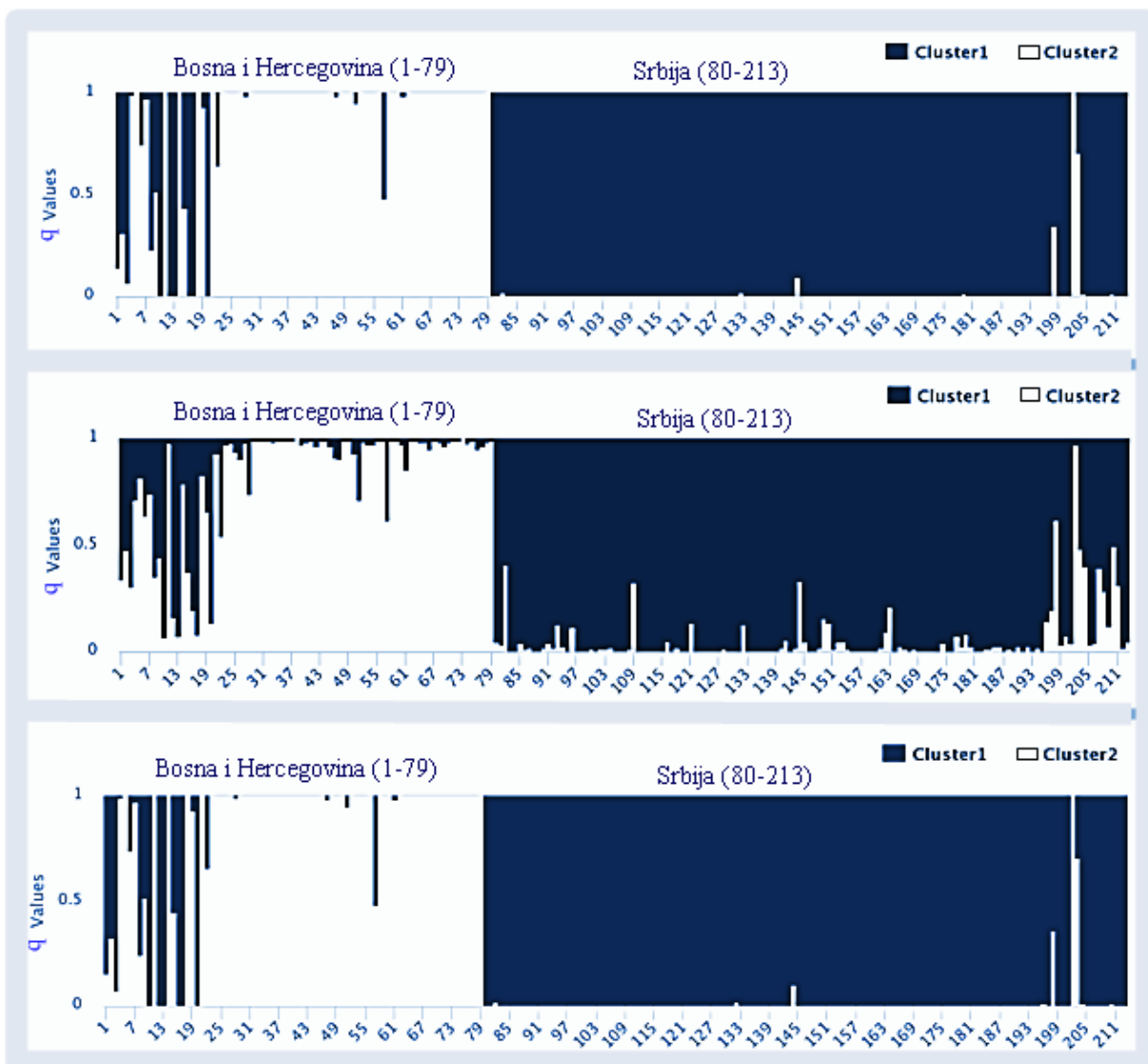


**Slika 16.** a) Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K=2$ ) u dinarsko - balkanskoj populaciji vuka detektovanih u STRUCTURE analizi na osnovu najviših srednjih vrijednosti posterior vjerovatnoća  $\ln Pr(X/K)$  i  $\Delta K$  metode b) Grafički prikaz pripadnosti jedinki u detektovanim genetičkim klasterima na osnovu srednjih vrijednosti pripadnosti jedinki određenom klasteru ( $q$  koeficijent;  $q \geq 0.8$ ). Bijela boja u grafikonu predstavlja pripadnost jedinki vuka jednom genetičkom klasteru, a plava boja pripadnost jedinki vuka drugom genetičkom klasteru. Jedinke koje imaju  $q < 0.8$  se smatraju jedinkama u admiksiji.

Analiza sprovedena u TESS programskom paketu, na osnovu najnižih vrijednosti DIC, ukazuje na distribuciju jedinki dinarsko - balkanskog seta u dva pretpostavljena genetička klastera ( $K=2$ ) (Sl. 17), koja su u saglasnosti sa brojem genetičkih klastera detektovanih u STRUCTURE analizi. U grafikonima se jasno uočava grupisanje nekoliko jedinki iz istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine sa jedinkama iz Srbije, a evidentan je mali broj jedinki u admiksiji ( $N=9$  primjenom BYM i NoAdmixture modela,  $N=28$  primjenom Car modela ) (Sl. 18).



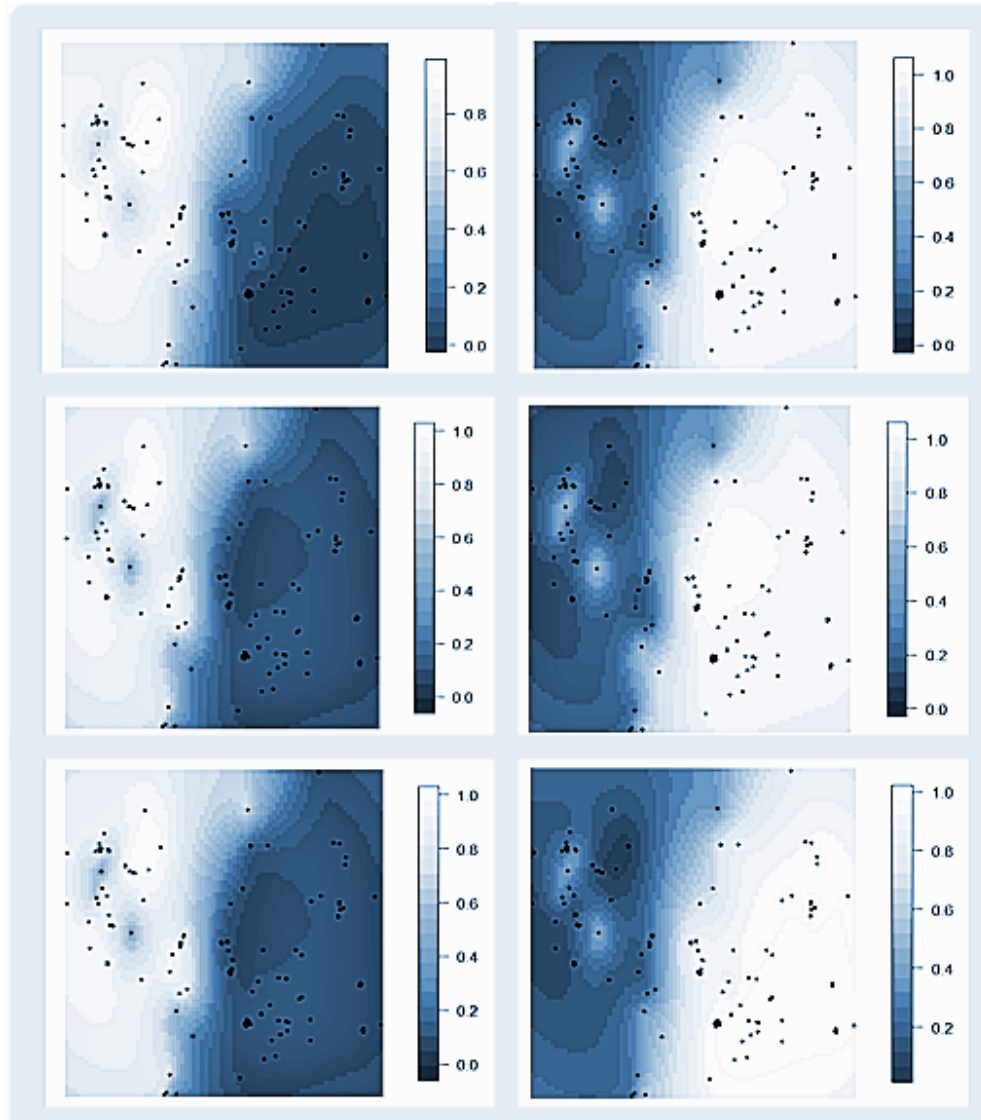
**Slika 17.** Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K=2$ ) u dinarsko - balkanskoj populaciji vuka, detektovanih u TESS analizi na osnovu najnižih vrijednosti DIC



**Slika 18.** Grafički prikaz distribucije jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka u pretpostavljene genetičke klasterne detektovane TESS analizom, primjenom sva tri modela srodnosti jedinki (redno: BYM, CAR i No Admixture modeli) na osnovu srednjih vrijednosti pripadnosti jedinki određenom genetičkom klasteru ( $q$  koeficijent;  $q \geq 0,8$ ). Bijeli dio grafikona predstavlja pripadnost jedinki vuka jednom genetičkom klasteru, a plavi dio grafikona predstavlja pripadnost jedinki vuka drugom genetičkom klasteru. Jedinke koje imaju  $q < 0,8$  se smatraju jedinkama u admiksiji.

Interpolacijom *log - likelihood* vjerovatnoća, dobijena je visoka statistička podržanost za utvrđene genetičke klasterne (Sl. 19).

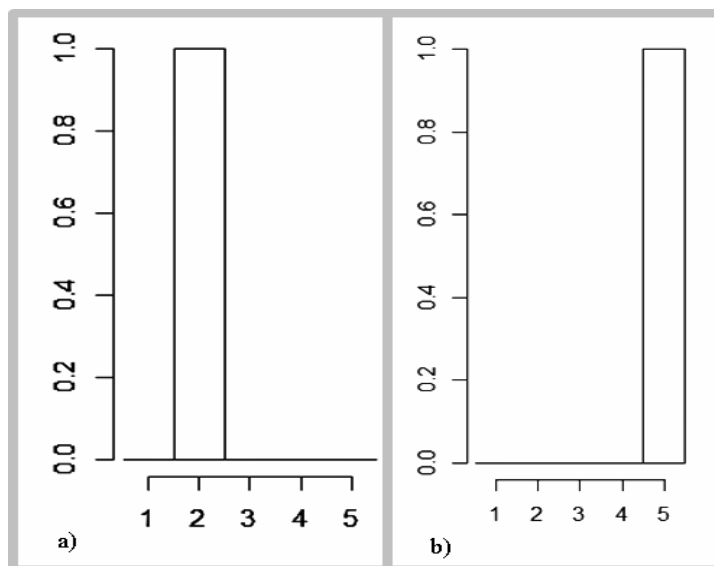




**Slika 19.** Interpolirane log-likelihood vjerovatnoće pripadnosti jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka u pretpostavljene genetičke klastere (redno: BYM, CAR i No Admixture modeli). Svjetliji dijelovi na mapi označavaju veću pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru; na mapama na lijevoj strani slike svijetli dijelovi označavaju pripadnost jedinki vuka Bosne i Hercegovine jednom genetičkom klasteru, a na desnoj strani pripadnost jedinki vuka Srbije drugom genetičkom klasteru

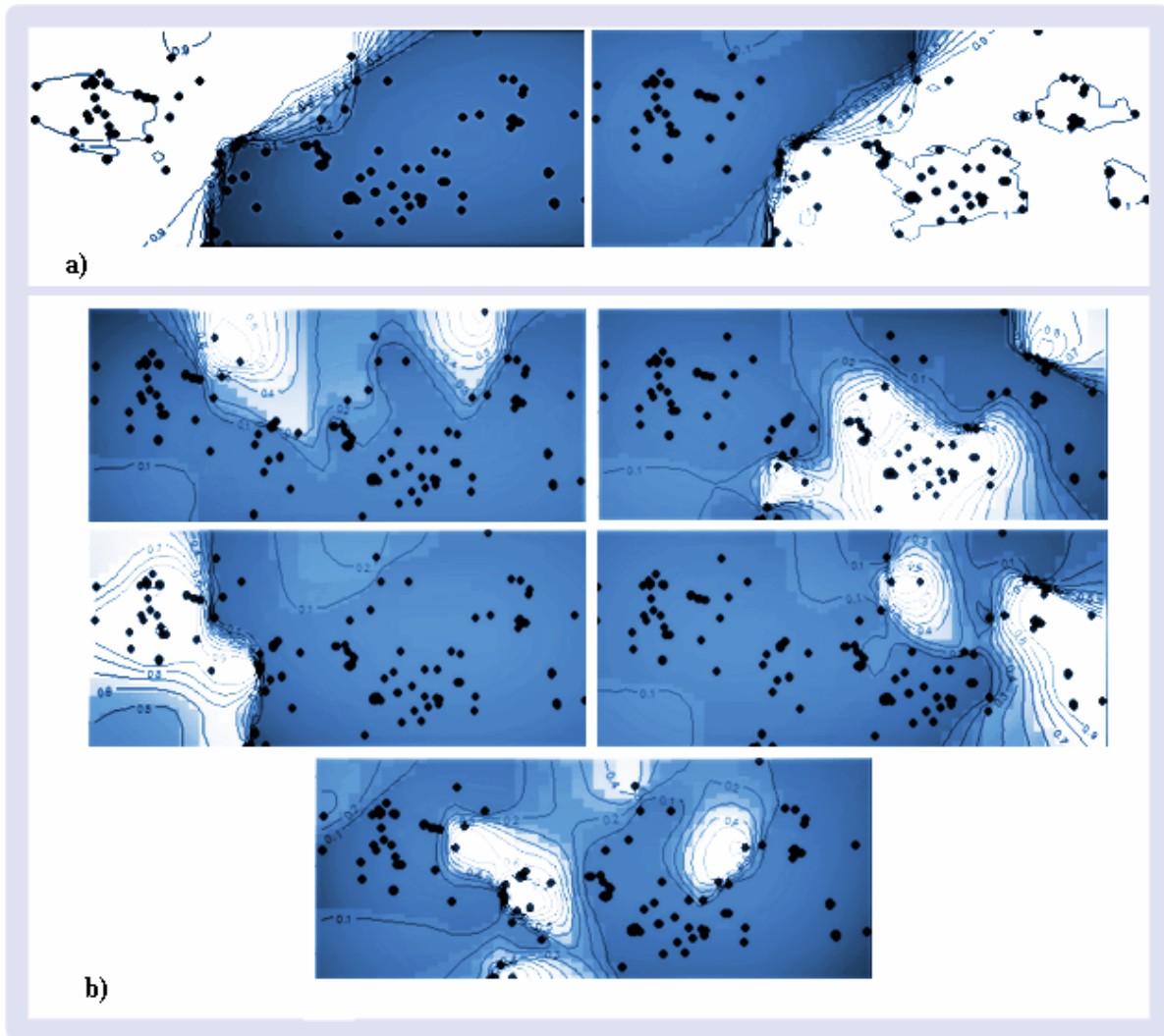
Analizom prostornog obrasca genetičke varijabilnosti, sprovedenoj u GENELAND programskom paketu, primjenom *correlated* i *uncorrelated* modela korelacije alela, dobijeni

su različiti rezultati vezani za broj genetičkih klastera u uzorku dinarsko - balkanske populacije vuka (Sl. 20).



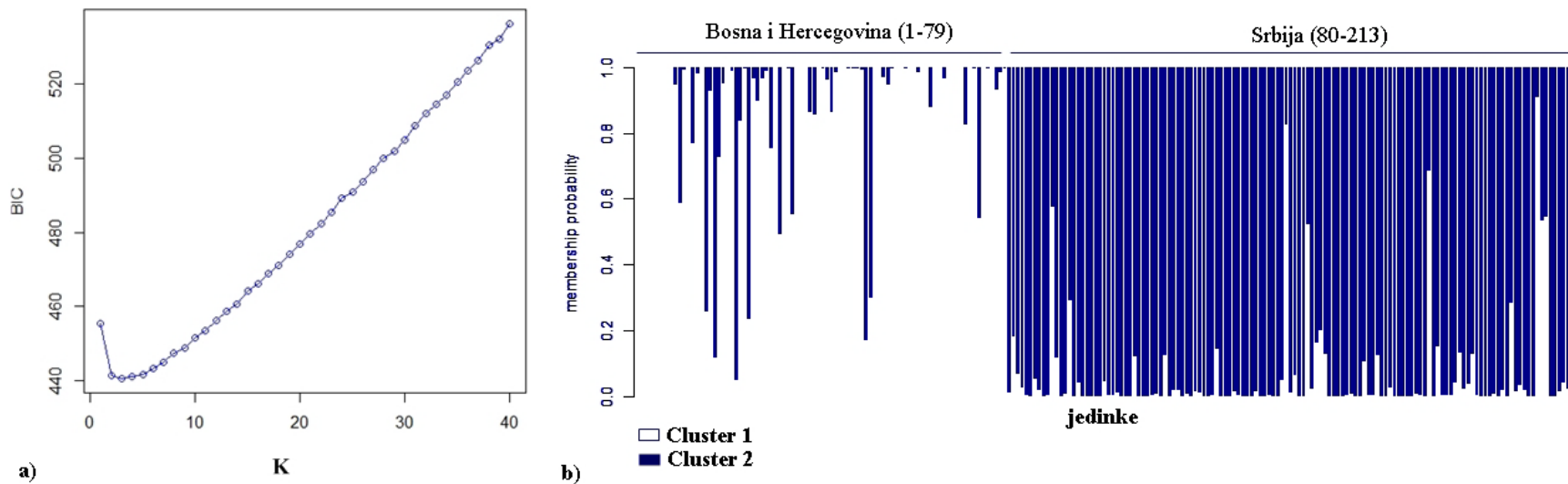
**Slika 20.** Broj pretpostavljenih genetičkih klastera detektovanih u GENELAND analizi primjenom a) uncorrelated ( $K=2$ ) i b) correlated ( $K=5$ ) modela korelacije alela za dinarsko - balkansku populaciju vuka

*Uncorrelated* model ukazuje na grupisanje jedinki vuka dinarsko - balkanske populacije u dva pretpostavljena genetička klastera ( $K=2$ ), sa jasnom geografskom distribucijom jedinki. Jedinke iz Bosne i Hercegovine grupisane su u jedan, a jedinke iz Srbije u drugi genetički klaster. Kao i u prethodnim analizama, uočeno je grupisanje nekoliko jedinki iz istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine u klaster kome pripadaju jedinke iz Srbije (Sl. 21a). *Correlated* model ukazuje na distribuciju jedinki u pet genetičkih klastera ( $K=5$ ) u kojima se jasno uočava odvajanje jedinki Bosne i Hercegovine u poseban genetički klaster, dok su jedinke vuka Srbije distribuirane u zasebne genetičke klastere, pri čemu se uočava diferenciranje između jedinki iz zapadnog, odnosno, istočnog dijela Srbije. Navedena distribucija je visoko statistički podržana i ukazuje na prisustvo dodatne strukture u populaciji vuka Srbije (Sl. 21b).



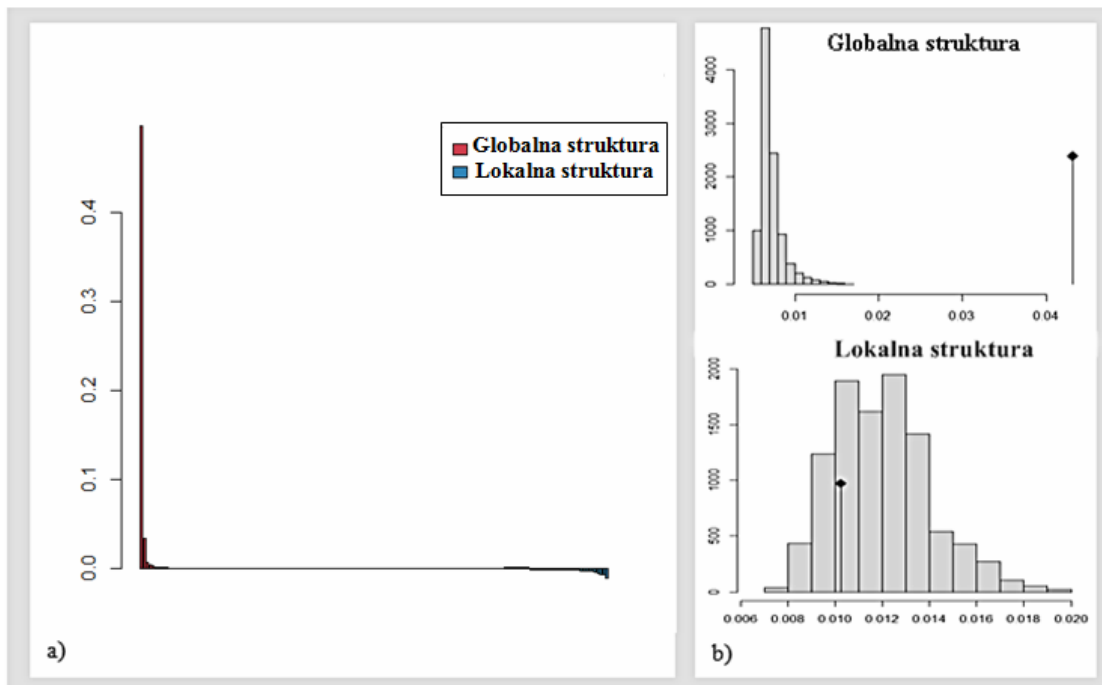
**Slika 21.** Distribucija jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka u pretpostavljene genetičke klasterne primjenom a) uncorrelated ( $K=2$ ) i b) correlated ( $K=5$ ) modela korelacije alela u GENELAND analizi. Svjetliji dijelovi na mapi označavaju pripadnost jedinki određenom genetičkom klasteru. Na slici pod a - na mapi sa lijeve strane slike svjetli dijelovi označavaju pripadnost jedinki vuka Bosne i Hercegovine jednom genetičkom klasteru, a na desnoj strani pripadnost jedinki vuka Srbije drugom genetičkom klasteru. Na slici pod b - pretpostavljeni genetički klasteri nemaju jasnu geografsku distribuciju.

DAPC metodom, sprovedenom u Adegenet programskom paketu, u okviru R programskog jezika, uočavaju se rezultati koji su u saglasnosti sa rezultatima prethodnih analiza, odnosno, distribucija jedinki u dva pretpostavljena genetička klastera ( $K=2$ ) (Sl. 22a). Na Slici 22b. jasno se uočava grupisanje jedinki vuka iz Bosne i Hercegovine u jedan, a jedinki vuka iz Srbije u drugi klaster, s tim da je evidentno da 14 jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine dijeli genetički materijal sa jedinkama iz Srbije, a 8 jedinki populacije vuka Srbije dijeli genetički materijal sa jedinkama Bosne i Hercegovine.



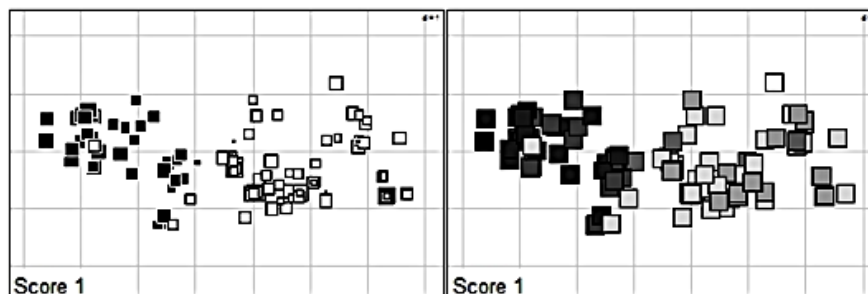
**Slika 22.** a) Broj pretpostavljenih genetičkih klastera ( $K=2$ ) u dinarsko - balkanskoj populaciji vuka na osnovu najnižih vrijednosti BIC, detektovanih primjenom funkcije *find.clusters* u DAPC analizi b) pripadnost jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka pretpostavljenim genetičkim klasterima; genetički klasteri su predstavljeni različitim bojama.

Rezultati sPCA analize ukazuju na prisustvo jedne globalne i odsustvo lokalne strukture (Sl. 23a), što je statistički potvrđeno Monte Karlo permutacionim testovima (Sl. 23b).

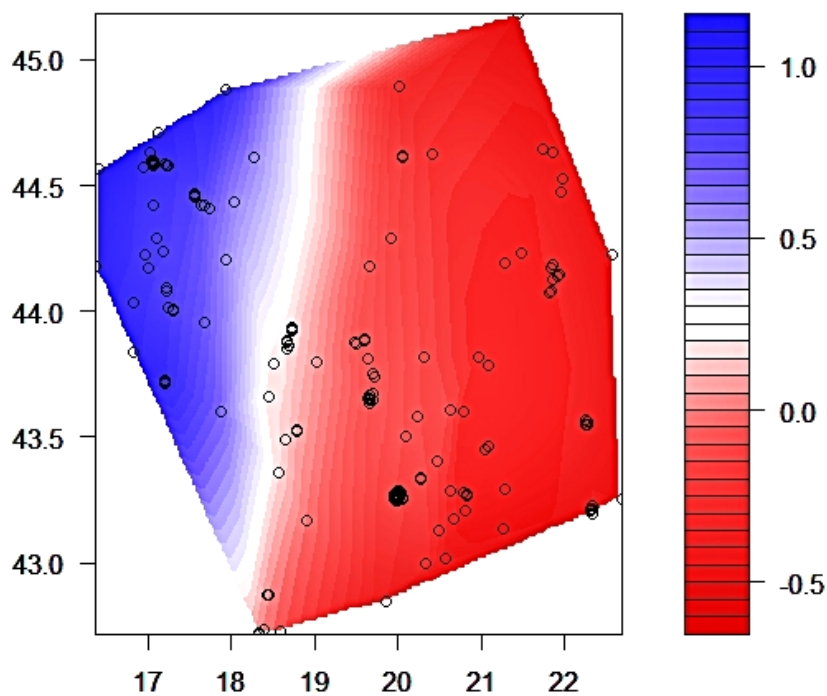


**Slika 23.** a) Rezultati sPCA analize za detekciju globalne/lokalne strukture dinarsko - balkanske populacije vuka b) statistička značajnost uočenih rezultata

Uzimajući u obzir geografsku distribuciju analiziranih jedinki, uočava se grupisanje jedinki vuka Bosne i Hercegovine u jedan, a jedinki Srbije u drugi klaster, kao i u prethodnim analizama (Sl. 24a), s tim da je evidentno izdavanje i grupisanje dvije jedinke iz jugoistočnog i jedne jedinke iz centralnog dijela Bosne i Hercegovine u genetički klaster sa jedinkama iz Srbije. Interpolacijom vjerovatnoća pripadnosti određenoj grupi, uočava se visoka statistička podržanost navedene distribucije jedinki (Sl. 24b).



a)



b)

**Slika 24.** a) Distribucija jedinki dinarsko - balkanske populacije vuka u dva pretpostavljena genetička klastera. Veća razlika u veličini, odnosno, boji kvadratića, ukazuje na veću diferencijaciju među jedinkama b) Intropolirana mapa distribucije jedinki

U cilju dodatne potvrde genetičke diferencijacije proučavanog uzorka izračunate su vrijednosti  $F_{st}$  koeficijenta i urađena je AMOVA analiza. Konsenzus genetički klasteri su definisani prema rezultatima većine analiza koji ukazuju na distribuciju analiziranog uzorka dinarsko - balkanskog seta podataka u dva pretpostavljena genetička klastera: (1) klaster u kojem se nalaze jedinke vuka Bosne i Hercegovine i (2) klaster u kojem se nalaze jedinke vuka Srbije. Jedinke koje su kroz sve analize imale  $q < 0,8$  (jedinke u admiskiji) izostavljene iz konsenzus klastera. Uočena je niska, ali statistički značajna vrijednost  $F_{st}$  koeficijenta ( $F_{st} = 0,038$ ;

$p > 0,01$ ), a rezultati hijerarhijske AMOVA analize ukazali su na veću varijabilnost unutar grupa, u odnosu na varijabilnost između grupa, a najveća varijabilnost je uočena između jedinki (Tab. 7).

**Tabela 7.** Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za dinarsko - balkansku populaciju vuka

Izvor varijabilnosti	Varijabilnost komponenti	Procenat varijabilnosti (%)	$F_{ST}$	<b>p</b>
Između grupa	0,27	3,81	0,038	0,00001
Unutar grupa	0,64	8,81		
Između jedinki	6,33	87,38		



### 6.3. VARIJABILNOST KONTROLNOG REGIONA MITOHONDRIJALNE DNK POPULACIJE VUKA BOSNE I HERCEGOVINE

#### 6.3.1. Genetički diverzitet vuka na osnovu varijabilnosti kontrolnog regiona mtDNK

U ukupnom uzorku vuka Bosne i Hercegovine uspješno je amplifikovan i sekvenciran dio kontrolnog regiona mtDNK, dužine 269bp, kod 56 jedinki. Na osnovu 11 varijabilnih pozicija, detektovano je ukupno osam haplotipova od kojih su četiri utvrđena u prethodnim istraživanjima, a četiri nisu prethodno detektovana i jedinstvena su za analiziranu populaciju vuka. Svi haplotipovi u istraživanju imenovani su prema haplotipovima u istraživanju od strane Pilot i sar. (2010) u smislu da redni brojevi haplotipova ovog istraživanja prate redni broj haplotipova prema Pilot i sar. (2010), (npr. w1=C11; w2=C12, itd.), odnosno, naziv haplotipa originalnog istraživanja za jedinstvene haplotipove detektovane u ovom i prethodnim istraživanjima mtDNK vuka (npr. Blk2=C1blk2, x1=C1x1, itd.), a C1 oznaka predstavlja inicijale latinskog naziva proučavane vrste što je uvedeno u ovom istraživanju. Od ukupno detektovanih 8 haplotipova u populaciji vuka Bosne i Hercegovine, 4 prethodno detektovana haplotipa nađeni su i ranijim istraživanjima dinarsko - balkanske populacije vuka (Hrvatska (Gomerčić i sar., 2010); Srbija, Bosna i Hercegovina, Makedonija (Đan i sar., 2016)), a njihova distribucija, kao i distribucija jedinstvenih haplotipova za vuka Bosne i Hercegovine, te vrijednosti parametara genetičkog diverziteta prikazani su u Tabeli 8.

**Tabela 8.** *Distribucija haplotipova i parametri genetičkog diverziteta kontrolnog regiona mtDNK populacije vuka Bosne i Hercegovine*

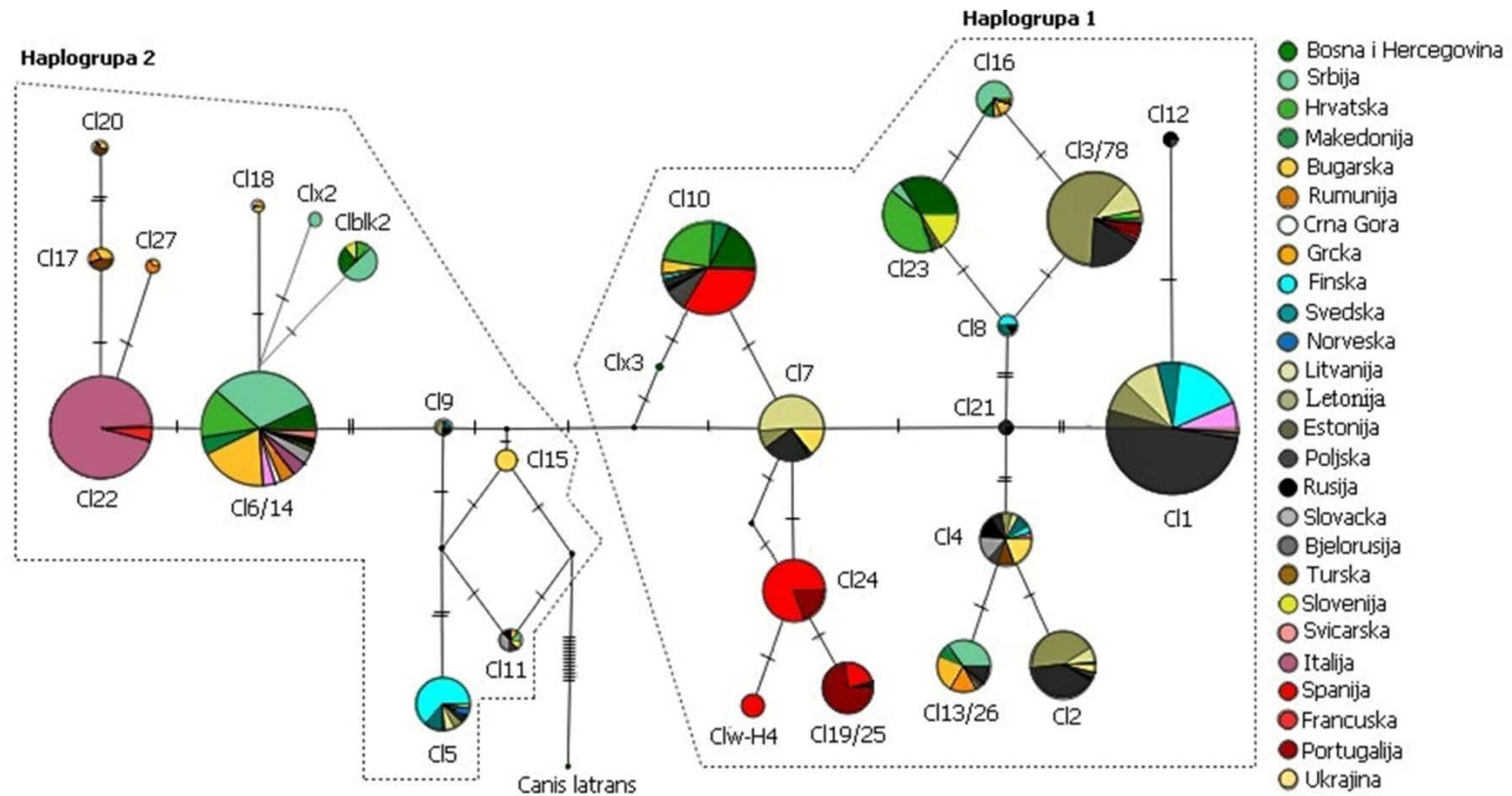
<b>Ukupan broj uzoraka</b>	56
<b>Ukupan broj haplotipova</b>	8
<b>C123 (% ukupnog uzorka)</b>	39.18%
<b>C110 (% ukupnog uzorka)</b>	28.37%
<b>C1blk2 (% ukupnog uzorka)</b>	12.1%
<b>C16/14 (% ukupnog uzorka)</b>	6.75%
<b>C1x3 (% ukupnog uzorka)</b>	0,01%

<b>Clx4 (% ukupnog uzorka)</b>	0,03%
<b>Clx5 (% ukupnog uzorka)</b>	0,03%
<b>Clx6 (% ukupnog uzorka)</b>	0,05%
<b>Broj polimorfnih mjesta</b>	11
<b>Diverzitet haplotipova (Hd)</b>	0,707±0,00079
<b>Diverzitet nukleotida (<math>\pi</math>)</b>	0,01919±0,000006
<b>Prosječan broj nukleotidnih razlika (k)</b>	4.164

Nakon poravnanja i skraćivanja sekvenci u evropskom setu podataka na 225 bp, pojedini detektovani haplotipovi uzorka vuka Bosne i Hercegovine pokazali su se kao jednaki, te je u novom setu nađeno ukupno 28 haplotipova, od čega je 26 bilo detektovano u prethodnim filogeografskim istraživanjima populacije vuka (Prilog 3b), a nađena su 2 nova haplotipa: 1 u populaciji vuka Bosne i Hercegovine, a 1 u populaciji vuka Srbije. Ukupan broj mutacija je  $\eta=31$ , diverzitet haplotipova  $Hd=0,795\pm0,00014$ , diverzitet nukleotida  $\pi=0,02106\pm0,0000001$ , a prosječan broj nukleotidnih razlika  $k=4,54778$ .

### 6.3.2. Filogeografska analiza mtDNK haplotipova vuka

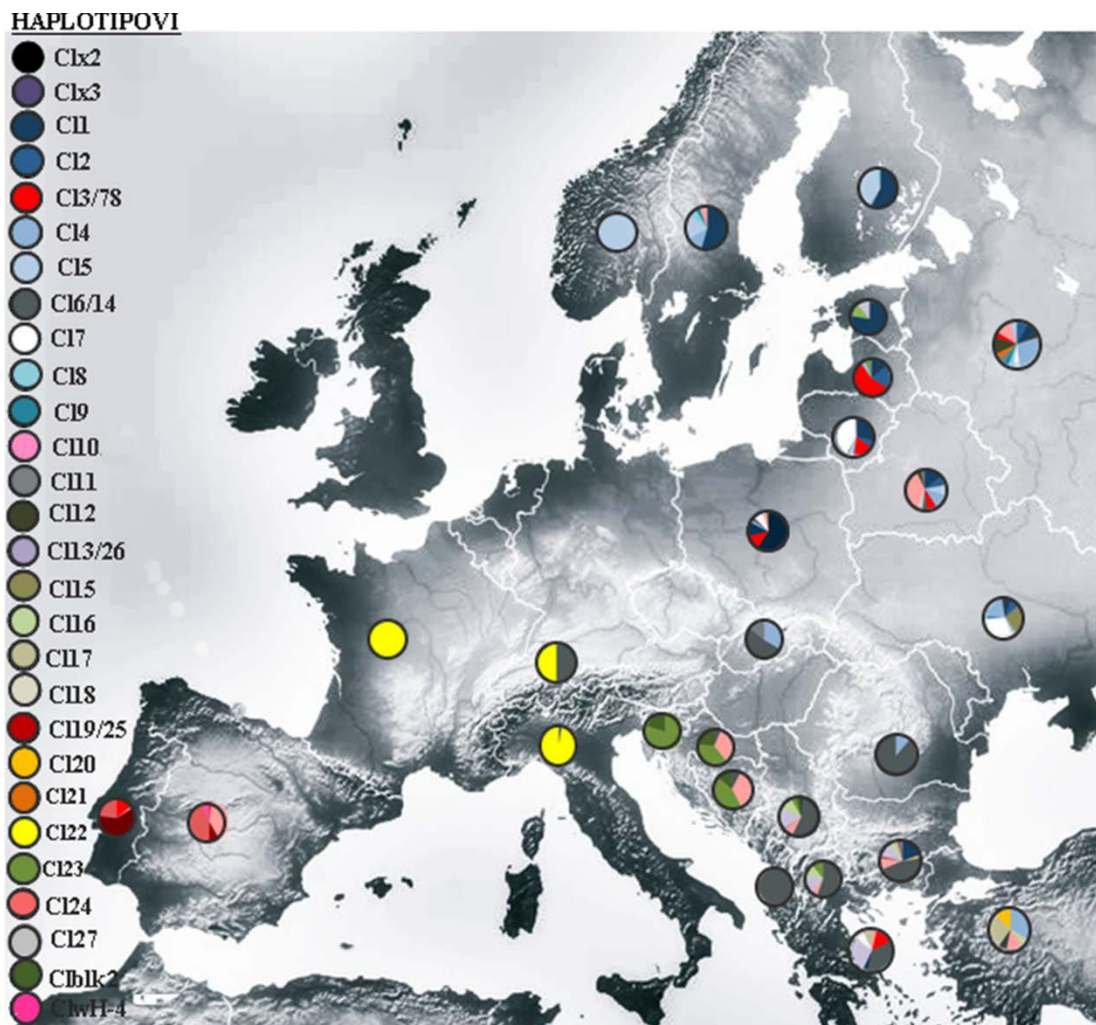
Konstruisanjem *Median - Joining* mreže haplotipova evropskog seta podataka uočena je distribucija sekvenci haplotipova u dvije, prethodno u literaturi definisane, haplogrupe (Pilot i sar., 2010): haplogrupu 1 (H1) i haplogrupu 2 (H2), koje su međusobno udaljene jednim mutacionim korakom (Sl. 25). Za haplogrupu 1 je utvrđeno da se sastoji iz 16, a za haplogrupu 2 iz 12 haplotipova. Haplogrupe se geografski preklapaju. Nema jasnog alopatrijskog obrasca distribucije haplotipova, ali primjetno je da je haplogrupa 1 zastupljenija, što je očekivano s obzirom da je evolutivno mlađa u odnosu na haplogrupu 2, koju je i zamijenila u zastupljenosti, na svjetskom nivou. Haplogrupa 1 je distribuirana na kompletnoj teritoriji Evrope i u odnosu na haplogrupu 2 znatno je zastupljenija u populacijama vuka koje su nalaze u centralnim i sjevernim područjima Evrope. Zastupljenost haplogrupe 2 nešto je manja krenuvši ka centralnim i sjevernim područjima Evrope. Veoma malo je zastupljena na Iberijskom poluostrvu, dok na Apeninskom poluostrvu u potpunosti dominira, a prisutna je i u jugoistočnim i istočnim evropskim populacijama vuka (Sl. 25).



**Slika 25.** Distribucija haplotipova vuka (*Canis lupus*) evropskog seta podataka u dvije haplogrupe: haplogrupu 1 i haplogrupu 2. Veličina kruga odražava brojnost jedinki po haplotipu. Mutacioni koraci između detektovanih haplotipova predstavljeni su kosim, kratkim linijama koje se nalaze na punim linijama koje povezuju haplotipove

Iz *Median - Joining* mreže haplotipova uočava se da haplotip C110 ima najveće rasprostranjenje na nivou Evrope. Detektovan je u populacijama vuka Iberijskog i Balkanskog poluostrva, istočnog i centralnog dijela Evrope - gdje se uočava kod malog broja jedinki, te u baltičkom i skandinavskom dijelu Evrope i u Rusiji. Pored navedenog haplotipa, veoma veliku distribuciju ima i haplotip C11 koji je uglavnom rasprostranjen u Skandinaviji, baltičkom i centralnom dijelu Evrope. U Švicarskoj i Grčkoj je registrovan kod po jedne jedinke, dok je u Bugarskoj uočen kod nekoliko jedinki. Sljedeći, široko rasprostranjen je haplotip C16/14 koji ima najveću distribuciju u dinarsko - balkanskoj populaciji vuka. Zastupljen je na području Srbije, a uočen je i kod nekoliko jedinki u baltičkom i centralnom dijelu Evrope i Rusiji. Pored toga uočava se i u drugim populacijama na jugu Evrope, a u skorije vrijeme je detektovan i kod vukova u Italiji, kod kojih je veoma dugo bio zastupljen isključivo jedinstveni haplotip C122. Navedeni haplotip je nastao preklapanjem prvobitno objavljenih haplotipova (w6 i w14 - prema Pilot i sar., 2010) u jedan zbog skraćivanja dužine analiziranih mtDNK sekvenci u predstavljenom istraživanju. Haplotip C122 je detektovan u populaciji vuka Italije, što je uočeno i u prethodnim studijama, te kod nekoliko jedinki vuka Švicarske i Francuske. Haplotip C13/78, koji je nastao preklapanjem prvobitno objavljenih haplotipova w3 i w78 u jedan - usljed skraćivanja sekvence, prisutan je kod 6,9% jedinki Iberijskog poluostrva, Baltika, centralnih i istočnih dijelova Evrope, te kod jedne jedinke u Rusiji. Haplotip C123 distribuiran je kod 6,1% jedinki vuka Dinarsko - Bakanske populacije, te nekoliko jedinki Baltičkog dijela Evrope. Haplotip C12 je zastupljen među jedinkama centralnog, istočnog i baltičkog dijela Evrope, kao i haplotip C17, s tim da su oba haplotipa detektovana i kod nekoliko jedinki iz Rusije. C124 haplotip jedinstven je za jedinke Portugalije i Španije. Jedinke iz Centralne Evrope, Baltika i Sjeverne Evrope, dijele haplotip C15, a haplotip C113/26 je pored sporadične distribucije u populacijama Centralne Evrope i Baltika, znatno distribuiran u dinarsko - balkanskoj populaciji vuka. Haplotip C119/25 nastaje preklapanjem haplotipova w19 i w25 u jedan zbog skraćivanja sekvence, i prisutan je među jedinkama Iberijskog poluostrva, te kod jedne jedinke iz Bugarske. Haplotip C14 distribuiran je među jedinkama na području istočne, centralne i južne Evrope, na Baltiku i u Skandinaviji, te kod nekoliko jedinki u Rusiji. Nije prisutan u dinarsko - balkanskoj populaciji vuka, kao ni u populacijama Iberijskog i Apeninskog poluostrva. Haplotip C1blk2 jedinstven je za dinarsko - balkansku populaciju vuka. Haplotip C116 detektovan je kod jedinki iz Srbije, Makedonije, Turske i Bugarske, a haplotip C117 je zastupljen isključivo među jedinkama sa juga Evrope.

Haplotipovi C18, C19 i C112 distribuirani su u populaciji vuka Rusije, a haplotip C112 i u baltičkom dijelu Evropske populacije vuka. Haplotip C121 uočen je kod nekoliko jedinki u Rusiji i Poljskoj. U južnom dijelu Evrope detektovani su C120, C127 i C118 haplotipovi, dok je haplotip C118 uočen i kod jedinki iz Ukrajine. Haplotip C111 detektovan je kod po jedne jedinke Srbije, Bugarske, Ukrajine, Bjelorusije i Rusije, te kod tri vuka u Slovačkoj. Haplotip C115 je jedinstven za Ukrajinu, C1wH-4 Španiju, C1x1 Srbiju i C1x3 za Bosnu i Hercegovinu. Na Slici 26. se uočava gradijent u distribuciji haplotipova, krenuvši od Iberijskog poluostrva ka Skandinaviji, a najveća raznovrsnost haplotipova uočava se unutar populacija vuka Centralne, Istočne i Južne Evrope.



**Slika 26.** Zastupljenost svih detektovanih haplotipova vuka u okviru proučavane države/regije na nivou Evrope

Nakon poravnanja i skraćivanja dužine sekvenci kontrolnog regiona mtDNK vukova evropskog seta podataka, za vukove Bosne i Hercegovine uočava se manji broj haplotipova ( $h=5$ ) u odnosu

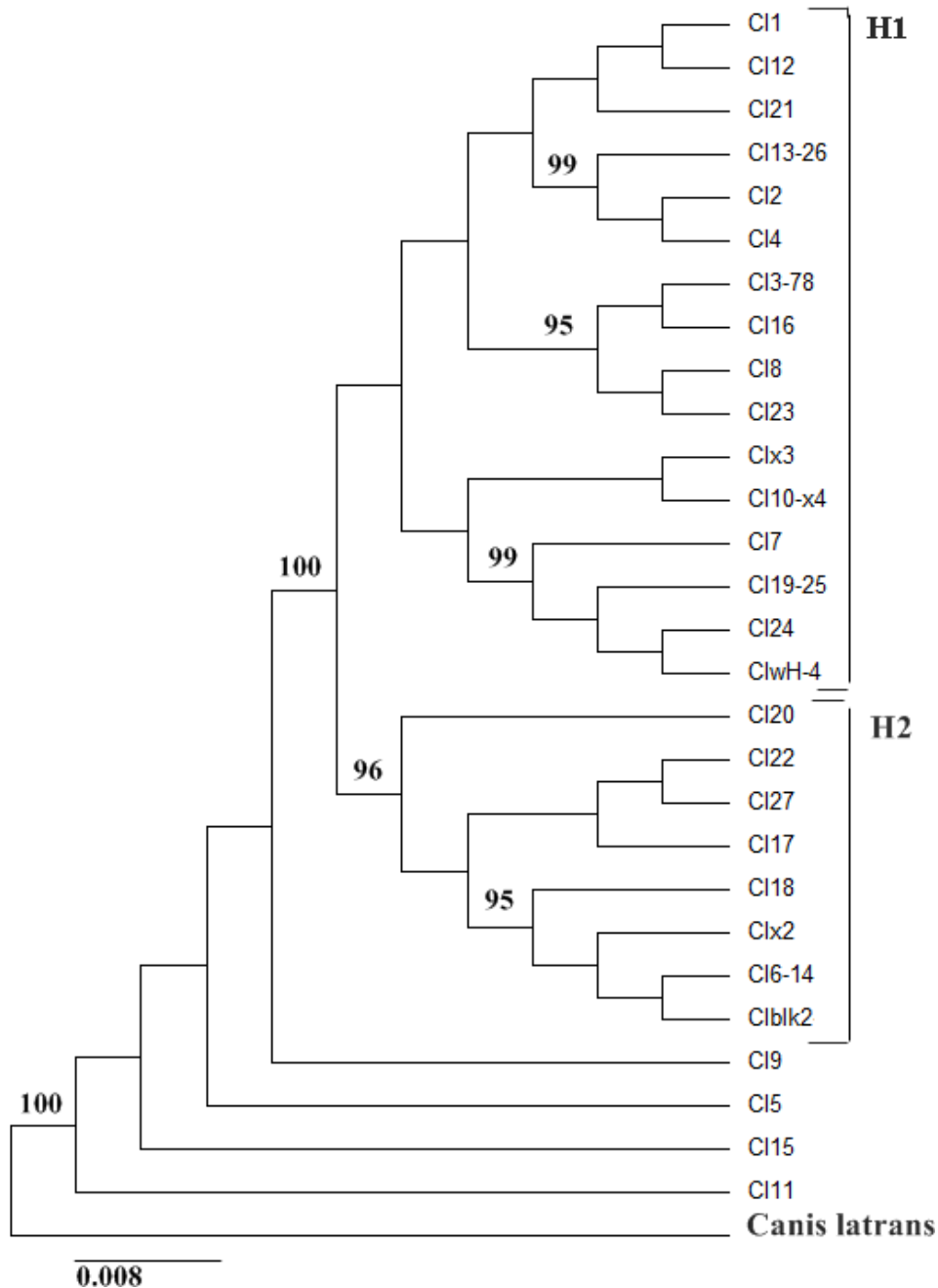
na prvobitni set podataka, koji je uključivao primarno jedinke iz Bosne i Hercegovine (Sl. 27). Distribucija haplotipova u ovom slučaju, u navedenoj subpopulaciji je sljedeća: najzastupljeniji su haplotipovi C123 i C110, a zatim C1blk2 haplotip koji je jedinstven za dinarsko - balkansku populaciju vuka. Pored navedenih haplotipova, detektovan je i haplotip C16/14, dodatno distribuiran kod nekoliko jedinki sa Apeninskog poluostrva, te u populacijama vuka istočnog, centralnog i baltičkog dijela Evrope. Takođe, uočava se i prisustvo jedinstvenog haplotipa C1x3, kod jedne jedinke vuka iz Bosne i Hercegovine sa područja Ozrena. Na području Bosne i Hercegovine detektovane su obje haplogrupe vuka, bez jasnog obrasca prostorne distribucije, ali može se uočiti da haplogrupa 1 ima veću zastupljenost. Pored toga, iz Slike 27. jasno se uočava da subpopulacije vuka Bosne i Hercegovine, Hrvatske i Slovenije imaju veću sličnost u distribuciji haplotipova u odnosu na ostale subpopulacije dinarsko - balkanske populacije vuka.



**Slika 27.** Distribucija haplotipova mtDNK vuka koji su zastupljeni u Bosni i Hercegovini, a detektovani su i u Evropi

Konstrukcijom *Bayesovog* stabla, uočena je distribucija haplotipova u dvije filogenetičke grupe (klade) koje su u saglasnosti sa haplogrupama H1 i H2 detektovanim u *Median - Joining* mreži (Sl. 28). Navedena distribucija je podržana sa visokim *posterior* vjerovatnoćama, a topologija konstruisanog stabla u skladu je sa rezultatima prema Pilot i sar. (2010), koja ukazuje na

monofiletsku organizaciju haplotipova unutar uočenih haplogrupa. Na stablu se uočava da haplotipovi CI9, CI5, CI11 i CI15 zauzimaju bazalnu poziciju.



**Slika 28.** Bajesovo filogenetsko stablo mtDNK haplotipova jedinki vuka (*Canis lupus*) evropskog seta podataka sa posterior vjerovatnoćama

Za definisane haplogrupe određeni su osnovni parametri genetičkog diverziteta iz kojih se jasno uočava da haplogrupa 1 ima veći diverzitet haplotipova i nukleotida, kao i veći prosječan broj nukleotidnih razlika, dok haplogrupa 2 ima veći broj varijabilnih pozicija u odnosu na haplogrupu 1 (Tab. 9). Nivo genetičke divergencije između definisanih haplogrupa je umjereno nizak, ali statistički signifikantan ( $\Phi_{st}=0,58$ ;  $p>0,01$ ), a rezultati AMOVA analize ukazuju na veću međugrupnu, u odnosu na, unutargrupnu varijabilnost (Tab. 10).

**Tabela 9.** Osnovni parametri genetičkog diverziteta definisanih haplogrupa vuka (*Canis lupus*) evropskog seta podataka.

	<b>H1</b>	<b>H2</b>
<b>Broj sekvenci</b>	985	655
<b>Dužina sekvenci</b>	225bp	225bp
<b>Broj varijabilnih pozicija (S)</b>	13	15
<b>Broj haplotipova (h)</b>	16	12
<b>Broj mutacija (<math>\eta</math>)</b>	13	15
<b>Diverzitet haplotipova (Hd)</b>	0,827 $\pm$ 0,009	0,666 $\pm$ 0,018
<b>Diverzitet nukleotida (<math>\pi</math>)</b>	0,01601	0,00759
<b>Prosječan broj nukleotidnih razlika (k)</b>	3,555 $\pm$ 0,008	1,685 $\pm$ 0,004

H1 - haplogrupa 1; H2 - haplogrupa 2

**Tabela 10.** Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za definisane haplogrupe vuka (*Canis lupus*) evropskog seta podataka.

<b>Izvor varijabilnosti</b>	<b>Varijabilnost komponenti</b>	<b>Procenat varijabilnosti (%)</b>	<b><math>\Phi_{st}</math></b>	<b>p</b>
<b>Između grupa</b>	4,20	58,74	0,58	0,00001
<b>Unutar grupa</b>	3,50	41,26		

### 6.3.3. Rekonstrukcija demografskih promjena vuka

U analizi *mismatch* distribucije, nije uočeno statistički značajno odstupanje vrijednosti sume kvadratnih odstupanja (SDD) i indeksa disperzije (R) od pretpostavljenih vrijednosti modela nagle ekspanzije populacije za cijeli set sekvenci i za sekvence u okviru detektovane haplogrupe



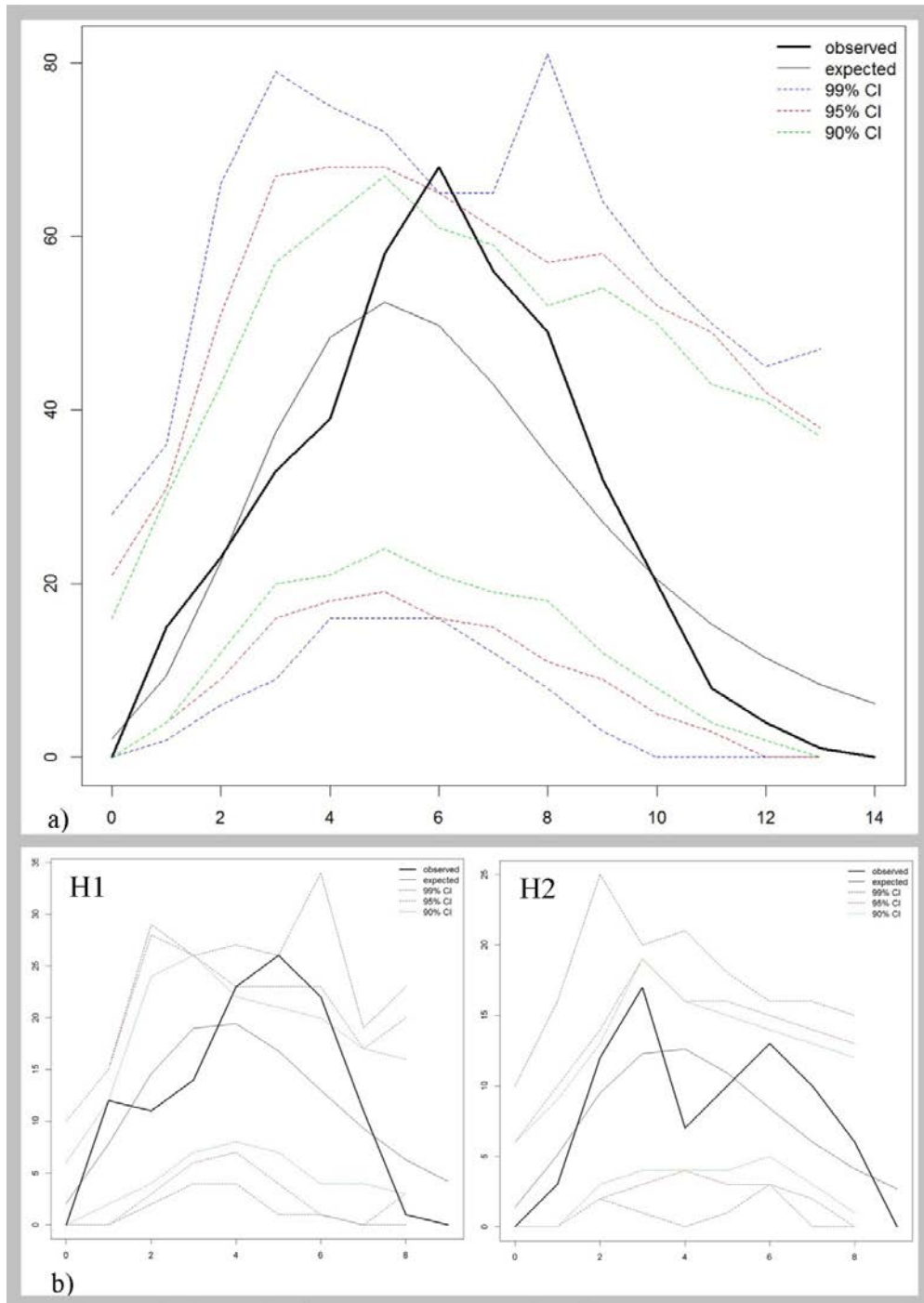
2 vuka na nivou Evrope. Dobijene negativne vrijednosti Tadžiminog D testa neutralnosti nisu se pokazale statistički značajnima, kako za cijeli set sekvenci, tako ni za definisane haplogrupe, za razliku od negativnih, statistički značajnih vrijednosti Fuovog Fs testa za cijeli set sekvenci i definisane haplogrupe, što može ukazivati na naglu ekspanziju populacije vuka na nivou Evrope (Tab. 11).

**Tabela 11.** Rezultati testova neutralnosti i mismatch analize sekvenci kontrolnog regiona mtDNK vuka (*Canis lupus*) evropskog seta podataka i definisanih haplogrupa.

	Cijeli set	H1	H2
<b>Testovi neutralnosti</b>			
<i>Tajima D</i>	-0,121	0,368	-0,743
<i>Fu Fs</i>	-25,304**	-14,732**	-10,056**
<b>Mismatch distribucija</b>			
<i>SDD</i>	0,006	0,019*	0,018
<i>R</i>	0,01	0,033	0,048

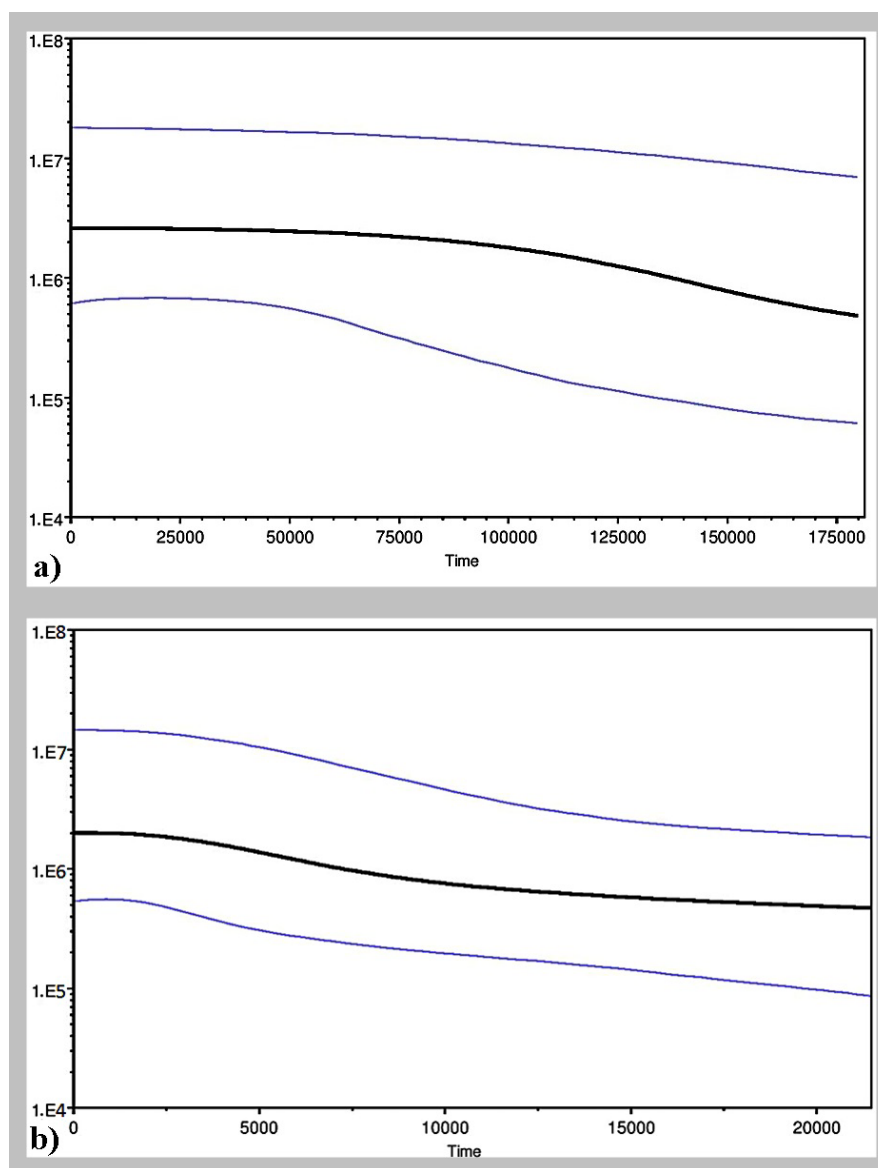
H1-haplogrupa 1; H2 - haplogrupa2; SDD - suma kvadratnih odstupanja; R - indeksa rasturanja  
 $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

Na graficima *mismatch* distribucije uočava se unimodalna distribucija parova nukleotidnih razlika za cijeli set sekvenci i haplogrupu 1 (Sl. 29). Uočena *mismatch* distribucija ukazuje na demografsku ekspanziju vuka cijelog (evropskog) seta podataka i detektovane haplogrupe 1, što predstavlja odliku populacija koje su prošle kroz genetičko usko grlo u prošlosti. Bimodalna distribucija, koja je uočena za haplogrupu 2, ukazuje na njen stabilni rast.



**Slika 29.** Grafici mismatch distribucije a) evropskog seta podataka i b) definisanih haplogrupa. Na x-osi je prikazan prosječan broj nukleotidnih razlika (pairwise differences, engl.), a na y-osi frekvencija prosječnog broja nukleotidnih razlika.

Bayesovi *skyline* grafici, konstruisani za definisane haplogrupe, ukazuju da je period ekspanzije haplogrupe 2 počeo mnogo ranije u prošlosti, u odnosu na period ekspanzije haplogrupe 1. Procijenjeno vrijeme ekspanzije haplogrupe 2 je prije oko 150000 godina (Sl. 30a), a navedena haplogrupa je trenutno u fazi blagog rasta. Za haplogrupu 1 procijenjeno vrijeme ekspanzije je prije oko 13000 godina i haplogrupa je trenutno u blagoj ekspanziji (Sl. 30b).



**Slika 30.** Bajesovi skyline grafikoni a) haplogrupe 2 i b) haplogrupe 1. Na x - osi je prikazano vrijeme ekspanzije haplogrupa u godinama, a na y - osi je prikazana efektivna veličina populacije.

# 7. DISKUSIJA



U toku nekoliko proteklih decenija, genetičkim proučavanjem vukova, napravljen je značajan napredak u boljem razumijevanju ekologije, varijabilnosti, evolucije i filogeografske istorije navedene vrste u Evropi. Prvobitnim proučavanjima, zasnovanim na analizama mtDNK, uočena je diferencijacija vukova na lokalnom nivou (Pilot i sar., 2006, 2010), ali i odsustvo jasne genetičke strukture na svjetskom i evropskom nivou (Vilà i sar., 1999). Uvođenje mikrosatelita, a naročito SNP-ova u pomenuta istraživanja (Aspi i sar., 2009, Czarnomska i sar., 2013, Stronen i sar., 2013, 2018), omogućava bolje sagledavanje prostornog obrasca genetičke varijabilnosti vuka što dozvoljava identifikaciju različitih populacija i/ili subpopulacija. Ipak, još uvijek je neophodno identifikovati faktore koji najbolje objašnjavaju uočenu strukturu. Vuk je vrsta sa veoma širokom istorijskom distribucijom, koja se u periodu 18. i 19. vijeka znatno smanjila - do nivoa iščezavanja vrste sa određenih područja usljed progona i prekomjernog izlovljavanja, te smanjenja veličine pogodne teritorije pod uticajem antropogenih faktora. Prema Ripple i sar. (2014) ove promjene su ostavile značajne posljedice na strukturu i funkcionisanje ekosistema koje je vrsta nekada naseljavala. Sprovođenje programa zaštite u brojnim evropskim zemljama, poslednjih nekoliko godina, uticalo je na značajan oporavak populacije vuka što je dovelo do rekolonizacije u područja koje je vuk nekada naseljavao (Chapron i sar., 2014). Povratak velikih sisara na prostore sa kojih su prethodno protjerani potencijalno dovodi do novih konflikata sa ljudima. Zbog potencijalnih sukoba neophodno je sprovesti aktivne konzervacione mjere i akcije koje će omogućiti dugoročnu koegzistenciju vukova i ljudi, naročito u predjelima u kojima dominira ljudska populacija (Ersmark i sar., 2016). Danas se antropogeni faktori navode kao najvažniji faktori u oblikovanju recentne populacione strukture vuka. Međutim, nikako se ne smije zanemariti ni uticaj glacijacija i interglacijacija na filogenetičku strukturu i istorijske demografske procese, koji su zasigurno imali uticaj na strukturiranost savremenih populacija. Iako paleontološki nalazi ukazuju na kontinuirano prisustvo vuka u sjevernoj hemisferi tokom posljednje glacijacije i njen neznatan uticaj na distribuciju vrste (Sommer i Benecke, 2005, Leonard i sar., 2007) postoje određeni podaci da je posljednji glacijalni maksimum ipak značajnije uticao na oblikovanje populacione strukture vuka na evroazijskom nivou, što je primjećeno i kod ostalih velikih sisara (Taberlet i Bouvet, 1994, Stewart i sar., 2010).

Analiziranje mikrosatelitskih regiona nuklearne DNK i sekvenci dijela kontrolnog regiona mitohondrijalne DNK vukova Bosne i Hercegovine predstavlja prvi korak u njihovoj genetičkoj karakterizaciji na ovom prostoru. Ove molekularno - genetičke analize omogućile su:



sagledavanje genetičke varijabilnosti, detektovanje populacione strukture vuka i i filogeografskih obrazaca, uočavanje genetičkih signala ukrštanja u srodstvu, te rasvjetljavanje demografskih promjena kroz koje su vukovi sa prostora Bosne i Hercegovine prolazili.

## **7.1. GENETIČKA VARIJABILNOST POPULACIJE VUKA BOSNE I HERCEGOVINE**

Umjereno visoke vrijednosti nivoa genetičke varijabilnosti populacije vuka Bosne i Hercegovine, detektovane primjenom mikrosatelitskih lokusa, a zasnovane na broju alela po lokusu ( $N_A$ ), te vrijednostima uočene ( $H_o$ ) i očekivane ( $H_E$ ) heterozigotnosti, u skladu su sa vrijednostima detektovanim i u ostalim dinarsko - balkanskim subpopulacijama (Lucchini i sar., 2004, Fabbri i sar., 2014, Moura i sar., 2014, Djan i sar., 2016, Šnjegota i sar., 2016). Poređenje rezultata o genetičkoj varijabilnosti, detektovanih analizom mikrosatelita u različitim studijama, zahtjeva posebnu pažnju s obzirom na amplifikaciju različitog panela mikrosatelitskih lokusa u različitim laboratorijama, na šta naročito ukazuju de Groot i sar. (2016), te ujedno ukazuju na potrebu harmonizacije molekularnih markera. Prethodno istraživanje genetičke varijabilnosti populacije vuka Bosne i Hercegovine, sprovedeno na manjem uzorku, primjenom istog panela mikrosatelitskih lokusa ukazalo je na slične, umjereno visoke vrijednosti genetičke varijabilnosti (Šnjegota i sar., 2016). Slične rezultate Djan i sar. (2016) navode i za populaciju vuka Srbije. Primjenom istog panela mikrosatelitskih lokusa Montana i sar. (2017) takođe registruju umjereno visoku genetičku varijabilnost unutar baltičke, karpatske i dinarsko - balkanske populacije. Sa druge strane, isti autori ukazuju na veoma niske vrijednosti genetičke varijabilnosti populacija vuka sa Iberijskog i Apeninskog poluostrva, što objašnjavaju posljedicom prolaska navedenih populacija kroz genetičko usko grlo u skorijoj prošlosti i njihovom dugotrajnom izolovanošću. Umjereno visoke vrijednosti nivoa genetičke varijabilnosti uočene su, analizom različitih mikrosatelitskih lokusa, i u populaciji vuka Hrvatske, gdje se varijabilnost povećavala tokom vremena i dostigla približan nivo koji je registrovan za Bosnu i Hercegovinu (Fabbri i sar., 2012, 2014). Uočene vrijednosti neznatno su veće od vrijednosti koje su uočili Lucchini i sar. (2004) i Fabbri i sar. (2014), analiziranjem malog broja jedinki sa ograničenog dijela teritorije Bosne i Hercegovine. Hindrikson i sar. (2016) ukazuju da je nivo genetičke varijabilnosti dinarsko - balkanske populacije vuka najveći u odnosu na ostale evropske populacije što ukazuje na stabilnost ove populacije. Za populacije vuka na nivou Evrope karakterističan je značajan prostorni gradijent heterozigotnosti, pri čemu se veće vrijednosti heterozigotnosti uočavaju u



sjevero - istočnim, a manje u jugo - zapadnim dijelovima Evrope. Učene su izvjesne razlike i na regionalnom nivou. U populacijama vuka Južne Evrope primjetno je opadanje heterozigotnosti od sjevera prema istoku, dok je u većoj, kontinuiranoj sjevero - istočnoj populaciji vuka isti gradijent uočen od zapada prema istoku. Na lokalnom nivou, najmanje vrijednosti heterozigotnosti uočene su u Njemačkoj, a najveće u Estoniji i Letoniji.

Umjereno visoke vrijednosti nivoa genetičke varijabilnosti populacije vuka Bosne i Hercegovine, uočene su i analiziranjem sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK. Analiziranjem 56 sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK, čija dužina iznosi 269bp, na osnovu 11 varijabilnih pozicija detektovano je ukupno 8 haplotipova, od kojih su 4 uočena u prethodnim istraživanjima kod jedinki vuka Hrvatske, Srbije i Makedonije. Postojanje zajedničkih haplotipova ukazuje na postojanje protoka gena između jedinki sa navedenih područja, koje formiraju jedinstvenu dinarsko - balkansku populaciju. Četiri haplotipa, koja su se pokazala jedinstvenim za vukove Bosne i Hercegovine, registrovana su kod ukupno devet jedinki. Jedan jedinstveni haplotip registrovan je kod jedne jedinke sa Ozrena. Drugi jedinstveni haplotip registrovan je za dvije jedinke sa Roduše. Kod jedne jedinke sa Roduše i jedne jedinke iz Grahova registrovan je treći jedinstveni haplotip. Četvrti jedinstveni haplotip registrovan je kod četiri jedinke sa Ozrena. Sve jedinke sa Ozrena, koje su nosioci različitih jedinstvenih haplotipova, odstrijeljene su u istom vremenskom periodu, što ukazuje da je na navedenoj teritoriji vjerovatno (bilo) prisutno više čopora. Četiri jedinke sa Ozrena, nosioci istog jedinstvenog haplotipa, su analizom srodstva - primjenom mikrosatelitskih lokusa, pokazale puno srodstvo. Za obje jedinke sa Roduše, koje su nosioci jedinstvenih haplotipova, karakteristična je morfološka specifičnost u odnosu na ostale jedinke koje naseljavaju navedeno područje. Jedinke su imale neobičnu svijetlu boju krzna, ali ipak, pokazale su i međusobnu genetičku diferenciranost, što takođe može ukazivati na prisustvo većeg broja čopora na navedenoj teritoriji, što je i potvrđeno primjenom metode foto - zamki na navedenoj lokaciji. U prethodnoj studiji, sprovedenoj analizom 17 sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK jedinki vuka Bosne i Hercegovine, dužine 283bp, detektovana su ukupno 4 haplotipa na osnovu 10 varijabilnih pozicija, što ukazuje na visok nivo genetičke varijabilnosti vukova navedene teritorije (Šnjegota i sar., 2014). Dinarsko - balkanska populacija vuka pokazuje znatno veću varijabilnost sekvenci kontrolnog regiona mtDNK u odnosu na ostale evropske populacije, što je najvjerovatnije posljedica umjerenih fluktuacija u veličini navedene populacije u prošlosti, što je uočeno i za populacije vuka Bugarske (Randi i sar., 2000, Moura i



sar., 2014, Pilot i sar., 2014), Hrvatske (Gomerčić i sar., 2010, Fabbri i sar., 2014), te ostale populacije vuka na Balkanu (Pilot i sar., 2010, Djan i sar., 2014).

Analiziranjem 1640 sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK vuka evropskog seta podataka, dužine 225bp, na osnovu 28 varijabilnih pozicija detektovano je ukupno 28 haplotipova, od kojih je jedan jedinstven za vukove Srbije, jedan za vukove Bosne i Hercegovine, a ostali su detektovani u prethodnim filogeografskim istraživanjima vuka na nivou Evrope. Skraćivanje dužine sekvenci navedenog seta podataka za 44bp, u odnosu na prvobitni set koji je uključivao jedinke vuka Bosne i Hercegovine, doveo je do gubitka dijela informativnih polimorfnih pozicija, te se za vukove Bosne i Hercegovine, u okviru evropskog seta, uočava manji broj jedinstvenih haplotipova. Prethodno navedeno ukazuje da se skraćivanjem sekvenci gubi značajan dio informacija, te da je diverzitet haplotipova vuka na nivou Evrope vjerovatno znatno veći, što potvrđuje i analiziranje dužih sekvenci kontrolnog regiona mtDNK (Pilot i sar., 2010), te analiziranje kompletnog genoma mtDNK (Koblmüller i sar., 2016).

Detektovani rezultati genetičke varijabilnosti vuka Evrope vjerovatno su posljedica kompleksne istorije vrste navedenog područja. To se odnosi na demografski pad populacije, fragmentisanje teritorije i preživljavanje malih, izolovanih populacija na Iberijskom poluostrvu i u Italiji, sa jedne, odnosno, većih kontinuiranih populacija na Balkanu i u Istočnoj Evropi, sa druge strane. Navedene promjene su dovele do geografske izolovanosti, odsustva protoka gena, protjerivanja i uništavanja vrste sa teritorije Centralne Evrope i Skandinavije. Sve navedeno uticalo je na manju genetičku varijabilnost jugo - zapadnih populacija vuka, dok se veća genetička varijabilnost sjevero - istočnih populacija može objasniti povezanošću sa velikom metapopulacijom na području Rusije, koja veoma dugo predstavlja izvor migranata.

Vrijednosti  $F_{IS}$  koeficijenta detektovane za vukove Bosne i Hercegovine su pozitivne, ali nisu statistički signifikantne, što ukazuje na odsustvo ukrštanja u srodstvu. Generalno, na nivou Evrope uočeni su signali ukrštanja u srodstvu u sjevero - istočnim populacijama vuka (Hindrikson i sar., 2016), te signali skorašnjeg ukrštanja u srodstvu u populacijama vuka Istočne (Pilot i sar., 2014) i Centralne Evrope (Kaczensky i sar., 2013). Kao najčešći razlog za ukrštanje u srodstvu navodi se nekontrolisani lov, čije posljedice se uočavaju u opadanju veličine



populacije, te narušavanju socijalne strukture populacija vuka (Valdman i sar., 2004, Jedrzejewski i sar., 2005, Moura i sar., 2014).

## 7.2. POPULACIONA STRUKTURA I FILOGEOGRAFIJA VUKA

Dinamična ekspanzija i rekolonizacija vukova u Evropi bitno su uticale na izmjenu rasprostranjenja i oblikovanje genetičkog diverziteta u prostoru i vremenu (Randi, 2011). Sa druge strane, prostorna diskontinuiranost između populacija navedene vrste, uzrokovana istorijskim progonima od strane čovjeka, znatno je uticala na genetičku diferenciranost unutar vrste, smanjenje protoka gena između populacija, te stvaranje lokalne strukturiranosti (Lucchini i sar., 2004, Hindrikson i sar., 2016). Na nivou Evrope, analiziranjem mikrosatelitskih lokusa, uočena je genetička diferencijacija vuka u deset evropskih populacija (Kaczensky i sar., 2013), među kojima je najizolovanija populacija vuka Italije koju, pored izolovanosti, karakteriše i dugotrajni prolazak populacije kroz genetičko usko grlo (Lucchini i sar., 2004, Sastre i sar., 2011). Ipak, Hindrikson i sar. (2016) navode signifikantnu genetičku diferenciranost i između dobro povezanih populacija vuka na nivou Evrope, kao što je npr.: između populacija Centralne i Istočne Evrope, baltičke i populacija nizijskog dijela Centralne Evrope, te diferenciranost karpatske i dinarsko - balkanske populacije. Interesantna je činjenica da se genetička diferenciranost i smanjen nivo protoka gena između populacija vukova veoma često javljaju u odsustvu stvarnih fizičkih barijera, što Pilot i sar. (2006) uočavaju za vukove Centralne i Istočne Evrope, a kao razlog navodi se prilagođenost vrste na ekološke faktore i razlika u načinu ishrane vrste određenog područja, što je potvrđeno i analiziranjem profila stabilnih izotopa ( $^{13}\text{C}$  i  $\text{d}^{15}\text{N}$ ) određenog seta genotipiziranih jedinki vuka (Pilot i sar., 2012). Genetička diferencijacija populacija vuka utiče na stvaranje lokalne strukturiranosti u populacijama ove vrste i omogućava definisanje puteva rekolonizacije (Czarnomska i sar., 2013, Leonard i sar., 2014). Hindrikson i sar. (2016) izdvajaju dinarsko - balkansku populaciju vuka kao populaciju sa veoma izraženom lokalnom strukturom, što se djelimično objašnjava i političkom strukturom ovog dijela Evrope koji geografski i politički obuhvata prostor osam država (Grčka, Albanija, Bugarska, Makedonija, Srbija, Bosna i Hercegovina, Hrvatska, Slovenija) između kojih postoje državne granice. Državne granice zasigurno ne predstavljaju prepreku u kretanju životinja, što je i utvrđeno detektovanjem protoka gena između jedinki vuka navedenog područja (Musiani i sar., 2009, Gomerčić i sar., 2010, Bakan i sar., 2014, Djan i sar., 2014), ali sprovođenje različitih



programa zaštite i menadžmenta vukova u određenoj državi (ili nesprovođenje kao što je slučaj u Bosni i Hercegovini) mogu potencijalno uticati na stvaranje lokalne strukture dinarsko - balkanske populacije (Kaczensky i sar., 2013).

Na teritoriji Bosne i Hercegovine, centralnoj subpopulaciji dinarsko - balkanske populacije vuka, primjenom mikrosatelitskih lokusa i analizama strukturiranosti populacije u STRUCTURE, TESS, DAPC i sPCA programskim paketima uočeno je postojanje strukturiranosti populacije na lokalnom nivou i distribucija jedinki u dva pretpostavljena genetička klastera ( $K=2$ ). Različiti rezultati su dobijeni analizom u GENELAND programskom paketu, gdje je u zavisnosti od vrste primjenjenog modela frekvencije alela uočena distribucija jedinki u dva (*uncorrelated* model), odnosno pet (*correlated* model) genetičkih klastera. Iako su primjenom *uncorrelated* modela frekvencije alela detektovana dva genetička klastera, rezultat nije u potpunosti u saglasnosti sa rezultatima iz prethodnih analiza. Razlika se uočava u pogledu geografske distribucije jedinki u pretpostavljene genetičke klastere, iz razloga što se detektovani genetički klasteri u potpunosti geografski preklapaju i ne uočava se izdvajanje jedinki vuka proučavane teritorije u određeni genetički klaster u odnosu na dio teritorije koju naseljavaju. Veći broj genetičkih klastera, detektovan primjenom *correlated* modela frekvencije alela, prema Mouri i sar. (2014) češće ukazuju na broj čopora nego na stvarnu strukturu populacije. Strukturiranost populacije je statistički slabo podržana, ali evidentna je kontinuirana distribucija jedinki istočnog i jugoistočnog (STRUCTURE, TESS, DAPC, sPCA) dijela proučavane teritorije u jedan, te jedinki ostalog dijela Bosne i Hercegovine u drugi genetički klaster. Nivo admiksije između vukova Bosne i Hercegovine je visok, što je i očekivano s obzirom na veliku mobilnost i protok gena navedene vrste na određenom području, a slični rezultati su registrovani i za populacije vuka Hrvatske i Italije (Fabbri i sar., 2014), te populacija Bugarske i Srbije (Bakan i sar., 2014). Uočena struktura je potvrđena i statistički značajnim vrijednostima  $F_{st}$  koeficijenta, te rezultatima AMOVA analize u kojoj je detektovana veća varijabilnost između grupa, u odnosu na varijabilnost unutar grupa, a najveća varijabilnost je uočena između jedinki unutar grupa. Ovakvi rezultati mogu biti posljedica prisustva srodnih jedinki u populaciji ili posljedica prolaska populacije kroz genetičko usko grlo, te ih treba posmatrati sa oprezom. Razlike u broju detektovanih genetičkih klastera, prisustvo velikog broja jedinki u admiksiji, odsustvo jasnog geografskog obrasca distribucije jedinki i izraženo srodstvo među jedinkama vuka Bosne i Hercegovine, ukazuju na slabu strukturu proučavane populacije. I pored navedenih činjenica ne



smije se zanemariti izdvajanje jedinki istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine u isti genetički klaster u odnosu na ostatak proučavanog uzorka, što je evidentno i konstantno kroz gotovo sve analize.

Vukovi sa teritorije Bosne i Hercegovine zauzimaju centralni položaj u okviru dinarsko - balkanske populacije, odnosno, predstavljaju sponu između planinskih područja Hrvatske na zapadu, Srbije na istoku i Crne Gore na jugo - istoku. Zbog specifičnog geografskog položaja moguće je da uočena slaba diferencijacija vukova Bosne i Hercegovine samo refleksija strukture na širem geografskom prostoru dinarsko - balkanske populacije. Pored toga, moguće je da usljed odsustva značajnije fizičke barijere, vukovi iz istočnog dijela Bosne i Hercegovine komuniciraju sa populacijom iz vuka Srbije. To je i potvrđeno analizama populacione strukture dinarsko - balkanskog seta podataka kod nekoliko jedinki sa navedenog područja. Analize ukazuju da je dinarsko - balkanska populacija diferencirana u dva genetička klastera, pri čemu se uočava jasna distribucija vukova iz Bosne i Hercegovine u jedan, a vukova Srbije u drugi genetički klaster. Broj jedinki u admiksiji između vukova Bosne i Hercegovine i Srbije je mali. To ukazuje na postojanje lokalne strukture u okviru dinarsko - balkanske populacije vuka, što je uočeno i analiziranjem sekvenci kontrolnog regiona mtDNK. Dio istočne i sjeveroistočne granice između Bosne i Hercegovine i Srbije predstavlja rijeka Drina, pa je moguće da je ona razlog diferenciranja vukova na ovom dijelu areala (Djan i sar., 2014). Kako rijeke ne predstavljaju prepreku za kretanje vuka, prethodno se ne može prihvatiti sa sigurnošću (Mech, 1988). Ipak, uočena struktura navedenog seta podataka visoko je statistički podržana i konzistentna je kroz gotovo sve analize. Kao i u analizi mikrosatelitskih lokusa vukova iz Bosne i Hercegovine, analiza dinarsko - balkanskog seta podataka sprovedena primjenom *correlated* modela frekvencije alela u GENELAND programskom paketu, ukazuje na distribuciju vukova u veći broj ( $K=5$ ) statistički podržanih genetičkih klastera. Jasna diferencijacija se i u ovom slučaju uočava isključivo između vukova iz Bosne i Hercegovine i Srbije, dok se na teritoriji Srbije ne uočava jasna distribucija jedinki u posebne pretpostavljene genetičke klastere. Statistički značajne vrijednosti  $F_{ST}$  koeficijenta predstavljaju dodatnu podršku za detektovanu strukturu dinarsko - balkanskog seta podataka. AMOVA analiza ukazuje na veću unutargrupnu- u odnosu na međugrupnu varijabilnost, dok je najveća uočena varijabilnost između jedinki unutar grupa. Sve navedeno ukazuje da je neophodno sprovesti populaciono - genetičke analize na čitavoj teritoriji koju naseljava dinarsko - balkanska populacija vuka. Jedino na taj način moguće je dobiti stvarne



podatke o strukturi koji će omogućiti identifikaciju upravljačkih i konzervacionih jedinica unutar dinarsko – balkanske populacije, te kreiranje integralnog plana zaštite.

Visoko mobilne vrste, kao što je vuk, veoma dobro se adaptiraju na geografske i ekološke uslove sredine. To za posledicu može imati genetičku diferenciranost populacija na lokalnom nivou, što dalje vodi ka restrikciji u protoku gena (Carmichael i sar., 2001, 2007, Geffen i sar., 2004, Weckworth i sar., 2005, Musiani i sar., 2007, Muñoz-Fuentes i sar., 2009, vonHoldt i sar., 2010, Scandura i sar., 2011, Stronen i sar., 2012). Različiti ekološki uslovi i povezanost sa susjednim subpopulacijama mogu predstavljati potencijalni uzrok strukturiranja populacije vuka u Bosni i Hercegovini. Povezanost istočne Bosne sa Srbijom, izvjesna izolovanost istočnog dijela Hercegovine (dolina rijeke Neretve) i veza sa Crnom Gorom mogli bi biti uzroci postojanja dva genetička klastera u populaciji vuka Bosne i Hercegovine. Slično se uočava i za susjednu populaciju vuka Hrvatske (Fabbri i sar., 2014), pri čemu je utvrđeno da su tri genetička klastera (Dalmacija, Gorski Kotar i Lika) nastala kao odgovor na različite ekološke uslove i različitu povezanost vukova navedenih teritorija sa vukovima iz susjednih subpopulacija.

Prisustvo jedinki u srodstvu takođe može uticati na strukturiranost određene populacije. Stoga izvršena je analiza srodstva vukova na području Bosne i Hercegovine, pri čemu je 36 grupa jedinki pokazalo puno srodstvo. Jedinke iz svih dijelova Bosne i Hercegovine pokazale su međusobno puno srodstvo, bez obzira koji dio Bosne i Hercegovine naseljavaju. To ukazuje da srodstvo nije faktor koji je uticao na uočenu strukturiranost vuka Bosne i Hercegovine. Sa druge strane uočeno srodstvo jasno ukazuje na visok protok gena između vukova na prostoru Bosne i Hercegovine, što je i potvrđeno i analizama genetičke varijabilnosti. Analiza srodstva među jedinkama vukova iz Poljske i Bjelorusije (Jedrzejewski i sar., 2005), Kavkaza (Pilot i sar., 2014) i Gruzije (Kopaliani i sar., 2014) pokazala je da je srodstvo ženki iz različitih čopora izraženija nego što je to kod mužjaka. Međutim to nije uticalo na strukturiranje unutar pomenutih populacija. Takođe, konstatovano je da su jedinke u srodstvu registrovane uglavnom na udaljenim geografskim lokacijama, što relativno jasno ukazuje na velike disperzije iz matičnih čopora, odnosno, na dobar protok gena unutar populacija vukova u ovom dijelu areala.

Diferenciranje vukova na lokalnom nivou uočeno je i analiziranjem sekvenci mtDNK. Međutim upotrebom ovog genetičkog markera na širem geografskom kontekstu nije uočen jasan prostorni obrazac genetičkih linija (Vilà i sar., 1999, Pilot i sar., 2010, Hindrikson i sar., 2016, Montana i

sar., 2017). U do sada najobuhvatnijoj studiji filogeografske istorije vuka na nivou Evrope koja je sprovedena na uzorku od 947 jedinki (Pilot i sar., 2010) utvrđeno je da haplotipovi vuka formiraju dvije glavne genetičke grupe: haplogrupu 1 i 2, koje ne pokazuju jasan alopatrijski obrazac distribucije, ali imaju različitu frekvenciju u jugozapadnim (Iberijsko i Apeninsko poluostrvo) i istočnim dijelovima Evrope (Balkan, istočna i sjeveroistočna Evropa). S obzirom da su obje haplogrupe prisutne u populacijama iz Evrope i Azije, dok je u Sjevernoj Americi prisutna samo haplogrupa 1, nije moguće definisati evolutivne signifikantne jedinice na nivou cjelokupnog areala vrste (Vilà i sar., 1999, Sharma i sar., 2004, Aggarwal i sar., 2007, Pilot i sar., 2010). Iako navedene haplogrupe ne formiraju jedinstvene evropske grupe, predstavljaju glavnu zonu diferenciranja svjetske populacije vuka. Analiziranjem znatno dužih sekvenci kontrolnog regiona mtDNK vuka Evrope i Zapadne Azije, uočeno je grupisanje vukova u 7 haplogrupa, ali ponovo bez jasnog filogeografskog obrasca (Hindrikson i sar., 2016). Iako se genetička divergencija i koalescencija udaljenih filogenetičkih linija većine vrsta vezuju se za rani Pleistocen ili Pliocen (Hewitt, 2000), za vuka je ipak poznato da je vrijeme koalescencije svih poznatih linija mtDNK period prije oko 200000-290000 godina (Vilà et al., 1999). To je znatno ranije u odnosu na prethodno navedene epohe, što ukazuje da su haplotipovi vuka nastali mnogo prije perioda posljednje glacijacije.

U ovoj studiji, filogeografskim analizama haplotipova jedinki vuka na nivou Evrope, uočeno je grupisanje haplotipova u dvije haplogrupe: haplogrupu 1 i haplogrupu 2, bez jasnog filogeografskog obrasca distribucije. Iako je za vukove Bosne i Hercegovine uočen relativno visok nivo genetičke varijabilnosti i prisustvo obje definisane haplogrupe, strukturiranost populacije nije uočena, ali, primjećuje se veća zastupljenost haplotipova koji su jedinstveni i/ili najučestaliji za dinarsko - balkansku populaciju. To ukazuje na djelimičnu izolovanost i veću genetičku raznovrsnost ove populacije u odnosu na ostale evropske, što je utvrđeno i analizom mikrosatelitskih lokusa. Analiziranjem seta sekvenci vukova iz Bosne i Hercegovine, uočena je veća raznovrsnost jedinstvenih haplotipova, u odnosu na raznovrsnost detektovanu analiziranjem istih sekvenci u okviru evropskog seta podataka. Rezultat se može objasniti većom informativnošću sekvenci vukova iz Bosne i Hercegovine, usljed veće dužine. Pored haplotipova koje dijele sa ostalim jedinkama dinarsko - balkanske populacije vuka (C123, C113, C1blk2), u populaciji vuka Bosne i Hercegovine uočava se prisustvo haplotipova koji su detektovani i u drugim evropskim populacijama vuka. Prisustvo haplotipa C16/14 među jedinkama iz Bosne i



Hercegovine ukazuje na dobru povezanost sa vukovima južnih, istočnih, centralnih i baltičkih dijelova Evrope, a prisustvo haplotipa C110 i na povezanost sa vukovima Iberijskog poluostrva na zapadu. Ovakva distribucija ovih haplotipova ukazuje na povezanost matrijarhalnih linija u populaciji evropskog vuka. Evidentno je i da se diverzitet haplotipova na ovom prostoru povećao nakon posljednje glacijacije. Ekspanzijom haplogrupe 1 i pojavom jedinstvenih haplotipova u isto vrijeme dolazi do djelimične izolovanost svih subpopulacija dinarsko - balkanske populacije vuka u odnosu na ostatak Evrope. Veliki broj jedinstvenih haplotipova može se objasniti činjenicom da je ova populacija bila izolovana više od jednog vijeka od ostalih evropskih populacija (Hindrikson i sar., 2016). Istovremeno detekcija navedenih haplotipova u svim populacijama ukazuje na kontinuiran protok gena između jedinki vukova koje naseljavaju dinarsko – balkanski prostor. U prethodnom istraživanju filogeografske strukture vuka Bosne i Hercegovine (Šnjegota i sar., 2014) takođe nije uočeno prisustvo prostorne strukturiranosti, ali studije sprovedene na nivou Centralnog Balkana (Djan i sar., 2014) ukazuju da se vukovi Bosne i Hercegovine grupišu zajedno za vukovima Hrvatske u tzv. zapadnu grupu, a vukovi Srbije i Makedonije u tzv. istočnu grupu. Isti obrazac strukture genetičke varijabilnosti vukova dinarsko - balkanske populacije uočen je i analiziranjem mikrosatelitskih lokusa. Analiziranjem SNP-ova dijela uzorka dinarsko - balkanske populacije, Stronen i sar. (2018) takođe uočavaju određeni gradijent u strukturi između jedinki iz Slovenije, Hrvatske i Bosne i Hercegovine, odnosno, iz Srbije, Crne Gore, Makedonije, Bugarske i Grčke, koji ukazuje na distribuciju jedinki u dva potencijalna genetička klastera. Djan i sar. (2014) su dodatno testirali hipotezu, baziranu na morfometrijskoj diferencijaciji, da rijeke Morava i Vardar predstavljaju granicu (Milenković 1997) koja diferencira subpopulacije u Centralnom Balkanu. Analizom MtDNK između vukova na prostoru istočne Srbije i Makedonije, odnosno zapadne Srbije i Makedonije nije uočena ranije opisana diferencijacija. Čini se da je vjerovatnije da rijeka Drina predstavlja izvjesni filter koji djelimično razdvaja subpopulacije na sjeverozapadu od onih ja jugoistoku. To je moguć scenario kada se sagledaju rezultati analiziranja mikrosatelitskih lokusa jedinki vukova Bosne i Hercegovine. Prema ovim rezultatima nekoliko jedinki koje se nalaze uz kopnenu granicu sa Srbijom, grupišu se u genetički klaster sa jedinkama iz Srbije, dok se jedinke duž granice sa rijekom Drinom jasno diferenciraju u odnosu na jedinke vuka Srbije. Ipak, u literaturi nema podataka da je rijeka prepreka za kretanje vukova, tako da se prethodno navedeno ne može prihvatiti kao jedino objašnjenje za dobijene rezultate. Moguće je da je prolazak populacija kroz



genetičko usko grlo u skorašnje vrijeme jedan od faktora koji je uticao na strukturu genetičkih linija na ovom prostoru. U literaturi je takođe poznato da lov predstavlja jedan od veoma važnih faktora koji mogu uticati na strukturiranost populacije. Tako Hindrikson i sar. (2013) ovaj fenomen uočavaju za vukove iz Estonije i Letonije. Potencijalno to bi mogao biti slučaj i kod dinarsko - balkanske populacije vuka. Vuk je jedino u Hrvatskoj i Sloveniji (u okviru dinarsko - balkanske populacije) zakonom zaštićena vrsta. U ostalim državama on je lovna vrsta koja se nalazi pod snažnim lovnim pritiskom. Lovni pritisak dokazano može uticati na strukturiranje populacija (Hindrikson i sar. 2013). Prisustvo obje definisane haplogrupe među vukovima iz Bosne i Hercegovine, ali i na prostoru čitave dinarsko - balkanske populacije, ukazuje da je ova krupna karnivora veoma dugo prisutna na ovim prostorima, te da ima veoma važnu ulogu u rekolonizaciji susjednih populacija (Ražen i sar., 2016).

Veći diverzitet haplotipova vuka haplogrupe 1 uočava se i na nivou cijele Evrope. Najmanji diverzitet haplotipova karakterističan je za populacije vuka Iberijskog i Apeninskog poluostrva. Nizak diverzitet za ove populacije je očekivan jer su one prošle kroz genetičko usko grlo još u 18. vijeku, što je za posljedicu imalo dugotrajnu izolovanost u odnosu na ostale evropske populacije vuka (Pilot i sar., 2010). U populacijama vuka Apeninskog poluostrva, veoma dugo je bio prisutan samo jedan haplotip (C122) (Randi i sar., 2000, Pilot i sar., 2010), dok Montana i sar. (2017) uočavaju prisustvo i haplotipa C16 kod nekoliko jedinki. Prisustvo ovog drugog haplotipa (C16) ukazuje na uspostavljanje protoka gena između vukova navedenog područja i ostatka Evrope. Postojanje ove komunikacije dokazano je telemetrijskim tehnikama praćenja vukova. Ova istraživanja potvrđuju rekolonizacije populacija u Italiji jedinkama iz dinarsko - balkanske populacije. Za navedeno područje tipično je prisustvo isključivo haplogrupe 2, dok su na Iberijskom poluostrvu malobrojni haplotipovi bili distribuirani isključivo u haplogrupi 1, u kojoj su uočeni i novi jedinstveni haplotipovi (Pires i sar., 2017). Isti autori uočavaju i prisustvo haplotipova haplogrupe 2 na navedenoj teritoriji, što ukazuje na uspostavljanje protoka gena između izolovanih populacija Zapadne Evrope sa ostatkom evropskog areala i povećanje diverziteta haplotipova. Dinarsko - balkanska populacija vuka je okarakterisana velikim brojem jedinstvenih haplotipova što predstavlja posljedicu dugotrajne izolovanosti u prošlosti (Hindrikson i sar., 2016). Istovremeno ona pokazuje povezanost sa populacijama vuka ostalih dijelova Evrope, naročito istočnog i južnog dijela, a prisustvo obje haplogrupe ukazuje na prisustvo vukova daleko u prošlosti. Na nivou Evrope najveći diverzitet haplotipova vuka uočava



se u populaciji vuka Bugarske (Pilot i sar., 2010). Na osnovu distribucije haplotipova uočen je veći protok gena između populacija iz Centralne Evrope, Baltika i Skandinavije, kao i prisustvo obje detektovane haplogrupe. Ove činjenice ukazuju da Rusija potencijalno predstavlja tranzitnu zonu kretanja vukova iz Centralne Evrope i Baltika (preko Karelije), pa sve do skandinavskog područja. Za populacije iz Skandinavije uočeno je povećanje distribucije haplotipova. To je i očekivano s obzirom da su navedene populacije prošle kroz drastično genetičko usko grlo u prošlosti, od čega se trenutno oporavljaju (Flagstad i sar., 2003). Diferenciranost vukova Centralne Evrope u odnosu na ostale evropske populacije, rasprostranjene prema jugu, ukazuje da bi Karpati mogli predstavljati granicu razdvajanja navedenih populacija vukova.

Iako se haplogrupe preklapaju u geografskom pogledu, postoji razlika u filogeografskom obrascu distribucije haplotipova i haplogrupa u Evropi. Prema tom obrascu Centralna Evropa predstavlja raskrnicu distribucije i hibridnu zonu brojnih genetičkih linija koje su nastale alopatrijskom evolucijom (Hewitt, 2000, Schmitt, 2007). Populacije vuka južnih i centralnih dijelova Evrope su stoga genetički udaljene, a populacije istočnih dijelova Evrope (Balkana i Karpata) pokazuju signale admiksije, što se uočava analiziranjem mikrosatelitskih lokusa, mtDNK i SNP-ova. Ipak, da bi se u potpunosti rekonstruisali filogeografski putevi rekolonizacije vuka na nivou Evrope i svijeta, neophodno je na sveobuhvatnom geografskom prostoru i širokoj vremenskoj distribuciji analizirati mnogo duže sekvence, kako recentnih, tako i predačkih linija.

Navedena distribucija haplotipova vuka Evrope u dvije haplogrupe, visoko je statistički podržana u filogenetskom stablu. Genetičkom klasteru koji odgovara haplogrupi 2 pripadaju haplotipovi koji se smatraju predačkim. Haplotipovi C15, C115, C19 i C111 zauzimaju bazalnu poziciju na stablu, što je karakteristika haplotipova koji su bili prisutni i u dalekoj istoriji, što i jeste slučaj sa navedenim haplotipovima. Međutim, s obzirom da njihovo odvajanje nije statistički podržano i da su se u ranijim studijama grupisali sa haplotipovima koji pripadaju evolutivno starijoj haplogrupi 2, mogu se svrstati u ovu haplogrupu. Analiziranje predačkih haplotipova vukova (44000 - 1400 godina prije nove ere) zapadnog i centralnog dijela Evrope (Pilot i sar., 2010, Germonpré i sar., 2009), pokazalo je da su se svi haplotipovi iz tog perioda grupisali u haplogrupu 2. Ova činjenica nedvosmisleno ukazuje na dominantnost haplogrupe 2 tog dijela Evrope prije posljednjeg ledenog doba. Navedena haplogrupa je fiksirana u populaciji vuka sa Apeninskog poluostrva što ukazuje na redukovan protok gena između ove i populacija istočne



Evrope. Činjenica da su vukovi sa Apeninskog poluostrva hiljadama generacija izolovani u odnosu na ostale Evropske populacije (Lucchini i sar., 2004) može objasniti uzrok ovog redukovanog protoka gena. Iako haplotipovi haplogrupe 1 uglavnom imaju monofiletsku organizaciju, ona ipak nije recipročna evolucijskim signifikantnim jedinicama, ali može se uočiti da se određeni srodni haplotipovi klasteruju zajedno što se naročito uočava za haplotipove sa Iberijskog polustrva. To je očekivano s obzirom da je navedena populacija veoma dugo prostorno i vremenski izolovana u odnosu na ostale evropske populacije vuka.

### **7.3. REKONSTRUISANJE DEMOGRAFSKE ISTORIJE VUKA NA EVROPSKOM NIVOU**

Sewall Wright je 1931. godine prvi uveo koncept efektivne veličine populacije ( $N_e$ ) u nauku. Ovaj parametar kasnije postaje fundamentalan u proučavanjima u okviru evolucione genetike i konzervacione biologije iz razloga što može ukazati na inbriding i gubitak genetičke varijabilnosti (Waples, 2002). Ukoliko populacija prolazi kroz genetičko usko grlo dolazi do značajne redukcije efektivne veličine populacije, povećanja nivoa inbridinga, te posljedično, gubitka genetičke varijabilnosti, tako da samo određene jedinke populacije preživljavaju i reprodukuju se, odnosno imaju direktan uticaj na formiranje narednih generacija (Allendorf i Luikart, 2007). Wang (2005) definiše  $N_e$  kao količinu i distribuciju genetičke varijabilnosti određene populacije koja je oblikovana konstantnim interakcijama i uticajima prirodne selekcije, mutacija i migracija. Luikart i sar. (2010) ističu da je detektovanje vrijednosti efektivne veličine populacije, koja uglavnom ima manje vrijednosti u odnosu na brojnost jedinki u cenzus populaciji (Palstra i Ruzzante, 2008) izuzetno važno u menadžmentu i konzervaciji divljači. Precizno određivanje vrijednosti efektivne veličine populacije primjenom određenih demografskih metoda izuzetno je teško i zahtjeva saznanja o istorijskom kretanju i reprodukciji populacije (Allendorf i Luikart, 2007). Vrlo često ove vrijednosti mogu biti precijenjene iz razloga što demografske metode rijetko uključuju neke od bitnih parametara, kao što su promjene u reproduktivnom uspjehu populacije (Luikart i sar., 2010). Franklin (1980) uspostavlja 50/500 pravilo, koje se veoma često koristi kao vodeće pravilo u određivanju i objašnjavanju rezultata efektivne veličine populacije. Prema navedenom pravilu vrijednosti  $N_e$  određene populacije treba da budu veće ili jednake 50 ( $N_e \geq 50$ ) da bi se kratkoročno izbjeglo iščezavanje populacije zbog štetnih efekata inbriding depresije, odnosno jednake ili veće od 500



( $N_e \geq 500$ ), da bi se održao dugotrajni evolutivni potencijal populacije (Jamieson i Allendorf, - 2012).

U ovom istraživanju procjena efektivne veličine populacije vuka Bosne i Hercegovine izvršena je određivanjem neravnoteže vezanosti gena (LD - *linkage disequilibrium*, engl.) analiziranog uzorka u LDNe v1.31 programskom paketu. Navedena metoda može dati pogrešan rezultat ukoliko neki drugi faktor, npr. substrukturiranost, utiče na vrijednosti LD-a (Luikart i sar., 2010). Ipak, čini se da je navedena metoda neosjetljiva na efekat protoka gena, čak i kada je stopa migracija visoka ( $m \sim 0,10-0,25$ ), te se stoga može pouzdano koristiti u detekciji ranih indikacija fragmentacije i opadanja veličine populacije (England i sar., 2006, Luikart i sar., 2010), i može dati veoma razumne vrijednosti efektivne veličine lokalne populacije (Waples i Do, 2010). S obzirom na reproduktivno ponašanje vuka (svoga nekoliko jedinki učestvuje u reprodukciji), očekivano je da vrijednosti efektivne veličine populacije budu niske u odnosu na procenjeni veličinu populacije. Za vukove Bosne i Hercegovine registrovane srednje vrijednosti efektivne veličine populacije ( $N_e = 41,5$ ) ukazuju da je prema Franklinovom 50/500 pravilu populacija u blagom padu, i da je izložena inbridingu. Posljedice pada brojnosti i ukrštanja u srodstvu će se tek kasnije uočiti. Ovakav rezultat izaziva zabrinutost u dugoročnom pogledu i zahtijeva hitno sprovođenje mjera zaštite i adekvatnih mjera upravljanja populacijom vukova u Bosni i Hercegovini. Vrijednosti efektivne veličine populacije, određene u istom programskom paketu, kod vukova sa Kavkaza ( $N_e = 88$ ; 95% CIs: 68–119) i iz Bugarske ( $N_e = 145$ ; 95% CIs: 114–195), takođe ukazuju na postepeno opadanje veličine populacija i ukrštanje u srodstvu koje je najvjerojatnije posljedica nekontrolisanog lova (Moura i sar., 2014). Demografska rekonstrukcija, zasnovana na LD obrascu, ukazala je na dugoročnu demografsku nestabilnost i pad populacije vukova na Kavkazu, koji počinje još prije 60000 godina. Dugoročno opadanje veličine populacija registrovano je i u Istočnoj Evropi, Italiji i Španiji (Pilot i sar., 2014). Primjenom iste metode u analizi kompletnih genoma vuka iz Evrope, Srednjeg Istoka i Istočne Azije (Freedman i sar., 2014) uočeno je dugoročno opadanje efektivne veličine populacija na daleko širem geografskom prostoru. Procjenjeno je da je pad brojnosti populacija na ovim prostorima počeo prije 20000 godina.

Redukcija efektivne veličine populacije može biti posljedica prolaska populacije kroz genetičko usko grlo i može imati efekat na strukturiranost određene populacije. Faktori koji dovode do



ispoljavanja efekata genetičkog uskog grla i posljedično redukcije genetičke varijabilnosti su genetički drift i inbriding (Allendorf i Luikart, 2007). Posljedice djelovanja navedenih faktora na redukciju veličine date populacije ne moraju se uvijek odmah uočiti. Poznato je nekoliko primjera kada se zna da su populacije prošle kroz velike redukcije u brojnosti (Busch i sar., 2007, Peery i sar., 2012), ali efekte *bottleneck-a* nije bilo moguće uočiti. Neki od razloga za prethodno navedeno mogu biti: *bottleneck* nije imao dovoljno snažan efekat, desio se veoma davno u prošlosti, njegovi signali su izbrisani imigracijama, veličina proučavanog uzorka bila je veoma mala i/ili pretpostavljeni evolucionarni parametri su pogrešni (Peery i sar., 2012). Tako se npr. za populacije vuka iz Finske i Rusije navodi da je protok gena jedan od najvažnijih faktora koji umanjuje efekte *bottleneck-a*, te ga je iz tog razloga nemoguće detektovati.

Djan i sar. (2014) analiziranjem mtDNK ukazuju na prolazak populacija vuka centralnog Balkana kroz genetičko usko grlo. Efekat je naročito primjetan unutar sjevero - zapadne populacije kojoj pripadaju vukovi sa područja Hrvatske i Bosne i Hercegovine. U okviru ove doktorske disertacije nisu uočeni ni signali *bottleneck-a*, ali ni ekspanzije populacije, što implicira da detektovana struktura vuka iz Bosne i Hercegovine nije posljedica prolaska populacije kroz genetičko usko grlo. Ipak, s obzirom da su prethodna istraživanja ukazala na pad brojnosti navedene populacije, limitirajući faktor za detekciju signala *bottleneck-a* mogao bi biti protok gena (kao u slučaju vukova Finske i Rusije) između vukova Bosne i Hercegovine i ostalih subpopulacija dinarsko - balkanske populacije. Pad brojnosti populacije mogao je uticati na detektovane vrijednosti efektivne veličine populacije, što ukazuje da je populacija vukova iz Bosne i Hercegovine potencijalno izložena recentno blagim efektima genetičkog uskog grla koji će se tek naknadno uočiti. Ipak, redukcija efektivne veličine populacije vuka Bosne i Hercegovine nije toliko izražena kao u recentnoj populaciji vuka na području Italije. Za apeninsku populaciju je utvrđeno da njena efektivna veličina ima znatno niže vrijednosti u odnosu na iste prije prolaska populacija kroz genetičko usko grlo, što je dovelo do opadanja brojnosti populacije, a zatim i njene izolacije (Montana i sar., 2017). Isti autori ukazuju na znatno manju efektivnu veličinu populacija vuka sa Iberijskog polustrva i Balkana nakon prolaska kroz genetičko usko grlo. Analiziranjem mikrosatelitskih lokusa populacije vuka iz Srbije nije uočen prolazak populacija kroz genetičko usko grlo (Djan i sar., 2016), što je prethodno uočeno analiziranjem mtDNK. Različita zapažanja o signalima genetičkog uskog grla u istoj populaciji mogu biti posljedica primjene različitih molekularnih markera. Naime,



mikrosatelitski lokusi su za razliku od mtDNK, adekvatniji za reflektovanje skorašnjih demografskih promjena, dok nam mtDNK može ukazati na prolazak populacije kroz usko genetičko grlo ranije u prošlosti. U populaciji vuka Hrvatske analiziranjem mtDNK uočen je prolazak populacije kroz genetičko usko grlo 80-ih godina prošlog vijeka, za koji Gomerčić i sar. (2010) smatraju da nije bio dovoljno snažan da ugrozi stabilnost navedene populacije. Fabbri i sar. (2014) uočavaju skorašnji efekat *bottleneck-a* unutar populacija vuka u Hrvatskoj i Italiji. Nasuprot tome, Moura i sar. (2014) ne uočavaju ovaj fenomen kod vukova iz Bugarske. Upravo snažan efekat genetičkog uskog grla koji je karakterističan za populacije vuka na Apeninskom (Lucchini i sar., 2004) i Iberijskom poluostrvu (Sastre i sar., 2011) značajno je uticao na njihovu diferencijaciju, udaljavanje, te redukciju protoka gena sa ostalim evropskim populacijama vuka. Takođe, drastičnu redukciju genetičke varijabilnosti, što predstavlja posljedicu snažnog *bottleneck-a*, osjetile su i populacije vuka Sjeverne Evrope (Seddon i sar., 2005, Aspi i sar., 2009). Jake signale prolaska populacije kroz genetičko usko grlo uočavaju Hindrikson i sar. (2013) za nekoliko grupa estonsko - litvanskog dijela baltičke populacije vuka.

Demografski faktori znatno mogu izmijeniti obrazac protoka gena. Sa druge strane povećanje brojnosti populacije može rezultovati disperzijom mladih jedinki na veoma velike udaljenosti. Ove velike disperzije su dokumentovane na sjeveru (Vilà i sar., 2003) i zapadu areala (Ciucci i sar., 2009, Lampreave i sar., 2011). U skorašnje vrijeme registrovana je disperzija jednog mladog mužjaka koji je migrirao iz Slovenije ka sjeveru Italije (Ražen i sar., 2016).

Demografske promjene koje su se dešavale u prošlosti u populaciji vuka Evrope, mogu se djelimično rekonstruisati. Limitirajući faktori za rekonstrukciju istorijskih demografskih promjena su odsustvo ili analiziranje malog broja ancestralnih uzoraka sa ograničenog geografskog područja, te nedostatak podataka o stanju populacije u prošlosti. Najbolji uvid u demografsku istoriju daje zajednička analiza što većeg broja recentnih i ancestralnih uzoraka sa šireg geografskog područja.

Analizom *mismatch* distribucije i konstrukcijom *Bayesovih skyline* grafikona recentnih i ancestralnih vukova sa područja Evrope (Pilot i sar., 2010) zaključeno je da evropska populacija u posljednjih nekoliko hiljada godina prolazi kroz demografsku ekspanziju. Navedene podatke treba posmatrati sa oprezom iz razloga što je analiziran mali broj ancestralnih uzoraka (što može



dovesti do precjenjivanja nivoa stope mutacija) sa ograničene teritorije, uz nedostatak podataka o stvarnom stanju populacija sjeverozapadnog dijela Evrope. Pored toga, dužina analiziranih sekvenci ancestralnih uzoraka veoma je kratka (57bp) (Pilot i sar., 2010), broj varijabilnih pozicija posljedično veoma veliki, što može dovesti do pogrešne interpretacije o visokoj stopi supstitucija. Visoka stopa diverziteta haplotipova, niska stopa diverziteta nukleotida i visok nivo supstitucija evropskog seta sekvenci u ovom istraživanju ukazuju na skorašnju demografsku ekspanziju populacije. Na to dodatno ukazuju i statistički značajne negativne vrijednosti Fuovog Fs testa. Pored toga, unimodalna distribucija parova nukleotidnih razlika evropskog seta sekvenci i haplogrupe 1, detektovana konstrukcijom grafikona *mismatch* distribucije, takođe ukazuje na demografsku ekspanziju evropske populacije vuka. Ovakvi rezultati mogu ukazivati na oporavak evropske populacije nakon prolaska kroz genetičko usko grlo. Iako su vrijednosti Fuovog Fs testa za haplogrupu 2 statistički značajne, uočena bimodalna distribucija nukleotidnih parova ukazuje na demografsku stabilnost navedene haplogrupe što se može objasniti činjenicom da je haplogrupa 2 bila znatno zastupljenija u prošlosti, te da u današnje vrijeme ima znatno redukovan opseg distribucije i manju frekvenciju u odnosu na haplogrupu 1.

Iz konstruisanih Bayesovih *skyline* grafikona uočava se blagi rast haplogrupe 2 tokom posljednjih 150000 - 125000 godina i demografska stabilnost u periodu od prije 40000 - 50000 godina. To djelimično odgovara periodu interglacijacija u pleistocenu (period prije oko 55000 - 30000 godina), kada su uslovi spoljašnje sredine bili povoljni i nisu se drastično mijenjali, što je vjerovatno imalo efekat na stabilizovanje populacija. Period ekspanzije haplogrupe 2 počeo je mnogo ranije u prošlosti u odnosu na haplogrupu 1, što je i očekivano s obzirom da je haplogrupa 1 evolutivno mlađa. Period ekspanzije haplogrupe 1 je period nakon posljednjeg glacijalnog maksimuma što je u skladu sa periodom izmjene frekvencija haplogrupa vuka prema Pilot i sar. (2010). Navedeni autori navode da ekološki faktori i izbor plijena imaju veoma važnu ulogu u oblikovanju genetičkih i demografskih procesa u sadašnjim i predačkim populacijama vuka, što je naročito vidljivo kod pleistocenske populacije sa područja Sjeverne Amerike. Za razliku od Amerike, gdje je haplogrupa 2 pleistocenskog vuka u potpunosti zamjenjena haplogrupom 1 modernog, recentnog, vuka, u Evropi su se obje haplogrupe zadržale. Isti pravac izmjene haplogrupa na oba kontinenta ukazuju da same izmjene vjerovatno nisu bile slučajne i da su povezane sa ekološkim promjenama koje su se desile tokom posljednjeg glacijalnog maksimuma. Ipak, ne treba zanemariti paleontološke nalaze koji ukazuju na kontinuirano



prisustvo vuka u sjevernoj hemisferi u toku posljednje glacijacije i njen neznatan uticaj na distribuciju vrste (Sommer i Benecke, 2005, Leonard i sar., 2007), što zahtjeva analiziranje znatno dužih sekvenci kontrolnog regiona mtDNK recentnih i ancestralnih vukova.

#### **7.4. IMPLIKACIJE ZA KONZERVACIJU I MONITORING POPULACIJE VUKA BOSNE I HERCEGOVINE**

Ova studija predstavlja prvu i sveobuhvatnu genetičku karakterizaciju populacije vuka sa prostora Bosne i Hercegovine. Ovo istraživanje je bilo neophodno sprovesti, jer su prethodne analize zasnovane na ograničenom broju uzoraka, koji su porijeklom sa dijela proučavanog areala, ukazale na opadanje brojnosti populacije. Sprovedenim analizama registrovana je visoka genetička varijabilnost populacije vuka iz Bosne i Hercegovine, koja se ogleda u velikom broju uočenih alela i prisustvu jedinstvenih haplotipova. Zatim, registrovane su vrijednosti Ne koje ukazuju na potencijalni pad brojnosti populacije vuka Bosne i Hercegovine, što je u skladu sa podacima koji su objavljeni u ranije publikovanim radovima (Đan i sar., 2014, Šnjegota i sar., 2016). Potencijalno strukturiranje dinarsko - balkanske populacije, gdje Bosna i Hercegovina predstavlja granicu razdvajanja, ima značaj za konzervaciju i buduće upravljanje populacijom vuka Bosne i Hercegovine. Dobijeni rezultati imaju veliki značaj u kreiranju nacionalnog monitoringa, sa centralnim fokusom na molekularno - genetički monitoring. Evidentirani pad Ne ukazuje na potrebu daljnjeg praćenja ovih vrijednosti jer, ukoliko populacija nastavi da opada, može doći do njenog ponovnog prolaska kroz genetičko usko grlo. Primjenom iste metodologije može se pratiti i protok gena sa susjednim populacijama. Prikupljanjem neinvazivnih uzoraka (fecesa, dlake, urina, pljuvačke) može se dati preciznija procjena brojnosti populacije vuka Bosne i Hercegovine.

Ukoliko se podacima uočenim molekularno - genetičkim analizama dodaju i podaci dobijeni primjenom metode fotozamki i satelitskim praćenjem vukova, dobija se veoma kvalitetan monitoring. U tu svrhu, istovremeno sa molekularno - genetičkom karakterizacijom populacije vuka Bosne i Hercegovine, pokrenuti su i projekti čiji je primarni cilj monitoring vukova na kompletnoj teritoriji Bosne i Hercegovine primjenom metode fotozamki. Ovom metodom možemo dobiti podatke o prisustvu, brojnosti i aktivnosti jedinki i/ili čopora. Na osnovu podataka koji su do sada dobijeni monitoringom vukova primjenom fotozamki, utvrđeno je da je



njihova brojnost znatno manja od pretpostavljene, te da ima tendenciju opadanja. Projekti su financirani od strane Rufford Fondacije iz Velike Britanije.

# 8. ZAKLJUČAK



Genetička karakterizacija populacije vuka Bosne i Hercegovine, izvršena primjenom autozomalnih mikrosatelitskih lokusa i dijela kontrolnog regiona mtDNK kao genetičkih markera ispunila je postavljene ciljeve istraživanja, a dobijeni rezultati ukazuju da su pretpostavljene hipoteze korektne i u potpunosti potvrđene. Na osnovu svih dobijenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. autozomalni mikrosatelitski lokusi koji su korišćeni u analizi genetičke varijabilnosti, detekciji populacione strukture, analizi srodstva, detekciji ukrštanja u srodstvu i uočavanju prolaska vukova Bosne i Hercegovine kroz genetičko usko grlo, pokazali su odgovarajući nivo polimorfizma na osnovu čega su dobijeni rezultati gore navedenih analiza;
2. odabranim setom prajmera za amplifikaciju dijela kontrolnog regiona mtDNK vuka, produkovane su dovoljno informativne sekvence na osnovu kojih su detektovani jedinstveni haplotipovi vuka Bosne i Hercegovine, te je utvrđen filogeografski položaj vukova Bosne i Hercegovine u evropskom kontekstu;
3. primjenom molekularnih markera detektovan je umjereno visok nivo genetičke varijabilnosti proučavane populacije koji je u skladu sa gradijentom heterozigotnosti vuka na nivou Evrope u pravcu jug - sjever, te rezultatima prethodnih studija koji su ukazali da je nivo genetičke varijabilnosti dinarsko - balkanske populacije među najvećim u čitavoj Evropi;
4. prethodna istraživanja dinarsko - balkanske populacije vuka ukazala su na prisustvo lokalne strukturiranosti u navedenoj populaciji, što je detektovano i u ovom istraživanju primjenom mikrosatelitskih lokusa kako za populaciju vuka sa područja Bosne i Hercegovine, tako i za čitavu dinarsko - balkansku populaciju. Uočeno je grupisanje jedinki vuka Bosne i Hercegovine u dva genetička klastera što, s obzirom na slabu statističku podržanost, najvjerovatnije ukazuje na prisustvo strukture na višem nivou. Prethodno navedeno je detektovano analizama populacione strukture dijela dinarsko - balkanske populacije vuka, gdje je uočena diferencijacija vukova iz Bosne i Hercegovine i Srbije u odvojene genetičke klasterne;
5. za vuka Bosne i Hercegovine nisu detektovani statistički značajni signali prolaska populacije kroz genetičko usko grlo u skorijoj prošlosti;



6. analizama sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK uzorka vukova iz Bosne i Hercegovine uočena je distribucija haplotipova u dvije, u literaturi opisane haplogrupe (haplogrupa 1 i haplogrupa 2) bez jasnog alopatrijskog obrasca;

7. analizama sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK uzorka vuka Evrope uočeno je da se demografska ekspanzija haplogrupe 2 desila mnogo ranije u prošlosti u odnosu na period ekspanzije haplogrupe 1;

8. rezultati dobijeni u ovom istraživanju su veoma aplikativni i predstavljaju dobru osnovu za uspostavljanje održivog menadžmenta i kreiranja plana zaštite na nivou Bosne i Hercegovine, i šire na nivou čitave dinarsko - balkanske populacije.



# 9. PRILOZI

**-Prilog 1-**

*The Canine Genotypes™ Panel 1.1 kit (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland)*

<b>ID lokusa</b>	<b>Hromozom</b>	<b>Ponavljajući motiv</b>	<b>Veličina alela</b>	<b>Fluorescentna boja</b>
<b>AHTk211</b>	26	di	79-101	Plava
<b>CXX279</b>	22	di	103-133	Plava
<b>REN169O18</b>	29	di	150-170	Plava
<b>INU055</b>	10	di	190-216	Plava
<b>REN54P11</b>	18	di	222-244	Plava
<b>INRA21</b>	21	di	87-111	Zelena
<b>AHT137</b>	11	di	126-156	Zelena
<b>REN169D01</b>	14	di	199-221	Zelena
<b>AHTh260</b>	16	di	230-254	Zelena
<b>AHTk253</b>	23	di	277-297	Zelena
<b>INU005</b>	33	di	102-136	Crna
<b>INU030</b>	12	di	139-157	Crna
<b>Amelogenin</b>	X	-	174-218	Crna
<b>FH2848</b>	2	di	222-244	Crna
<b>AHT121</b>	13	di	68-118	Crvena
<b>FH2054</b>	12	tetra	135-179	Crvena
<b>REN162C04</b>	7	di	192-212	Crvena
<b>AHTh171</b>	6	di	215-239	Crvena
<b>REN247M23</b>	15	di	258-282	Crvena

**-Prilog 2-**

*Uzorci vuka Srbije koji su analizirani primjenom mikrosatelita zajedno sa uzorcima vuka Bosne i Hercegovine u cilju detekcije strukturiranosti u dinarsko - balkanskom kontekstu, a nisu prethodno analizirani:*

<b>ID uzorka</b>	<b>Pol</b>	<b>Lokalitet</b>	<b>Država</b>	<b>Godina uzorkovanja</b>
20	♀	Žagubica	Srbija	2010
21	♀	Sjenica	Srbija	2011
38	♂	Sjenica	Srbija	2009
52	♀	Sjenica	Srbija	2009
79	♀	Sjenica	Srbija	2010
80	♀	Sjenica	Srbija	2010
96	♂	Zlatibor	Srbija	2010
151	♂	Kremna	Srbija	2012
153	♂	Zlatibor	Srbija	2012
154	♂	Zlatibor	Srbija	2012
155	♀	Sjenica	Srbija	2012
157	♂	Štitari	Srbija	2012
158	♂	Aleksandrovac Župski	Srbija	2012
161	♀	Sjenica	Srbija	2012
162	♂	Sjenica	Srbija	2012
164	♀	Sjenica	Srbija	2012
165	♀	Sjenica	Srbija	2012
166	♂	Tutin	Srbija	2012
167	♂	Sjenica	Srbija	2012
168	♂	Sjenica	Srbija	2012
171	♂	Kremna	Srbija	2012
174	♀	Sjenica	Srbija	2012

175	♂	Sjenica	Srbija	2012
179	♂	Sjenica	Srbija	2013
180	♂	Sjenica	Srbija	2013
181	♂	Sjenica	Srbija	2013
182	♀	Sjenica	Srbija	2013
184	♂	Sjenica	Srbija	2013
185	♀	Sjenica	Srbija	2013
186	♀	Sjenica	Srbija	2013
189	♀	Golija planina	Srbija	2013
191	♂	Vrnjačka Banja	Srbija	2013
192	♀	Sjenica	Srbija	2013
195	♂	Aleksandrovac Župski	Srbija	2013
196	♂	Aleksandrovac Župski	Srbija	2013
198	♂	planina Stolovi	Srbija	2013
199	♂	planina Golija	Srbija	2013
206	♂	Kraljevo	Srbija	2014
208	♂	Zlatibor	Srbija	2014
209	♂	Sjenica	Srbija	2011
210	♂	Kremna	Srbija	2013
265	♂	Sjenica	Srbija	2016
267	♂	Sjenica	Srbija	2016
271	♂	Novi Pazar	Srbija	2016
277	♂	Prhovo	Srbija	2016
281	♀	Sjenica	Srbija	2015

**-Prilog 3-**

I) Lista sekvenci kontrolnog regiona mtDNK vuka (*Canis lupus*) produkovanih u predstavljenom istraživanju i pripadnost određenom haplotipu i haplogrupi.

<b>ID uzorka</b>	<b>Broj jedinki</b>	<b>Zemlja uzorkovanja</b>	<b>Haplotip</b>	<b>Haplogrupa</b>
287	1	Bosna i Hercegovina	Clx3	1
285	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
220	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
216	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
149	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
228	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
252	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
256	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
263	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
231	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
235	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
239	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
240	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
241	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
284*	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
291*	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
292*	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
293*	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
294*	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
290*	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
242	1	Bosna i Hercegovina	Cl10	1
148	1	Bosna i Hercegovina	Cl23	1
213	1	Bosna i Hercegovina	Cl23	1
214	1	Bosna i Hercegovina	Cl23	1
215	1	Bosna i Hercegovina	Cl23	1
218	1	Bosna i Hercegovina	Cl23	1
219	1	Bosna i Hercegovina	Cl23	1



221	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
223	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
224	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
225	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
226	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
227	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
236	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
237	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
244	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
247	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
253	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
254	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
259	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
260	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
261	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
262	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
249	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI23</i>	1
217	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CIblk2</i>	2
229	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CIblk2</i>	2
230	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CIblk2</i>	2
232	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CIblk2</i>	2
234	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CIblk2</i>	2
246	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CIblk2</i>	2
248	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CIblk2</i>	2
251	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CIblk2</i>	2
238	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI6/14</i>	2
243	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI6/14</i>	2
245	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI6/14</i>	2
255	1	<i>Bosna i Hercegovina</i>	<i>CI6/14</i>	2
20	1	<i>Srbija</i>	<i>CI6/14</i>	2
38	1	<i>Srbija</i>	<i>CI6/14</i>	2
52	1	<i>Srbija</i>	<i>CI6/14</i>	2
79	1	<i>Srbija</i>	<i>CI6/14</i>	2
80	1	<i>Srbija</i>	<i>CI6/14</i>	2
151	1	<i>Srbija</i>	<i>CI6/14</i>	2



154	1	Srbija	CI6/14	2
157	1	Srbija	CI6/14	2
158	1	Srbija	CI6/14	2
161	1	Srbija	CI6/14	2
162	1	Srbija	CI6/14	2
164	1	Srbija	CI6/14	2
165	1	Srbija	CI6/14	2
166	1	Srbija	CI6/14	2
167	1	Srbija	CI6/14	2
171	1	Srbija	CI6/14	2
174	1	Srbija	CI6/14	2
175	1	Srbija	CI6/14	2
180	1	Srbija	CI6/14	2
182	1	Srbija	CI6/14	2
184	1	Srbija	CI6/14	2
185	1	Srbija	CI6/14	2
186	1	Srbija	CI6/14	2
189	1	Srbija	CI6/14	2
191	1	Srbija	CI6/14	2
195	1	Srbija	CI6/14	2
196	1	Srbija	CI6/14	2
198	1	Srbija	CI6/14	2
199	1	Srbija	CI6/14	2
206	1	Srbija	CI6/14	2
208	1	Srbija	CI6/14	2
265	1	Srbija	CI6/14	2
267	1	Srbija	CI6/14	2
271	1	Srbija	CI6/14	2
96	1	Srbija	CI10	1
168	1	Srbija	CI10	1
181	1	Srbija	CI10	1
192	1	Srbija	CI10	1
209	1	Srbija	CI10	1
210	1	Srbija	CI10	1



281	1	Srbija	CI10	1
153	1	Srbija	Clblk2	2
179	1	Srbija	CI23	1
277	1	Srbija	CI11	1
155	1	Srbija	Clblk2	2
272	1	Srbija	Clx2	2
211	1	Crna Gora	CI6/14	2
212	1	Crna Gora	CI6/14	2
257	1	Crna Gora	CI6/14	2
258	1	Crna Gora	CI6/14	2

\*Prije skraćivanja dužine sekvenci, sa 269bp na 225bp, sekvence su predstavljale jedinstvene haplotipove.

II) Tabela haplotipova i broj sekvenci kontrolnog regiona mtDNK vuka (*Canis lupus*) evropskog seta podataka preuzetih iz Banke Gena. Haplotipovi su imenovani prema haplotipovima u istraživanju od strane Pilot i sar. (2010) u smislu da redni brojevi haplotipova predstavljenog istraživanja prate redni broj haplotipova prema Pilot i sar. (2010), (npr. w1=CI1; w2=CI2, itd.), odnosno, naziv haplotipa originalnog istraživanja za jedinstvene haplotipove detektovane u predstavljenom i prethodnim istraživanjima mtDNK vuka (npr. Blk2=Clblk2, x2=Clx2, itd.).

<b>ID haplotipova preuzetih iz Banke Gena</b>	<b>Broj sekvenci haplotipova</b>	<b>Zemlje u kojima su haplotipovi detektovani</b>	<b>Br. u Banci Gena</b>	<b>Publikacija iz koje je haplotip preuzet</b>	<b>ID haplotipa u predstavljeno m istraživanju</b>	<b>Haplo- grupa</b>
lu1	50	Španija	<a href="#">AF008162</a>	Vila i sar., 1999	CI24	1
lu3	1	Grčka	<a href="#">AF338805</a>	Vila i sar., 1999	CI10	1
lu3	1	Švedska	<a href="#">AF338805</a>	Vila i sar., 1999	CI10	1
lu3	2	Rusija	<a href="#">AF338805</a>	Vila i sar., 1999	CI10	1



lu3	5	Hrvatska	<a href="#">AF338805</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI10</b>	1
lu4	27	Španija	<a href="#">AF008163</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI10</b>	1
lu4	2	Poljska	<a href="#">AF008163</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI10</b>	1
lu5	7	Francuska	<a href="#">AF008164</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI22</b>	2
lu5	21	Italija	<a href="#">AF008164</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI22</b>	2
lu6	4	Rumunija	<a href="#">AF008161</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI6/14</b>	1
lu6	2	Bugarska	<a href="#">AF008161</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI6/14</b>	1
lu7	1	Rumunija	<a href="#">AF008163</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI6/14</b>	1
lu7	3	Švedska	<a href="#">AF008163</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI6/14</b>	1
lu7	7	Rusija	<a href="#">AF008163</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI6/14</b>	1
lu12	15	Švedska	<a href="#">AF008165</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI1</b>	1
lu12	2	Finska	<a href="#">AF008165</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI1</b>	1
lu12	2	Estonija	<a href="#">AF008165</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI1</b>	1
lu12	1	Grčka	<a href="#">AF008165</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI1</b>	1
lu12	2	Rusija	<a href="#">AF008165</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI1</b>	1
lu13	2	Švedska	<a href="#">AF008164</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI5</b>	2
lu13	1	Rusija	<a href="#">AF008164</a>	Vila i sar., 1999	<b>CI5</b>	2
w1	1	Bugarska	<a href="#">AF115687</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI16</b>	1
w2	1	Bugarska	<a href="#">AF115688</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI16</b>	1
w3	5	Hrvatska	<a href="#">AF115689</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI23</b>	1
w4	1	Bugarska	<a href="#">AF115690</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI4</b>	1
w5	4	Grčka	<a href="#">AF115691</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI13</b>	1
w7	1	Finska	<a href="#">AF115692</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI1</b>	1
w8	1	Finska	<a href="#">AF115693</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI1</b>	1

w9	3	Bugarska	<a href="#">AF115694</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI10</b>	1
w10	24	Španija	<a href="#">AF115695</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI10</b>	1
w10	2	Turska	<a href="#">AF115695</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI10</b>	1
w13	13	Finska	<a href="#">AF115698</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI5</b>	2
w14	121	Italija	<a href="#">AF115699</a>	Randi i sar. 2000	<b>CI22</b>	2
w15	1	Bugarska	<a href="#">AF115700</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI27</b>	2
w19	1	Bugarska	<a href="#">AF115702</a>	Randi i sar., 2000	<b>CI19/25</b>	1
w1	22	Finska	<a href="#">AF115687</a>	Flagstad i sar., 2003	<b>CI1</b>	1
W1	2	Švicarska	<a href="#">AF338803</a>	Valiere i sar., 2003	<b>CI22</b>	2
W2	2	Švicarska	<a href="#">AF338804</a>	Valiere i sar., 2003	<b>CI6/14</b>	2
W3	1	Hrvatska	<a href="#">AF338805</a>	Valiere i sar., 2003	<b>CI23</b>	1
W4	4	Hrvatska	<a href="#">AF338806</a>	Valiere i sar., 2003	<b>CI10</b>	1
W7	2	Španija	<a href="#">AF338809</a>	Valiere i sar., 2003	<b>CI19/25</b>	1
W9	28	Poljska	<a href="#">AF338811</a>	Valiere i sar., 2003	<b>CI3/26</b>	2
w1	145	Poljska	<a href="#">FJ978005</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI1</b>	1
w1	18	Litvanija	<a href="#">FJ978005</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI1</b>	1
w1	10	Latvija	<a href="#">FJ978005</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI1</b>	1
w1	2	Ukrajina	<a href="#">FJ978005</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI1</b>	1
w1	4	Bjelorusija	<a href="#">FJ978005</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI1</b>	1
w1	20	Bugarska	<a href="#">FJ978005</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI1</b>	1
w1	1	Švicarska	<a href="#">FJ978005</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI1</b>	1
w2	31	Poljska	<a href="#">FJ978008</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI2</b>	1
w2	5	Litvanija	<a href="#">FJ978008</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI2</b>	1
w2	30	Latvija	<a href="#">FJ978008</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI2</b>	1



w2	1	Bugarska	<a href="#">FJ978008</a>	Pilot i sar., 2010	CI2	1
w2	3	Ukrajina	<a href="#">FJ978008</a>	Pilot i sar., 2010	CI2	1
w2	2	Bjelorusija	<a href="#">FJ978008</a>	Pilot i sar., 2010	CI2	1
w2	2	Rusija	<a href="#">FJ978008</a>	Pilot i sar., 2010	CI2	1
w3	14	Litvanija	<a href="#">FJ978009</a>	Pilot i sar., 2010	CI3/78	2
w3	98	Latvija	<a href="#">FJ978009</a>	Pilot i sar., 2010	CI3/78	2
w3	1	Ukrajina	<a href="#">FJ978009</a>	Pilot i sar., 2010	CI3/78	2
w3	2	Bjelorusija	<a href="#">FJ978009</a>	Pilot i sar., 2010	CI3/78	2
w3	1	Bugarska	<a href="#">FJ978009</a>	Pilot i sar., 2010	CI3/78	2
w3	1	Rusija	<a href="#">FJ978009</a>	Pilot i sar., 2010	CI3/78	2
w4	3	Poljska	<a href="#">FJ978010</a>	Pilot i sar., 2010	CI4	1
w4	2	Litvanija	<a href="#">FJ978010</a>	Pilot i sar., 2010	CI4	1
w4	3	Latvija	<a href="#">FJ978010</a>	Pilot i sar., 2010	CI4	1
w4	3	Bjelorusija	<a href="#">FJ978010</a>	Pilot i sar., 2010	CI4	1
w4	2	Finska	<a href="#">FJ978010</a>	Pilot i sar., 2010	CI4	1
w4	9	Ukrajina	<a href="#">FJ978010</a>	Pilot i sar., 2010	CI4	1
w4	7	Slovačka	<a href="#">FJ978010</a>	Pilot i sar., 2010	CI4	1
w4	5	Turska	<a href="#">FJ978010</a>	Pilot i sar., 2010	CI4	1
w5	2	Poljska	<a href="#">AY842291</a>	Pilot i sar., 2010	CI5	2
w5	2	Litvanija	<a href="#">AY842291</a>	Pilot i sar., 2010	CI5	2
w5	3	Latvija	<a href="#">AY842291</a>	Pilot i sar., 2010	CI5	2
w5	1	Ukrajina	<a href="#">AY842291</a>	Pilot i sar., 2010	CI5	2
w5	2	Bjelorusija	<a href="#">AY842291</a>	Pilot i sar., 2010	CI5	2
w5	1	Norveška	<a href="#">AY842291</a>	Pilot i sar., 2010	CI5	2

w6	1	Litvanija	<a href="#">FJ978014</a>	Pilot i sar., 2010	CI6/14	2
w6	1	Rusija	<a href="#">FJ978014</a>	Pilot i sar., 2010	CI6/14	2
w6	1	Ukrajina	<a href="#">FJ978014</a>	Pilot i sar., 2010	CI6/14	2
w6	1	Bjelorusija	<a href="#">FJ978014</a>	Pilot i sar., 2010	CI6/14	2
w6	35	Bugarska	<a href="#">AF115701</a>	Pilot i sar., 2010	CI6/14	2
w6	2	Grčka	<a href="#">FJ978014</a>	Pilot i sar., 2010	CI6/14	2
w6	1	Turska	<a href="#">FJ978014</a>	Pilot i sar., 2010	CI6/14	2
w7	18	Poljska	<a href="#">AY842292</a>	Pilot i sar., 2010	CI7	1
w7	40	Litvanija	<a href="#">AY842292</a>	Pilot i sar., 2010	CI7	1
w7	1	Rusija	<a href="#">AY842292</a>	Pilot i sar., 2010	CI7	1
w7	7	Latvija	<a href="#">AY842292</a>	Pilot i sar., 2010	CI7	1
w7	1	Bjelorusija	<a href="#">AY842292</a>	Pilot i sar., 2010	CI7	1
w7	11	Ukrajina	<a href="#">AY842292</a>	Pilot i sar., 2010	CI7	1
w8	2	Švedska	<a href="#">AY842293</a>	Pilot i sar., 2010	CI8	1
w8	1	Rusija	<a href="#">AY842293</a>	Pilot i sar., 2010	CI8	1
w8	3	Finska	<a href="#">AY842293</a>	Pilot i sar., 2010	CI8	1
w9	1	Rusija	<a href="#">FJ978018</a>	Pilot i sar., 2010	CI9	2
w9	2	Latvija	<a href="#">FJ978018</a>	Pilot i sar., 2010	CI9	2
w9	1	Švedska	<a href="#">FJ978018</a>	Pilot i sar., 2010	CI9	2
w10	1	Poljska	<a href="#">AY842294</a>	Pilot i sar., 2010	CI10	1
w10	10	Bjelorusija	<a href="#">AY842294</a>	Pilot i sar., 2010	CI10	1
w10	1	Rusija	<a href="#">AY842294</a>	Pilot i sar., 2010	CI10	1
w10	1	Švedska	<a href="#">AY842294</a>	Pilot i sar., 2010	CI10	1
w10	1	Portugalija	<a href="#">AY842294</a>	Pilot i sar., 2010	CI10	1



w11	1	Ukrajina	<a href="#">AY842295</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI11</b>	2
w11	3	Slovačka	<a href="#">AY842295</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI11</b>	2
w11	1	Bjelorusija	<a href="#">AY842295</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI11</b>	2
w11	1	Bugarska	<a href="#">AY842295</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI11</b>	2
w11	1	Rusija	<a href="#">AY842295</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI11</b>	2
w12	1	Bjelorusija	<a href="#">DQ421802</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI12</b>	1
w12	3	Rusija	<a href="#">DQ421802</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI12</b>	1
w13	6	Bugarska	<a href="#">FJ978024</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI13/26</b>	1
w14	6	Poljska	<a href="#">FJ978025</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI16/14</b>	2
w14	3	Slovačka	<a href="#">FJ978025</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI/614</b>	2
w14	2	Bugarska	<a href="#">FJ978025</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI16/14</b>	2
w14	6	Grčka	<a href="#">FJ978025</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI16/14</b>	2
w14	4	Rumunija	<a href="#">FJ978025</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI16/14</b>	2
w15	8	Slovačka	<a href="#">DQ421803</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI16/14</b>	2
w15	8	Ukrajina	<a href="#">DQ421803</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI15</b>	2
w16	1	Bugarska	<a href="#">AF115688</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI16</b>	1
w16	1	Turska	<a href="#">AF115688</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI16</b>	1
w16	1	Bugarska	<a href="#">AF115688</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI16</b>	1
w17	2	Grčka	<a href="#">DQ421804</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI17</b>	2
w17	3	Bugarska	<a href="#">DQ421804</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI17</b>	2
w17	4	Turska	<a href="#">DQ421804</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI17</b>	2
w18	1	Bugarska	<a href="#">DQ421805</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI18</b>	2
w18	1	Ukrajina	<a href="#">DQ421805</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI18</b>	2



w19	1	Poljska	<a href="#">FJ978032</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI19/25</b>	1
w20	2	Turska	<a href="#">DQ421806</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI20</b>	2
w20	1	Bugarska	<a href="#">DQ421806</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI20</b>	2
w21	3	Poljska	<a href="#">DQ421807</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI21</b>	1
w21	1	Rusija	<a href="#">DQ421807</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI21</b>	1
w26	1	Grčka	<a href="#">AF098115</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI13/26</b>	1
w78	1	Portugalija	<a href="#">KJ195898</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI3/78</b>	2
w78	1	Španija	<a href="#">KJ195898</a>	Pilot i sar., 2010	<b>CI3/78</b>	2
WCRO1	34	Hrvatska	<a href="#">GU059550</a>	Gomerčić i sar., 2010	<b>CI23</b>	1
WCRO2	25	Hrvatska	<a href="#">GU059551</a>	Gomerčić i sar., 2010	<b>CI10</b>	1
WCRO3	7	Hrvatska	<a href="#">GU059552</a>	Gomerčić i sar., 2010	<b>CI6/14</b>	2
WCRO6	25	Hrvatska	<a href="#">GU059555</a>	Gomerčić i sar., 2010	<b>CI1k2</b>	2
W1-LT	10	Litvanija	<a href="#">JX508634</a>	Baltrunaite i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
W2-LT	1	Litvanija	<a href="#">JX508635</a>	Baltrunaite i sar., 2013	<b>CI2</b>	1
W3-LT	3	Litvanija	<a href="#">JX508633</a>	Baltrunaite i sar., 2013	<b>CI3/78</b>	2
W5-LT	1	Litvanija	<a href="#">JX508631</a>	Baltrunaite i sar., 2013	<b>CI5</b>	2
W10-LT	1	Litvanija	<a href="#">JX508632</a>	Baltrunaite i sar., 2013	<b>CI10</b>	1
w1	1	Estonija	<a href="#">JN182019</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w2	1	Estonija	<a href="#">JN182020</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w3	1	Estonija	<a href="#">JN182021</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w4	1	Latvija	<a href="#">JN182058</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w5	1	Latvija	<a href="#">JN182060</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w8	1	Latvija	<a href="#">JN182063</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI2</b>	1
w10	1	Latvija	<a href="#">JN182065</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI2</b>	1



w10	1	Estonija	<a href="#">JN182028</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w12	1	Estonija	<a href="#">JN182030</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w13	1	Latvija	<a href="#">N182068</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI2</b>	1
w14	1	Estonija	<a href="#">JN182032</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w16	1	Estonija	<a href="#">JN182034</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w19	1	Estonija	<a href="#">JN182037</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w19	1	Latvija	<a href="#">JN182074</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w27	1	Estonija	<a href="#">JN182045</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w28	1	Estonija	<a href="#">JN182046</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w28	1	Latvija	<a href="#">JN182083</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI2</b>	1
w31	1	Estonija	<a href="#">JN182049</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w32	1	Latvija	<a href="#">JN182087</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
w36	1	Estonija	<a href="#">JN182054</a>	Hindrikson i sar., 2013	<b>CI1</b>	1
OW40	11	Finska	<a href="#">KF723521</a>	Jansson i sar., 2014	<b>CI1</b>	1
OW63	15	Finska	<a href="#">KF723522</a>	Jansson i sar., 2014	<b>CI5</b>	2
OW104	11	Finska	<a href="#">KF723520</a>	Jansson i sar., 2014	<b>CI1</b>	1
BLK1	1	Bosna i Hercegovina	<a href="#">KJ630307</a>	Djan i sar., 2014	<b>CI6/14</b>	2
BLK1	10	Makedonija	<a href="#">KJ630307</a>	Djan i sar., 2014	<b>CI6/14</b>	2
BLK1	30	Srbija	<a href="#">KJ630307</a>	Djan i sar., 2014	<b>CI6/14</b>	2
BLK2	3	Bosna i Hercegovina	<a href="#">KJ630308</a>	Djan i sar., 2014	<b>CI6/14</b>	2
BLK3	2	Makedonija	<a href="#">KJ630309</a>	Djan i sar., 2014	<b>CI6</b>	1
BLK3	9	Srbija	<a href="#">KJ630309</a>	Djan i sar., 2014	<b>CI6</b>	1
BLK4	10	Srbija	<a href="#">KJ630310</a>	Djan i sar., 2014	<b>CI13/78</b>	1
BLK4	3	Makedonija	<a href="#">KJ630310</a>	Djan i sar., 2014	<b>CI13/78</b>	1



BLK5	2	Srbija	<a href="#">FJ978019</a>	Djan i sar., 2014	CI10	1
BLK5	1	Makedonija	<a href="#">FJ978019</a>	Djan i sar., 2014	CI10	1
BLK5	6	Bosna i Hercegovina	<a href="#">FJ978019</a>	Djan i sar., 2014	CI10	1
BLK6	2	Srbija	<a href="#">KJ630312</a>	Djan i sar., 2014	CI23	1
BLK6	2	Makedonija	<a href="#">KJ630312</a>	Djan i sar., 2014	CI23	1
BLK6	6	Bosna i Hercegovina	<a href="#">KJ630312</a>	Djan i sar., 2014	CI23	1
Portuguese Wolf	1	Portugal	<a href="#">KU644668</a>	Kolbmuller i sar., 2016	CI24	1
IT9	1	Italija	<a href="#">KU696389</a>	Kolbmuller i sar., 2016	CI22	2
Bel_13	1	Italija	<a href="#">KU696390</a>	Kolbmuller i sar., 2016	CI22	2
Croatia7	1	Hrvatska	<a href="#">KU696398</a>	Kolbmuller i sar., 2016	CI10	1
SpanishWolf 2	1	Španija	<a href="#">KU644670</a>	Kolbmuller i sar., 2016	CI3/78	2
Bul729	1	Bugarska	<a href="#">KU696388</a>	Kolbmuller i sar., 2016	CI6/14	2
Clu26	3	Švedska	<a href="#">KX898321</a>	Ersmark i sar., 2016	CI1	1
Clu32	1	Švedska	<a href="#">KX898323</a>	Ersmark i sar., 2016	CI4	1
Clu 73	4	Švedska	<a href="#">KY124130</a>	Ersmark i sar., 2016	CI5	2
W1	1	Bugarska	<a href="#">KY549994</a>	Montana i sar., 2017	CI16	1
W2	1	Bugarska	<a href="#">KY549995</a>	Montana i sar., 2017	CI16	1
W3	16	Slovenija	<a href="#">KY549996</a>	Montana i sar., 2017	CI23	1
W4	4	Grčka	<a href="#">KY549997</a>	Montana i sar., 2017	CI4	1
W5	3	Grčka	<a href="#">KY549998</a>	Montana i sar., 2017	CI13/26	1
W5	5	Bugarska	<a href="#">KY549998</a>	Montana i sar., 2017	CI13/26	1
W5	5	Poljska	<a href="#">KY549998</a>	Montana i sar., 2017	CI13/26	1
W5	2	Estonija	<a href="#">KY549998</a>	Montana i sar., 2017	CI13/26	1
W5	1	Latvija	<a href="#">KY549998</a>	Montana i sar., 2017	CI13/26	1

W8	9	Latvija	<a href="#">KY550000</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI1</b>	1
W8	4	Finska	<a href="#">KY550000</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI1</b>	1
W9	5	Bugarska	<a href="#">KY550001</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI10</b>	1
W9	2	Poljska	<a href="#">KY550001</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI10</b>	1
W13	5	Finska	<a href="#">KY550002</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI5</b>	2
W14	34	Italija	<a href="#">KY550003</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI22</b>	2
W15	2	Grčka	<a href="#">KY550004</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI27</b>	2
W16	4	Bugarska	<a href="#">KY550005</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI6/14</b>	2
W16	2	Grčka	<a href="#">KY550005</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI6/14</b>	2
W17	4	Slovenija	<a href="#">KY550006</a>	Montana i sar. 2017	<b>CI1k2</b>	2
W18	5	Italija	<a href="#">KY550007</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI6/14</b>	2
W18	1	Poljska	<a href="#">KY550007</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI6/14</b>	2
W19	7	Španija	<a href="#">KY550008</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI19/25</b>	1
W20	4	Španija	<a href="#">KY550009</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI24</b>	1
W21	8	Portugal	<a href="#">KY550010</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI24</b>	1
W23	2	Estonija	<a href="#">KY550012</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI2</b>	1
W23	1	Latvija	<a href="#">KY550012</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI2</b>	1
W24	1	Španija	<a href="#">KY550013</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI3/78</b>	2
W24	1	Portugalija	<a href="#">KY550013</a>	Montana i sar., 2017	<b>CI3/78</b>	2
wH-1C	4	Portugal	<a href="#">JX845625</a>	Pires i sar., 2017	<b>CI24</b>	1
wH-2	2	Portugal	<a href="#">JX845622</a>	Pires i sar., 2017	<b>CI3/78</b>	2
wH-3	35	Portugal	<a href="#">JX845623</a>	Pires i sar., 2017	<b>CI19/25</b>	1
wH-3	2	Španija	<a href="#">JX845623</a>	Pires i sar., 2017	<b>CI19/25</b>	1
wH-4	9	Španija	<a href="#">JX845621</a>	Pires i sar., 2017	<b>CIwH-4</b>	1



**-Prilog 4-**

Vrijednosti osnovnih genetičkih parametara populacije vuka (*Canis lupus*) Bosne i Hercegovine detektovane analizom genetičke varijabilnosti 18 mikrosatelitskih lokusa.

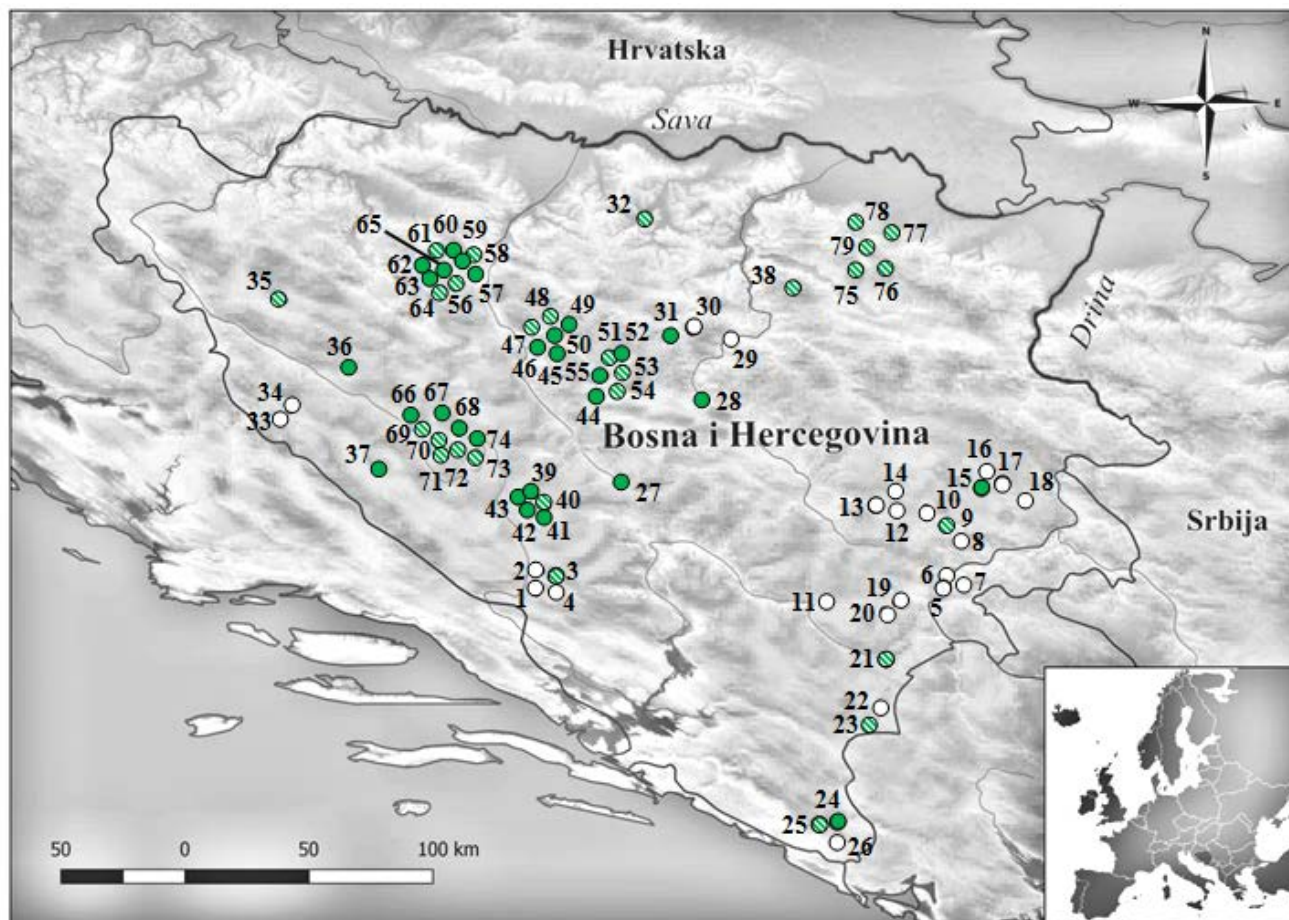
Lokus	$N_A$	$H_o$	$H_e$	HWE	$F_{IS}$
AHTk211	8	0,5769	0,7464	**	0,2282**
CXX279	5	0,6962	0,7626	-	0,0876
REN169018	6	0,7089	0,6884	-	-0,0299
INU055	4	0,7215	0,7484	*	0,0361
REN54P11	6	0,6962	0,7628	**	0,0878
INRA21	6	0,6582	0,8259	**	0,2041**
AHT137	5	0,8734	0,8729	-	-0,0006
REN169DO1	8	0,8228	0,8709	-	0,0556
AHTh260	7	0,5696	0,8278	**	0,3133**
AHTk253	6	0,6835	0,7617	*	0,1033*
INU005	9	0,8354	0,8572	**	0,0255
INU030	5	0,7848	0,7217	-	-0,0881
FH2848	6	0,6709	0,7177	-	0,0656
AHT121	9	0,6835	0,8004	-	0,1467
FH2054	9	0,6923	0,8538	**	0,1902**
REN162CO4	5	0,5189	0,5620	**	0,0771
AHTh171	6	0,6582	0,7875	**	0,1651**
REN247M23	7	0,8354	0,8501	-	0,0174
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>6,5</b>	<b>0,7048</b>	<b>0,7788</b>		<b>0,0401</b>

$N_A$  - broj alela po lokusu,  $H_o$  - uočena heterozigotnost,  $H_e$  - očekivana heterozigotnost, HWE - Hardy - Weinberg ekvilibrijum,  $F_{IS}$  - koeficijent inbridinga; - nije statistički značajno, \* $p < 0.05$  i \*\* $p < 0.01$  statistički značajno nakon Boniferonijeve korekcije  $p$  vrijednosti.

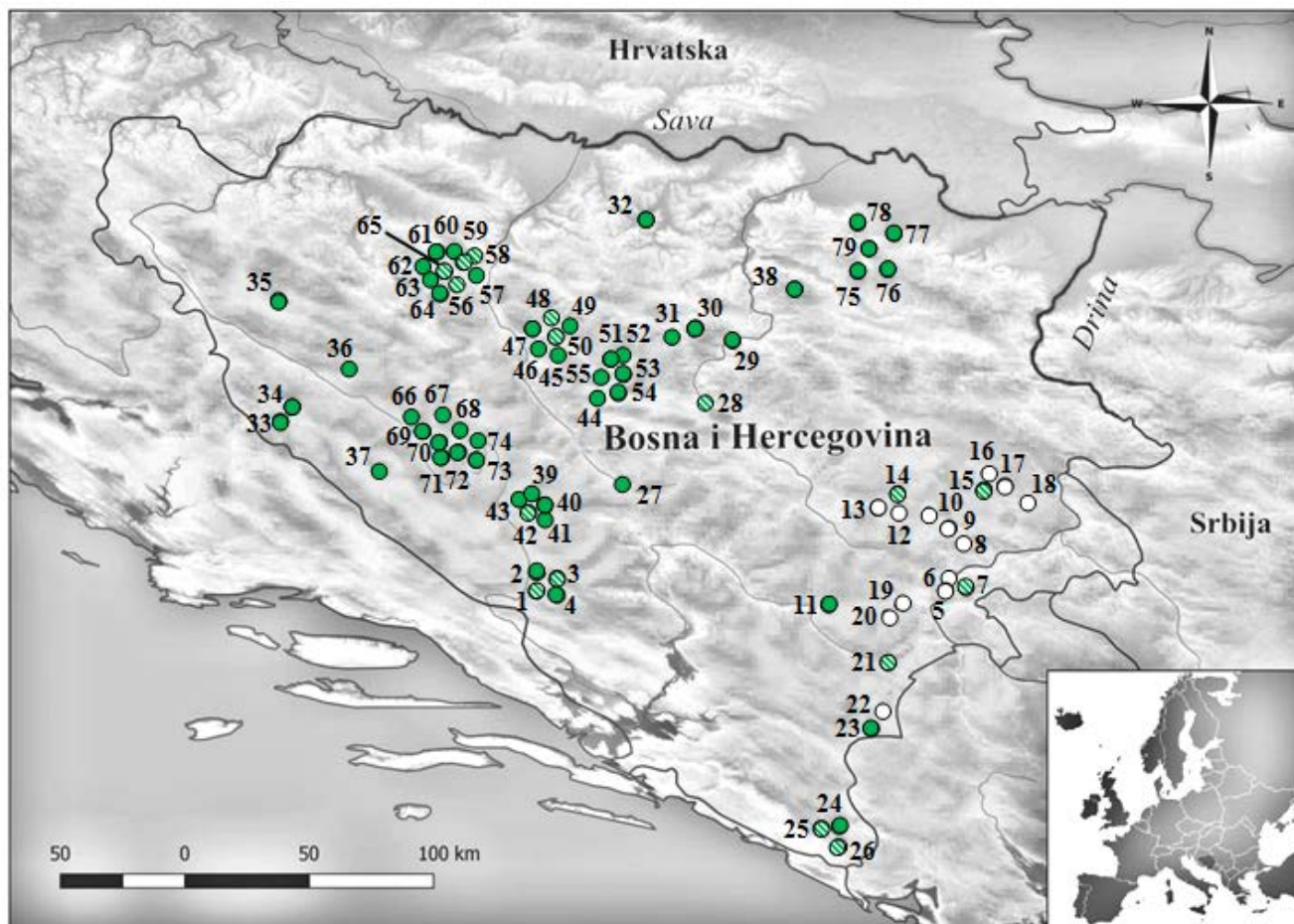
**-Prilog 5-**

*Distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u dva pretpostavljena genetička klastera nakon sprovedenih analiza u sljedećim programskim paketima:*

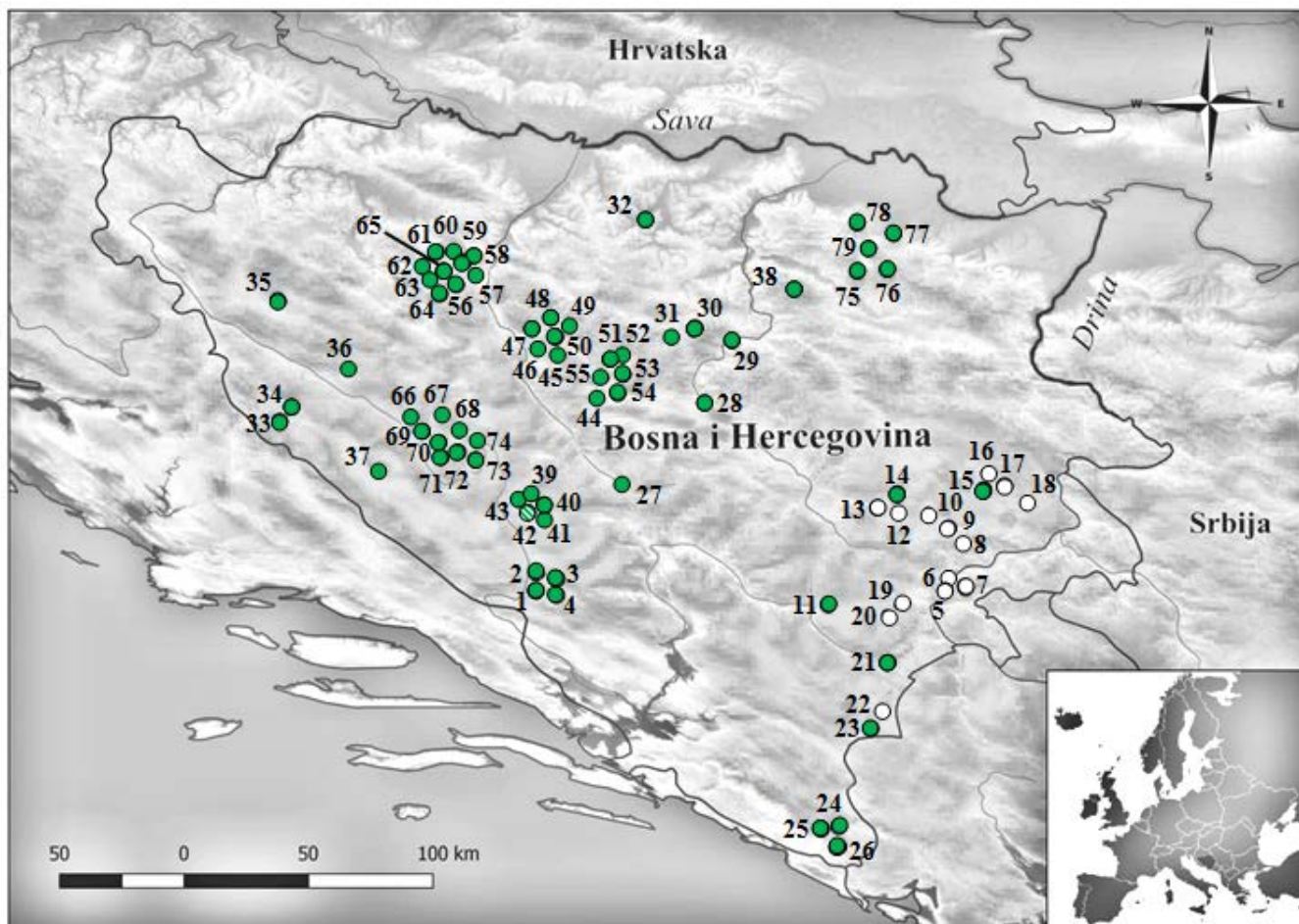
**a) STRUCTURE**



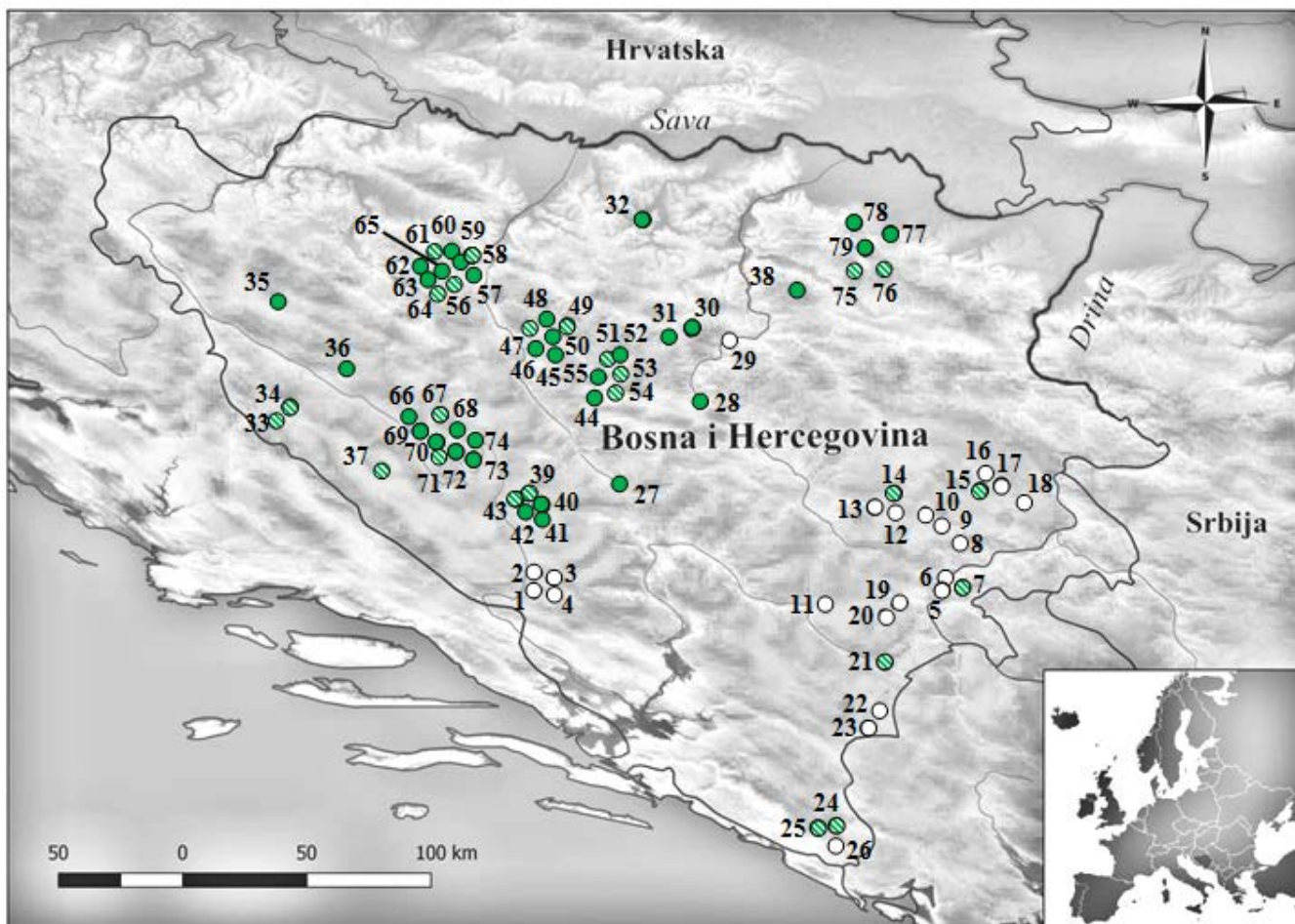
b) TESS (BYM i CAR modeli)



c) TESS (No Admixture model)



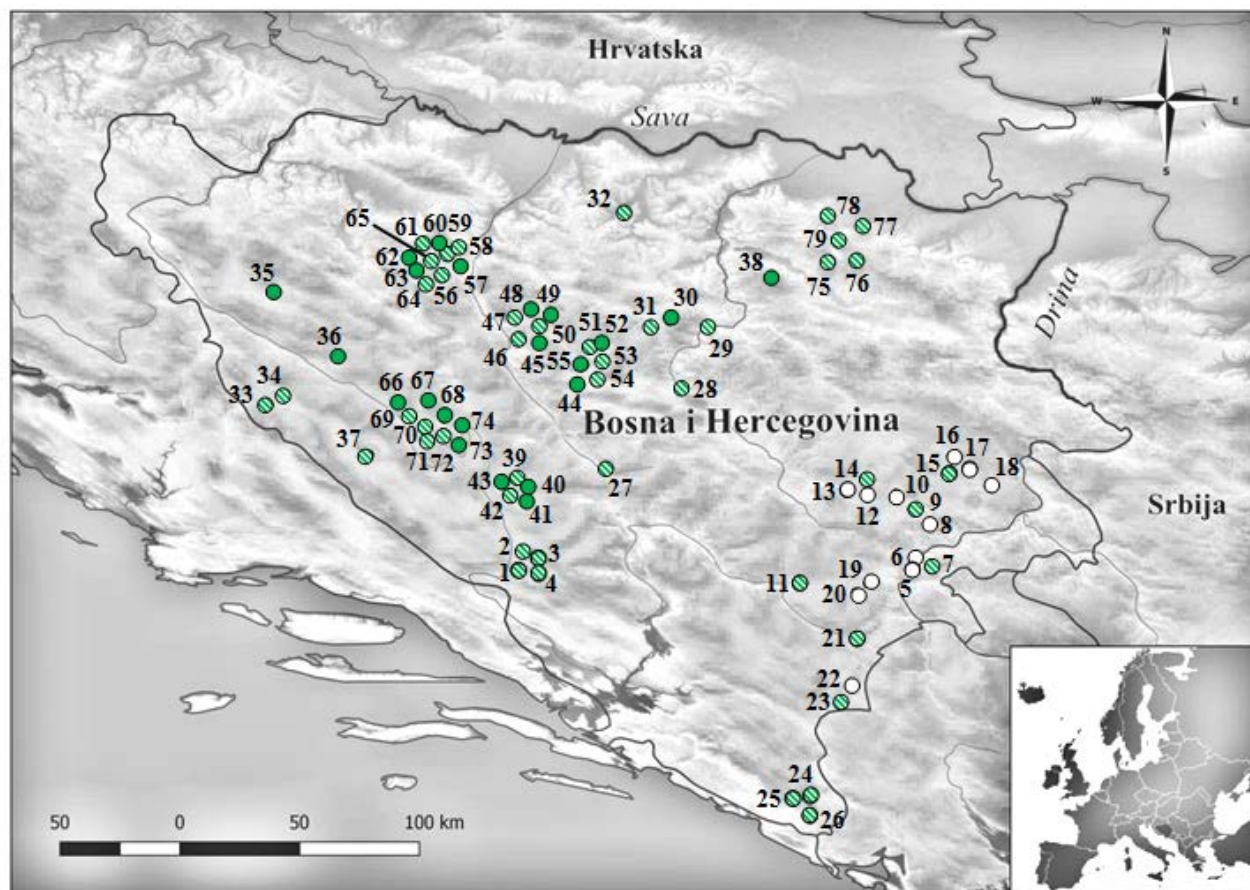
d) DAPC





Distribucija jedinki populacije vuka Bosne i Hercegovine u konsenzus klaster, definisane nakon sprovedenih, prethodnih, analiza.

e) Konsenzus klasteri



Bijeli kružići predstavljaju jedinke koje su nakon analiza svrstane u jedan genetički klaster (bijeli dio bar plota u rezultatima), a na mapama je evidentno da su te jedinke, uglavnom, iz istočnog i jugoistočnog dijela Bosne i Hercegovine. Zeleni kružići predstavljaju jedinke koje su nakon analiza svrstane u drugi genetički klaster (zeleni dio bar plota u rezultatima), i na mapama je evidentno da nema jasnog geografskog obrasca distribucije tih jedinki jer su distribuirane u svim ostalim dijelovima Bosne i Hercegovine i



*preklapaju se sa jedinkama u admiksiji (u bar plotovima, u rezultatima, imaju udio oba genetička klastera, odnosno, obje boje) koje su predstavljene šrafiranim kružićima.*

# 10. LITERATURA



- Aggarwal, R. K., Kivisild, T., Ramadevi, J., & Singh, L. (2007). Mitochondrial DNA coding region sequences support the phylogenetic distinction of two Indian wolf species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(2), 163-172.
- Allendorf, F. W., & Luikart, G. (2008). Conserving global biodiversity? Conservation and the genetics of populations. *Conservation Genetics*, 9(2), 437-438.
- Aoki, T., & Wada, M. (1951). Functional activity of the sweat glands in the hairy skin of the dog. *Science*, 114(2953), 123-124.
- Aschley, M. V., Caballero, I.C., Chaovalitwongse, W., Dasguta, B., Govindan, P., Sheikh, S.L., Berger-Wolf, T.Y. (2009). KINALYZER, a computer program for reconstructing sibling groups. *Molecular Ecology Resources*, 9(4), 1127-31.
- Aspi, J., Roininen, E., Kiiskilä, J., Ruokonen, M., Kojola, I., Bljudnik, L., Danilov, P., Heikkinen, S., & Pulliainen, E. (2009). Genetic structure of the northwestern Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland. *Conservation Genetics*, 10(4), 815-826.
- Attardi, G. (1985). Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. *International Review of Cytology*, 93, 93-145.
- Avise, J.C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species. *Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts*.
- Avise, J. C., GIBLIN-DAVIDSON, C., LAERM, J., PATTON, J. C., & LANSMAN, R. A. (1979). Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(12), 6694-6698.
- Avise, J. C., Nelson, W. S., & Sibley, C. G. (1994). DNA sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New World vultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11), 5173-5177.

- Avise, J. C., & Vrijenhoek, R. C. (1987). Mode of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of the genus *Poeciliopsis*. *Molecular Biology and Evolution*, 4(5), 514-525.
- Bakan, J., Vukan, L., Popović, Z., & Paule, L. (2014). Genetic differentiation of grey wolf population (*Canis lupus* L.) from Balkan and Carpathians. *Balkan Journal of Wildlife Research*, 1(1), 87-93.
- Baltrūnaitė, L., Balčiauskas, L., & Åkesson, M. (2013). The genetic structure of the Lithuanian wolf population. *Central European Journal of Biology*, 8(5), 440-447.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
- Barnosky, A. D., Koch, P. L., Feranec, R. S., Wing, S. L., & Shabel, A. B. (2004). Assessing the causes of Late Pleistocene extinctions on the continents. *Science*, 306(5693), 70-75.
- Barrientos, L. M. (1993). Evolution of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in highly humanized areas in Castilla y Leon (Spain). *Simposio Internacional sobre el Lobo*, 19-23.
- Bivand, R. (2007). Using the R–Grass interface. *OSGeo Journal*, 1, 36-38.
- Boitani, L. (1995). Ecological and cultural diversities in the evolution of wolf-human relationship. In: *Ecology and Conservation of Wolves in a Changing World*, 3-12. Carbyn, L. N., Fritts, S. H., & Seip, D. R. (Eds.). Edmonton: Canadian Circumpolar Institute.
- Boitani, L. (2000). Action plan for the conservation of wolves in Europe (*Canis lupus*). *Council of Europe, Strasbourg No.* 18-113.
- Bolkay, I. J. (1925). Preliminary notes on a new mole (*Talpa Hercegovinensis* N. sp.) from central Herzegovina and diagnoses of some new mammals from Bosnia and Herzegovina. *Zemaljski Musej u Bosni i Hercegovini. Novitates Musei Sarajevoensis*, No. 1.

- Bonin, A., Bellemain, E., Bronken Eidesen, P., Pompanon, F., Brochmann, C., & Taberlet, P. (2004). How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13(11), 3261-3273.
- Breitenmoser, U. (1998). Large predators in the Alps: the fall and rise of man's competitors. *Biological Conservation*, 83(3), 279-289.
- Brown, D. S., & Johnston, R. E. (1983). Individual discrimination on the basis of urine in dogs and wolves. *Chemical signals in vertebrates*, 3, 343-346.
- Brown, G. G., & Simpson, M. V. (1982). Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(10), 3246-3250.
- Bruford, M. W., Bradley, D. G., & Luikart, G. (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics*, 4(11), 900-910.
- Busch, J. D., Waser, P. M., & DeWoody, J. A. (2007). Recent demographic bottlenecks are not accompanied by a genetic signature in banner-tailed kangaroo rats (*Dipodomys spectabilis*). *Molecular Ecology*, 16(12), 2450-2462.
- Butzeck, S., Stubbe, M., & Piechocki, R. (1988). Beiträge zur Geschichte der Säugetierfauna der DDR Teil 3: Der Wolf *Canis lupus* L., 1758. *Hercynia-Ökologie und Umwelt in Mitteleuropa*, 25(3), 278-317.
- Buzan, E. V., Krystufek, B., & Bryja, J. (2010). Microsatellite markers confirm extensive population fragmentation of the endangered Balkan Palaeoendemic Martino's vole (*Dinaromys bogdanovi*). *Conservation Genetics*, 11(5), 1783-1794.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C., & Sutherland, G. R. (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52(5), 922-927.
- Cantatore, P., & Saccone, C. (1987). Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. *International Review of Cytology*, 108, 149-208.



- Carbyn, L. N., & Trottier, T. (1987). Responses of bison on their calving grounds to predation by wolves in Wood Buffalo National Park. *Canadian Journal of Zoology*, 65(8), 2072-2078.
- Carmichael, L. E., Krizan, J., Nagy, J. A., Fuglei, E., Dumond, M., Johnson, D., Veitch, A., Berteaux, D., & Strobeck, C. (2007). Historical and ecological determinants of genetic structure in arctic canids. *Molecular Ecology*, 16(16), 3466-3483.
- Carmichael, L. E., Nagy, J. A., Larter, N. C., & Strobeck, C. (2001). Prey specialization may influence patterns of gene flow in wolves of the Canadian Northwest. *Molecular Ecology*, 10(12), 2787-2798.
- Castroviejo, J. (1975). Sobre la alimentación de los cánidos ibéricos. In: *XII Congress IUGB, Lisboa, 1975*. Pp. 39-46.
- Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J.D., von Arx, M., Huber, D., Andren, H., Lopez-Bao, J.V., Adamec, M., Alvares, F., Anders, O., Balciuskas, L., Balys, V., Bedo, P., Bego, F., Blanco, J.C., Breitenmoser, U., Broseth, H., Bufka, L., Bunikyte, R., Ciucci, P., Dutsov, A., Engleder, T., Fuxjager, C., Groff, C., Holmala, K., Hoxha, B., Iliopoulos, Y., Ionescu, O., Jeremic, J., Jerina, K., Kluth, G., Knauer, F., Kojola, I., Kos, I., Krofel, M., Kubala, J., Kunovac, S., Kusak, J., Kutal, M., Liberg, O., Majić, A., Mannil, P., Manz, R., Marboutin, E., Marucco, F., Melovski, D., Mersini, K., Mertzanis, Y., Myslajek, R.W., Nowak, S., Odden, J., Ozolins, J., Palomero, G., Paunović, M., Persson, J., Potočnik, H., Quenette, P.Y., Rauer, G., Reinhardt, I., Rigg, R., Ryser, A., Salvatori, V., Skrbinšek, T., Stojanov, A., Swenson, J.E., Szemethy, L., Trajce, A., Tsingarska-Sedefcheva, E., Vana, M., Veeroja, R., Wabakken, P., Wolfl, M., Wolfl, S., Zimmermann, F., Zlatanova, D., Boitani, L. (2014). Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science*, 346(6126), 1517-1519.
- Chen, C., Durand, E., Forbes, F., & François, O. (2007). Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Resources*, 7(5), 747-756.
- Cherin, M., Bertè, D. F., Sardella, R., & Rook, L. (2013). *Canis etruscus* (Canidae, Mammalia) and its role in the faunal assemblage from Pantalla (Perugia, central Italy): comparison



- with the Late Villafranchian large carnivore guild of Italy. *Bollettino della Società Paleontologica Italiana*, 52(1), 12.
- Ciucci, P., Boitani, L., Pelliccioni, E. R., Rocco, M., & Guy, I. (1996). A comparison of scat-analysis methods to assess the diet of the wolf *Canis lupus*. *Wildlife Biology*, 2(1), 37-48.
- Ciucci, P., Reggioni, W., Maiorano, L. & Boitani, L. (2009). Long-distance dispersal of a rescued wolf from the northern Apennines to the western Alps. *Journal of Wildlife Management* 73(8), 1300-1306.
- Cornuet, J. M., & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), 2001-2014.
- Coscia, E. M., Phillips, D. P., & Fentress, J. C. (1991). Spectral analysis of neonatal wolf *Canis lupus* vocalizations. *Bioacoustics*, 3(4), 275-293.
- Cuesta, L., Barcena, F., Palacios, F., & Reig, S. (1991). The trophic ecology of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907). A new analysis of stomach's data. *Mammalia*, 55(2), 239-254.
- Czarnomska, S.D., Jędrzejewska, B., Borowik, T., Niedziałkowska, M., Stronen, A.V., Nowak, S., Mysłajek, R.W., Okarma, H., Konopiński, M., Pilot, M., Śmietana, W., Caniglia, R., Fabbri, E., Randi, E., Pertoldi, C., Jędrzejewski, W. (2013). Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics* 14(3), 573-588.
- Djan, M., Maletić, V., Trbojević, I., Popović, D., Veličković, N., Burazerović, J., & Ćirović, D. (2014). Genetic diversity and structuring of the grey wolf population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*, 79(4), 277-282.
- Djan, M., Šnjegota, D., Veličković, N., Stefanović, M., Vidaković, D. O., & Ćirović, D. (2016). Genetic variability and population structure of grey wolf (*Canis lupus*) in Serbia. *Russian Journal of Genetics*, 52(8), 821-827.
- Dawid, I. B., & Blackler, A. W. (1972). Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial





- DNA in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 29(2), 152-161.
- de Groot, G.A., Nowak, C., Skrbinšek, T., Andersen, L.W., Aspi, J., Fumagalli, L., Godinho, R., Harms, V., Jansman, HAH., Liberg, O., Marucco, F., Mysłajek, R.W., Nowak, S., Pilot, M., Randi, E., Reinhardt, I., Śmietana, W., Szewczyk, M., Taberlet, P., Vilà, C., & Muñoz-Fuentes, V. (2016). Decades of population genetic research reveal the need for harmonization of molecular markers: the grey wolf *Canis lupus* as a case study. *Mammalian Review* 46(1), 44-59.
- Delgiudice, G. D., Seal, U. S., & Mech, L. D. (1987). Effects of feeding and fasting on wolf blood and urine characteristics. *The Journal of Wildlife Management*, 51(1), 1-10.
- Delibes, M. (1990). Status and conservation needs of the wolf (*Canis lupus*) in the Council of Europe member states. (1990). *Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Council of Europe, Strasbourg. No 47*, 1-46
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size ( $N_e$ ) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 209-214.
- Doty, R.L. (1986). Odor-guided behavior in mammals. *Experientia* 42(3), 257-271.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 214.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969-1973.
- Druzhkova, A.S., Thalmann, O., Trifonov, V.A., Leonard, J.A., Vorobieva, N.V., Ovodov, N.D., Graphodatsky, A.S., & Wayne, R.K. (2013). Ancient DNA analysis affirms the canid from Altai as a primitive dog. *PLoS One* 8(3), e57754.
- Durand, E., Jay, F., Gaggiotti, O. E., & François, O. (2009). Spatial inference of admixture proportions and secondary contact zones. *Molecular Biology and Evolution*, 26(9), 1963-1973.



- Eisenberg, J.F., & Kleiman, D.G. (1972). Olfactory communication in mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 3(1), 1-32.
- Ellegren, H. (1991). DNA typing of museum birds. *Nature*, 354, 113.
- Ellegren, H. (1999). Inbreeding and relatedness in Scandinavian grey wolves *Canis lupus*. *Hereditas*, 130(3), 239-244.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6), 435-445.
- Ellegren, H., Savolainen, P., & Rosén, B. (1996). The genetical history of an isolated population of the endangered grey wolf *Canis lupus*: a study of nuclear and mitochondrial polymorphisms. *Biological Sciences*, 351(1348), 1661-1669.
- England, P. R., Cornuet, J. M., Berthier, P., Tallmon, D. A., & Luikart, G. (2006). Estimating effective population size from linkage disequilibrium: severe bias in small samples. *Conservation Genetics*, 7(2), 303.
- Ersmark, E., Klütsch, C.F.C., Chan, Y.L., Sinding, M-H.S., Fain, S.R., Illarionova, N.A., Oskarsson, M., Uhlén, M., Zhang, Y-p., Dalén, L., & Savolainen, P. (2016). From the past to the present: wolf phylogeography and demographic history based on the mitochondrial control region. *Frontiers in Ecology and Evolution* 4, 134.
- Estoup, A., Tailliez, C., Cornuet, J. M., & Solignac, M. (1995). Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution*, 12(6), 1074-1084.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred



- from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Fabbri, E., Caniglia, R., Kusak, J., Galov, A., Gomerčić, T., Arbanasić, H., Huber, Đ., & 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(2), 138-148.
- Fabbri, E., Caniglia, R., Mucci, N., Thomsen, H. P., Krag, K., Pertoldi, C., Loescheke, V., & Randi, E. (2012). Comparison of single nucleotide polymorphisms and microsatellites in non-invasive genetic monitoring of a wolf population. *Archives of Biological Sciences, Belgrade* 64(1), 321-335.
- Fabbri, E., Miquel, C., Lucchini, V., Santini, A., Caniglia, R., Duchamp, C., Weber, J.M., Lequette, B., Marucco, F., Boitani, L., Fumagalli, L., Taberlet, P., & Randi, E. (2007). From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology*, 16(8), 1661-1671.
- Figueirido, B., Martín-Serra, A., Tseng, Z. J., & Janis, C. M. (2015). Habitat changes and changing predatory habits in North American fossil canids. *Nature Communications*, 6, 7976.
- Flagstad, Ø., & Røed, K. H. (2003). Refugial origins of reindeer (*Rangifer tarandus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, 57(3), 658-670.
- Flagstad, Ø., Walker, C.W., Vilà, C., Sundqvist, A.K., Fernholm, B., Hufthammer, A.K., Wiig, Ø., Kojola, I., & Ellegren, H. (2003). Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular Ecology*, 12(4), 869-880.
- Frankham, R., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). Introduction to conservation genetics. *Cambridge University Press, Cambridge, UK*.
- Franklin, I. R. (1980). Evolutionary changes in small populations. In: M. E. Soulé and B. M. Wilcox, Eds., *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*, Sinauer,



- Sunderland, 1980, pp. 135-149.
- Freedman, A.H., Gronau, I., Schweizer, R.M., Ortega-Del, Vecchyo, D., Han, E., Silva, P.M., Galaverni, M., Fan, Z., Marx, P., Lorente-Galdos, B., Beale, H., Ramirez, O., Hormozdiari, F., Alkan, C., Vilà, C., Squire, K., Geffen, E., Kusak, J., Boyko, A.R., Parker, H.G., Lee, C., Tadiogola, V., Wilton, A., Siepel, A., Bustamante, C.D., Harkins, T.T., Nelson, S.F., Ostrander, E.A., Marques-Bonet, T., Wayne, R.K., & Novembre, J. (2014). Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genetics*, *10*(1), e1004016.
- Freeland, J.R. (2005). *Molecular Ecology*. John Wiley and sons Ltd., London.
- Fries, R., Eggen, A., & Stranzinger, G. (1990). The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, *8*(2), 403-406.
- Fritts, S. H. (1983). Record dispersal by a wolf from Minnesota. *Journal of Mammalogy*, *64*(1), 166-167.
- Fritts, S. H., & Mech, L. D. (1981). Dynamics, movements, and feeding ecology of a newly protected wolf population in northwestern Minnesota. *Wildlife Monographs*, *80*, 3-79.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, *147*(2), 915-925.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, *18*(22), 4541-4550.
- Geffen, E., Anderson, M. J., & Wayne, R. K. (2004). Climate and habitat barriers to dispersal in the highly mobile grey wolf. *Molecular Ecology*, *13*(8), 2481-2490.
- Germonpré, M., Sablin, M. V., Stevens, R. E., Hedges, R. E., Hofreiter, M., Stiller, M., & Després, V. R. (2009). Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Journal of Archaeological Science*, *36*(2), 473-490.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human



- mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6715-6719.
- Gillespie, R. G. (2005). Geographical context of speciation in a radiation of Hawaiian *Tetragnatha* spiders (Araneae, Tetragnathidae). *Journal of Arachnology*, 33(2), 313-322.
- Ginsberg, J. R., & Macdonald, D. W. (1990). Foxes, wolves, jackals, and dogs: an action plan for the conservation of Canids. IUCN World Conservation Union, Gland, Switzerland.
- Glasel, J.A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, 18(1): 62-63.
- Godinho, R., Laneza, L., Blanco, J.C., Lopes, S., Álvares, F., García, E.J., Palacios, V., Cortés, Y., Talegón, J., & Ferrand, N. (2011). Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20(24), 5154-5166.
- Gomerčić, T., Sindičić, M., Galov, A., Arbanasić, H., Kusak, J., Kocijan, I., Gomerčić, M, Đ., & Huber, Đ. (2010). High genetic variability of the grey wolf (*Canis lupus* L.) population from Croatia as revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Zoological Studies*, 49(6), 816-823.
- Gosling, L. M. (1982). A reassessment of the function of scent marking in territories. *Ethology*, 60(2), 89-118.
- Gray, M. W. (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology* 5, 25-50
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F., & Cosson, J. F. (2005). A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170(3), 1261-1280.
- Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A., & Wilson, A. C. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352(6332), 255-257.
- Gyllensten, U., Wharton, D. & Wilson A. C. (1985). Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *Journal of Heredity*, 76(5), 321-324



- Haber, G. C. (1977). Socio-ecological dynamics of wolves and prey in a subarctic ecosystem. *PhD Thesis: University of British Columbia.*
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series, 41*, 95-98.
- Harrington, F. H., & Mech, L. D. (1979). Wolf howling and its role in territory maintenance. *Behaviour, 68*(3/4), 207-249.
- Harris, H. (1966). Genetics of Man: Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London, 164*(995), 298-310.
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. A. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution, 22*(2), 160-174.
- Hausknecht, R., Szabó, Á., Firmánszky, G., Gula, R., & Kuehn, R. (2010). Confirmation of wolf residence in Northern Hungary by field and genetic monitoring. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde, 75*(4), 348-352.
- Hewitt, G. M. (1999). Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society, 68*(1-2), 87-112.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature, 405*(6789), 907-913.
- Hindrikson, M., Remm, J., Männil, P., Ozolins, J., Tammeleht, E., & Saarma, U. (2013). Spatial genetic analyses reveal cryptic population structure and migration patterns in a continuously harvested grey wolf (*Canis lupus*) population in North-Eastern Europe. *PLoS One, 8*(9), e75765.
- Hindrikson, M., Remm, J., Pilot, M., Godinho, R., Stronen, A.V., Baltrunaite, L., Czarnomska, S.D., Leonard, J.A., Randi, E., Nowak, C., Akesson, M., Lopez-Bao, J.V., Alvares, F., Llaneza, L., Echegaray, J., Vilà, C., Ozolins, J., Rungis, D., Aspi, J., Paule, L., Skrbinsek, T., & Saarma, U. (2016). Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society, 92*(3), 1601-1629.



- Hoelzel, A. R., Lopez, J. V., Dover, G. A., & O'Brien, S. J. (1994). Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *Journal of Molecular Evolution*, 39(2), 191-199.
- Hofreiter, M., Paijmans, J. L., Goodchild, H., Speller, C. F., Barlow, A., Fortes, G. G., Thomas, J.A., Ludwig, A., & Collins, M. J. (2015). The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts. *BioEssays*, 37(3), 284-293.
- Honeycutt, R. L., Banks, K. R., Walker, C. W., & Skow, L. C. (1999). Genetics and the management of North American big game. *Transactions of the North American Wildlife and Natural Resource Conference*, 64, 139-155.
- Hutchison, C. A. III, Newbold, J. E., Potter, S. S., & Edgell, M. H. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251(5475), 536-538.
- Jamieson, I. G., & Allendorf, F. W. (2012). How does the 50/500 rule apply to MVPs? *Trends in Ecology & Evolution*, 27(10), 578-584.
- Jansson, E., Harmoinen, J., Ruokonen, M., & Aspi, J. (2014). Living on the edge: reconstructing the genetic history of the Finnish wolf population. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 64-84.
- Jansson, E., Ruokonen, M., Kojola, I., & Aspi, J. (2012). Rise and fall of a wolf population: genetic diversity and structure during recovery, rapid expansion and drastic decline. *Molecular Ecology*, 21(21), 5178-5193.
- Jedrzejewski, W., Branicki, W., Veit, C., Međugorac, I., Pilot, M., Aleksei, N. Bunevich, Jędrzejewska, B., Schmidt, K., Theuerkauf, J., Okarma, H., Gula, R., Szymura, L., & Förster, M. (2005). Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. *Acta Theriologica*, 50(1), 3-22.
- Johnson, F. M., Kanapi, C. G., Richardson, R. H., Wheeler, M. R., & Stone, W. S. (1966). An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 56(1), 119-125.



- Johnson, W. E., Selander, R. K., Smith, M. H., & Kim, Y. J. (1972). Biochemical genetics of sibling species of the cotton rat (*Sigmodon*). *Studies in Genetics VII*, 7213, 297-305.
- Jombart, T. (2008). Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405.
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(1), 94.
- Kaczensky, P., Chapron, G., von Arx, M., Huber, Đ., Andrén, H., & Linnell, J.D. (2013). Status, management and distribution of large carnivores - bear, lynx, wolf & wolverine - in Europe. Part 1- Europe summaries. Report: 1-72. A Large Carnivore Initiative for Europe Report prepared for the European Commission.
- Kennedy, P. K., Kennedy, M. L., Clarkson, P. L., & Liepins, I. S. (1991). Genetic variability in natural populations of the gray wolf, *Canis lupus*. *Canadian Journal of Zoology*, 69(5), 1183-1188.
- Kim, K. S., Lee, S. E., Jeong, H. W., & Ha, J. H. (1998). The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10(2), 210-220.
- Kimura, M., & Crow, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49(4), 725-738.
- Kimura, M., & Ohta, T. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(6), 2868-2872.
- Kobl Müller, S., Vilà, C., Lorente-Galdos, B., Dabad, M., Ramirez, O., Marques-Bonet, T., Wayne, R.K., & Leonard, J.A. (2016). Whole mitochondrial genomes illuminate ancient intercontinental dispersals of grey wolves (*Canis lupus*). *Journal of Biogeography*, 43(9), 1728-1738.
- Kopaliani, N., Shakarashvili, M., Gurielidze, Z., Qurkhuli, T., & Tarkhnishvili, D. (2014). Gene





- flow between wolf and shepherd dog populations in Georgia (Caucasus). *Journal of Heredity*, 105(3), 345-353.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179-1191.
- Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2), 150-163.
- Kurtén, B. (1968). The age of the dinosaurs. *Weidenfeld & Nicolson, London*.
- Kurtén, B., & E. Anderson. (1980). Pleistocene mammals of north america. *Columbia University Press*, 442.1
- Lampreave, G., Ruiz-Olmo, J., García-Petit, J., Lopez-Martín, J.M., Bataille, A., Francino, O., Sastre, N., & Ramírez, O. (2011). El lobo vuelve a Cataluna: Historia del regreso y medidas de conservacion. *Quercus*, 302, 16-25.
- Lee, S. D., Shin, C. H., Kim, K. B., Lee, Y. S., & Lee, J. B. (1997). Sequence variation of mitochondrial DNA control region in Koreans. *Forensic Science International*, 87(2), 99-116.
- Legendre, P., & Legendre, L. (1998). Numerical ecology: second English edition. *Developments in Environmental Modelling*, 20. Elsevier Science, Amsterdam.
- Leonard, J. A., Echegaray, J., Randi, E., & Vilà, C. (2014). Impact of hybridization with domestic dogs on the conservation of wild canids. *Free-ranging Dogs and Wildlife Conservation*, Oxford University Press, Oxford. 170-184.
- Leonard, J. A., Vilà, C., Fox-Dobbs, K., Koch, P. L., Wayne, R. K., & Van Valkenburgh, B. (2007). Megafaunal extinctions and the disappearance of a specialized wolf ecomorph. *Current Biology*, 17(13), 1146-1150.
- Leonard, J. A., Vilà, C., & Wayne, R. K. (2005). FAST TRACK: Legacy lost: genetic variability



- and population size of extirpated US grey wolves (*Canis lupus*). *Molecular Ecology*, 14(1), 9-17.
- Lewontin, R.C., & Hubby, J.L. (1966). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54(2), 595-609.
- Li, J.-L., Deng, H., Lai D.-B., Xu, F., Chen, J., Gao, G., Recker, R. & Deng, H.-W. (2001). Toward high-throughput genotyping: dynamic and automatic software for manipulating large-scale genotype data using fluorescently labelled dinucleotide markers. *Genome Research*, 11(7), 1304-1314.
- Litt, M., & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44(3), 397.
- Lopez-Bao, J.V., Blanco, J.C., Rodríguez, A., Godinho, R., Alvares, F., García, E.J., Llaneza, L., Rico, M., Cortes, Y., Palacios, V., & Chapron, G. (2015). Toothless wildlife protection laws. *Biodiversity and Conservation*, 24(8), 2105-2108.
- Lucchini, V., Galov, A., & Randi, E. (2004). Evidence of genetic distinction and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. *Molecular Ecology*, 13(3), 523-536.
- Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12(1), 228-237.
- Luikart, G., & England, P. R. (1999). Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(7), 253-256.
- Luikart, G., Ryman, N., Tallmon, D. A., Schwartz, M. K., & Allendorf, F. W. (2010). Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conservation Genetics*, 11(2), 355-373.



- Lunt, D. H., Whipple, L. E., & Hyman, B. C. (1998). Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 7(11), 1441-1455.
- Manel, S., Schwartz, K. M., Luikart G., Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *ScienceDirect*, 18(4), 189-197.
- Mech, L. D. (1966). *Wolves of Isle Royale*. U.S. Government Printing Office.
- Mech, L.D. (ed.) (1970). *The wolf: the ecology and behaviour of an endangered species*. The Natural History Press, New York.
- Mech, L. D. (1973). *Wolf numbers in the Superior National Forest of Minnesota*. USDA Forest Service Research Paper NC-97.
- Mech, L. D. (1988). Longevity in wild wolves. *Journal of Mammalogy*, 69(1), 197-198.
- Mech, L. D. (1995). The challenge and opportunity of recovering wolf populations. *Conservation Biology*, 9(2), 270-278.
- Mech, L. D. (2001). Managing Minnesota's recovered wolves. *Wildlife Society Bulletin*, 29(1), 70-77.
- Mech, L. D., Adams, L. G., Meier, T. J., Burch, J. W., & Dale, B. W. (1998). *The Wolves of Denali*. University of Minnesota Press.
- Mech, L. D., & Boitani, L. (Eds.). (2010). *Wolves: behavior, ecology, and conservation*. University of Chicago Press.
- Mech, L. D., Fritts, S. H., & Wagner, D. (1995). Minnesota wolf dispersal to Wisconsin and Michigan. *American Midland Naturalist*, 133(2), 368-370.
- Mech, L. D., & Hertel, H. H. (1983). An eight-year demography of a Minnesota wolf pack. *Acta Zoologica Fennica*, 174, 249-250.
- Meriggi, A., & Lovari, S. (1996). A review of wolf predation in southern Europe: does the wolf prefer wild prey to livestock? *Journal of Applied Ecology*, 33(6), 1561-1571.



- Milenković, M. (1997). Taxonomic–biogeographic status and ecological/economical significance of the wolf (*Canis lupus* Linnaeus 1758) in Yugoslavia. Unpublished Ph. D. dissertation. *University of Belgrade, Serbia*.
- Milenković, M., Paunović, M., & Ćirović, D. (2007). Action plan for wolf *Canis lupus* L., 1758 conservation in Serbia. Phase I–strategic plan. Project report. *Institute for Biological Research Siniša Stanković, Belgrade, Ministry of Environmental Protection Republic of Serbia*.
- Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N.B., Inoue, J.G., Mukai, T., Satoh, T.P., Yamaguchi, M., Kawaguchi, A., & Mabuchi, K. (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(1), 121-138.
- Montagna, W., & Parks, H. F. (1948). A histochemical study of the glands of the anal sac of the dog. *The Anatomical Record*, 100(3), 297-317.
- Montana, L., Caniglia, R., Galaverni, M., Fabbri, E., Ahmed, A., Bolfikova, B.C., Czarnomska, S.D., Galov, A., Godinho, R., Hindrikson, M., Hulva, P., Jedrzejewska, B., Jelencic, M., Kutal, M., Saarma, U., Skrbinek, T., & Randi, E. (2017). Combining phylogenetic and demographic inferences to assess the origin of the genetic diversity in an isolated wolf population. *PLoS One*, 12(5), e0176560.
- Morales, J., & Aguirre, E. (1976). Carnívoros de Venta del Moro. *Trabajos sobre Neógeno-Cuaternario*, 5, 31-81.
- Moran, P. A. (1948). The interpretation of statistical maps. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 10(2), 243-251.
- Moran, P. A. (1950). Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*, 37(1/2), 17-23.
- Morgante, M., Felice, N., & Vendramin, G. G. (1998). Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In: *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, Springer. 407-412.
- Moura, A. E., Tsingarska, E., Dąbrowski, M. J., Czarnomska, S. D., Jędrzejewska, B., & Pilot,



- M. (2014). Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conservation Genetics*, 15(2), 405-417.
- Muñoz-Fuentes, V., Darimont, C. T., Wayne, R. K., Paquet, P. C., & Leonard, J. A. (2009). Ecological factors drive differentiation in wolves from British Columbia. *Journal of Biogeography*, 36(8), 1516-1531.
- Murie, A. (1944). The wolves of Mount McKinley. U.S. National Park Service Fauna Ser. No. 5, Washington, D.C.
- Musiani, M., Boitani, L., Paquet, P.C. (2009). A new era for wolves and people: wolf recovery, human attitudes and policy. *Calgary: University of Calgary Press*.
- Musiani, M., Leonard, J.A., Cluff, H.D., Gates, C.C., Mariani, S., & Paquet, P.C. (2007). Differentiation of tundra/taiga and boreal coniferous forest wolves: genetics, coat colour and association with migratory caribou. *Molecular Ecology*, 16(19), 4149-4170.
- Nelson, M. E., & Mech, L. D. (1984). Home-range formation and dispersal of deer in northeastern Minnesota. *Journal of Mammalogy*, 65(4), 567-575.
- Nybohm, H., Gardiner, S., & Simon, C. J. (1992). RFLPs obtained from an rDNA probe and detected with enhanced chemiluminescence in apples. *HortScience*, 27(4), 355-356.
- Ohta, T., & Kimura, M. (1973). A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetics Research*, 22(2), 201-204.
- Olney, P. J., Mace, G., & Feistner, A. (1993). Creative conservation: interactive management of wild and captive animals. *Springer Science & Business Media*.
- Olson, S. F. (1938). A study in predatory relationship with particular reference to the wolf. *The Scientific Monthly*, 46(4), 323-336.
- Page, R. D., & Holmes, E. C. (2009). Molecular evolution: a phylogenetic approach. *John Wiley & Sons, London*.
- Palomares, F., Godoy, J. A., Píriz, A., O'Brien, S. J., & Johnson, W. E. (2002). Faecal genetic



- analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology*, 11(10), 2171-2182.
- Palstra, F. P., & Ruzzante, D. E. (2008). Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology*, 17(15), 3428-3447.
- Pang, J.F., Kluetsch, C., Zou, X.J., Zhang, A.B., Luo, L.Y., Angleby, H., Ardalán, A., Ekström, C., Sköllermo, A., Lundeberg, J., Matsumura, S., Leitner, T., Zhang, Y.P., & Savolainen, P. (2009). mtDNA data indicates a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular Biology and Evolution*, 26(12), 2849-2864.
- Parks, H. F. (1950). Morphological and cytochemical observations on the circumanal glands of dogs. *PhD Thesis: Cornell University, New York*.
- Peery, M.Z., Kirby, R., Reid, B.N., Stoelting, R., Doucet-Beer, E., Robinson, S., Vasquez-Carrillo, C., Pauli, J.N., & Palsboll, P.J. (2012). Reliability of genetic bottleneck tests for detecting recent population declines. *Molecular Ecology*, 21(14), 3403-3418.
- Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R., & Barrett, J. A. (1995). Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4(2), 249-252.
- Person, D. K., Kirchhoff, M., Van Ballenberghe, V., Iverson, G. C., & Grossman, E. (1996). The Alexander Archipelago wolf: a conservation assessment. *United States Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station*, 1-52.
- Peters, R. P., & Mech, L. D. (1976). Behavioral and intellectual adaptations of selected mammalian predators to the problem of hunting large animals. In: Tuttle, R. H. (ed.). *Socioecology and psychology of primates*. Mouton Publishers. The Hague/Paris. 279-300.
- Peterson, R. O. & Ciucci, P. (2003). The wolf as a carnivore. In: *Wolves: behaviour, ecology and conservation*. University of Chicago Press. 104-130.



- Peterson, R. O., & Page, R. E. (1988). The rise and fall of Isle Royale wolves, 1975–1986. *Journal of Mammalogy*, 69(1), 89-99.
- Peterson, R. O., Woolington, J. D., & Bailey, T. N. (1984). Wolves of the Kenai peninsula, Alaska. *Wildlife Monographs*, 88. 3-52.
- Pezzo, F., Parigi, L., & Fico, R. (2003). Food habits of wolves in central Italy based on stomach and intestine analyses. *Acta Theriologica*, 48(2), 265-270.
- Pilot, M., Branicki, W., Jędrzejewski, W., Goszczyński, J., Jędrzejewska, B., Dyky, I., Shkvyrya, M., & Tsingarska, E. (2010). Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 104.
- Pilot, M., Dabrowski, M.J., Hayrapetyan, V., Yavruyan, E.G., Kopaliani, N., Tsingarska, E., Bujalska, B., Kaminski, S., & Bogdanowicz, W. (2014). Genetic variability of the grey wolf *Canis lupus* in the Caucasus in comparison with Europe and the Middle East: distinct or intermediary population? *PLoS One*, 9(4), e93828.
- Pilot, M., Jędrzejewski, W., Branicki, W., Sidorovich, V. E., Jędrzejewska, B., Stachura, K., & Funk, S. M. (2006). Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology*, 15(14), 4533-4553.
- Pilot, M., Jędrzejewski, W., Sidorovich, V. E., Meier-Augenstein, W., & Hoelzel, A. R. (2012). Dietary differentiation and the evolution of population genetic structure in a highly mobile carnivore. *PLoS One*, 7(6), e39341.
- Pires, A.E., Amorim, I.R., Borges, C., Simões, F., Teixeira, T., Quaresma, A., Petrucci-Fonseca, F., & Matos, J. (2017). New insights into the genetic composition and phylogenetic relationship of wolves and dogs in the Iberian Peninsula. *Ecology and Evolution*, 7(12), 4404-4418.
- Piry, S., G. Luikart, and J. M. Cornuet. (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of heredity*, 90, 502-503.
- Plumer, L., Keis, M., Remm, J., Hindrikson, M., Jogiaslu, I., Mannil, P., Kubarsepp, M., &



- Saarma, U. (2016). Wolves recolonizing islands: genetic consequences and implications for conservation and management. *PLoS ONE*, *11*(7), e0158911.
- Primmer, C. R., Møller, A. P., & Ellegren, H. (1996). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, *5*(3), 365-378.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945-959.
- Pritchard, J.K., Wen, X., & Falush, D. (2007). Documentation for "Structure" software: Version 2.2. *Department of Statistics, University of Oxford*.
- Rambaut, A. (2012). FigTree v 1.4. 2: Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. *Edinburgh: University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology*.
- Rambaut, A., & Drummond, A.J. (2007). Tracer v. 1.5. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.
- Randi, E. (2011). Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammalian Review*, *41*(2), 99-111.
- Randi, E., Lucchini, V., Christensen, M. F., Mucci, N., Funk, S. M., Dolf, G., & Loeschcke, V. (2000). Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology*, *14*(2), 464-473.
- Randi, E., Lucchini, V., & Francisci, F. (1993). Allozyme variability in the Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Heredity*, *71*(5), 516-522.
- Ražen, N., Brugnoli, A., Castagna, C., Groff, C., Kaczensky, P., Kljun, F., Knauer, F., Kos, I., Krofel, M., Luštrik, R., & Majić, A. (2016). Long-distance dispersal connects Dinaric-Balkan and Alpine grey wolf (*Canis lupus*) populations. *European Journal of Wildlife Research*, *62*(1), 137-142.
- Reig, S., & Palacios, F. (1985). The impact of human activities on the food habits of red fox and wolf in Old Castille, Spain. *Revue D Ecologie-la Terre Et La Vie*, *40*(2), 151-155.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, *43*(1), 223-225.





- Ripple, W. J., Beschta, R. L., Fortin, J. K., & Robbins, C. T. (2014). Trophic cascades from wolves to grizzly bears in Yellowstone. *Journal of Animal Ecology*, 83(1), 223-233.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542.
- Rothman, R. J., & Mech, L. D. (1979). Scent-marking in lone wolves and newly formed pairs. *Animal Behaviour*, 27, 750-760.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), 2496-2497.
- Russello, M. A., & Amato, G. (2004). Ex situ population management in the absence of pedigree information. *Molecular Ecology*, 13(9), 2829-2840.
- Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W., & Hanski, I. (1998). Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392(6675), 491.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CHS Press, New York.
- Sastre, N., Vilà, C., Salinas, M., Bologov, V. V., Urios, V., Sánchez, A., Franzino, O., & Ramírez, O. (2011). Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations. *Conservation Genetics*, 12(3), 701-712.
- Scandura, M., Iacolina, L., Capitani, C., Gazzola, A., Mattioli, L., & Apollonio, M. (2011). Fine-scale genetic structure suggests low levels of short-range gene flow in a wolf population of the Italian Apennines. *European Journal of Wildlife Research*, 57(4), 949-958.
- Schassburger, R. M. (1993). *Vocal communication in the timber wolf, Canis lupus, Linnaeus: structure, motivation, and ontogeny; with 6 tables*. Parey Scientific Publisher.
- Schenkel, R. (1947). Expression studies of wolves. *Behaviour*, 1(8), 1-129.



- Schlötterer, C. (1998). Genome evolution: are microsatellites really simple sequences? *Current Biology*, 8(4), R132-R134.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6), 365-371.
- Schlötterer, C., & Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20(2), 211-215.
- Schmitt, T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*, 4, 11.
- Schug, M. D., Mackay, T. F., & Aquadro, C. F. (1997). Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, 15(1), 99-102.
- Seddon, J. M., Parker, H. G., Ostrander, E. A., & Ellegren, H. (2005). SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population. *Molecular Ecology*, 14(2), 503-511.
- Sharma, D. K., Maldonado, J. E., Jhala, Y. V., & Fleischer, R. C. (2004). Ancient wolf lineages in India. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(3), S1-S4.
- Stephenson, F.H. (2010). *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory*, 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press.
- Šnjegota, D., Djan, M., Veličković, N., Popović, D., Trbojević, I., Obreht, D., & Ćirović, D. 2014. Genetic variability of grey wolf (*Canis lupus*) population in Bosnia and Herzegovina. *Proceedings of 3rd International Symposium on Hunting with Abstract book "Modern aspects of sustainable management of game populations"*. Zemun-Belgrade, 26-28.
- Šnjegota, D., Đan, M., Veličković, N., Stefanović, M., Trbojević, I., & Ćirović, D. (2016). Genetic variability and population structure of grey wolf (*Canis lupus*) from Bosnia & Herzegovina. *Balkan Journal of Wildlife Research*, 3(1), 7-11.



- Sofradžija, A., & Muzaferović, Š. (2007). Biodiverzitet sisara Bosne i Hercegovine: katalog. *Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju*.
- Sommer, R., & Benecke, N. (2005). Late Pleistocene and early Holocene history of the canid fauna of Europe (*Canidae*). *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*, 70(4), 227-241.
- Squirrell, J., Hollingsworth, P. M., Woodhead, M., Russell, J., Lowe, A. J., Gibby, M., & Powell, W. (2003). How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology*, 12(6), 1339-1348.
- Stahler, D. R., Smith, D. W., & Landis, R. (2002). The acceptance of a new breeding male into a wild wolf pack. *Canadian Journal of Zoology*, 80(2), 360-365.
- Stallings, R. L., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E., & Moyzis, R. K. (1991). Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 10(3), 807-815
- Stewart, J. R., Lister, A. M., Barnes, I., & Dalén, L. (2010). Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1682), 661-671.
- Štrbenac, A., Huber, Đ., Kusak, J., Majić-Skrbinšek, A., Frković, A., Stahan, Z., Jeremić-Martinko, J., Desnica, S., & Štrbenac, P. (2005). Wolf Management Plan for the Republic Croatia. *Zagreb, Croatia: State Institute for Nature Protection*.
- Štrbenac, A., Huber, Đ., Kusak, J., Oković, P., Sindičić, M., Jeremić, J., Frković, A., & Gomercic, T. (2008). Large carnivore conservation in Croatia bulletin. *Zagreb, Croatia: State Institute for Nature Protection*.
- Stronen, A.V., Cotovelea, A., Ericson, H.S., Saarma, U., Hulva, P., Čirović, D., Đan, M., Šnjegota, D., Jedrzejewska, B., Plis, K., Hegyeli, Z., Dykyy, I., Kusak, J., Tsingarska, E., Karamanlidis, A.A., Ornicans, A., & Skrbinšek, T. (2018). Population genetic structure of wolves (*Canis lupus*) in Central Europe. Book of Abstracts. 3rd Annual Meeting in Conservation Genetics, Wien. 21p.



- Stronen, A.V., Jedrzejewska, B., Pertoldi, C., Demontis, D., Randi, E., Niedziałkowska, M., Pilot, M., Sidorovich, V.E., Dykyy, I., Kusak, J., Tsingarska, E., Kojola, I., Karamanlidis, A.A., Ornicans, A., Lobkov, V.A., Dumenko, V., & Czarnomska, S.D. (2013). North-South differentiation and a region of high diversity in European Wolves (*Canis lupus*). *Plos One*, 8(10), e76454.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(5), 199-203.
- Surina, B., Schneeweiss, G. M., Glasnović, P., & Schönswetter, P. (2014). Testing the efficiency of nested barriers to dispersal in the Mediterranean high mountain plant *Edraianthus graminifolius* (*Campanulaceae*). *Molecular Ecology*, 23(11), 2861-2875.
- Taberlet, P. (1996). The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, New York, 125-142.
- Taberlet, P., & Bouvet, J. (1994). Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of Royal Society of London*, 255(1344), 195-200.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17(16), 6463-6471.
- Thioulouse, J., Chessel, D., & Champely, S. (1995). Multivariate analysis of spatial patterns: a unified approach to local and global structures. *Environmental and Ecological Statistics*, 2(1), 1-14.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882.
- Tóth, G., Gáspári, Z., & Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey



- and analysis. *Genome Research*, 10(7), 967-981.
- Trbojević, I. (2016). *Distribucija, status i ishrana vuka (Canis lupus L., 1758) na teritoriji Bosne i Hercegovine* (Doctoral dissertation, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet).
- Trbojević, I., & Ćirović, D. (2016). Sexual dimorphism and population differentiation of the wolf (*Canis lupus*) based on morphometry in the Central Balkans. *North-Western Journal of Zoology*, 12(2).
- Upholt, W. B. (1977). Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. *Nucleic Acids Research*, 4(5), 1257-1266.
- Valdes, A. M., Slatkin, M., & Freimer, N. B. (1993). Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics*, 133(3), 737-749.
- Valdmann, H., Laanetu, N., & Korsten, M. (2004). Group size changes and age/sex composition of harvested wolf (*Canis lupus*) in Estonia. *Baltic Forestry*, 10(2), 83-86.
- Valière, N., Fumagalli, L., Gielly, L., Miquel, C., Lequette, B., Poulle, M.L., Weber, J.M., Arlettaz, R., & Taberlet, P. (2003). Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years. *Animal Conservation*, 6(1), 83-92.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Resources*, 4(3), 535-538.
- Vilà, C., Amorim, I., Leonard, J., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, K. A., Ellegren, H. & Wayne, R. (1999). Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, 8, 2089-2103.
- Vilà, C., Sundqvist, A. K., Flagstad, Ø., Seddon, J., Kojola, I., Casulli, A., Sand, H., Wabakken, P., & Ellegren, H. (2003). Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1510), 91-97.



- Voigt, D. R., & Berg, W. E. (1987). Coyote. *Wild Furbearer Management and Conservation in North America*, 345-356.
- von Koenigswald, W. (2003). Mode and causes for the Pleistocene turnovers in the mammalian fauna of Central Europe. *Deinsea*, 10(1), 305-312.
- vonHoldt, B.M., Pollinger, J.P., Lohmueller, K.E., Han, E., Parker, H.G., Quignon, P., Degenhardt, J.D., Boyko, A.R., Earl, D.A., Auton, A., Reynolds, A., Bryc, K., Brisbin, A., Knowles, J.C., Mosher, D.S., Spady, T.C., Elkahoun, A., Geffen, E., Pilot, M., Jedrzejewski, W., Greco, C., Randi, E., Bannasch, D., Wilton, A., Shearman, J., Musiani, M., Cargill, M., Jones, P.G., Qian, Z., Huang, W., Ding, Z.L., Zhang, Y.P., Bustamante, C.D., Ostrander, E.A., Novembre, J., & Wayne, R.K. (2010). Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*, 464(7290), 898-902.
- vonHoldt, B. M., Stahler, D. R., Smith, D. W., Earl, D. A., Pollinger, J. P., & Wayne, R. K. (2008). The genealogy and genetic viability of reintroduced Yellowstone grey wolves. *Molecular Ecology*, 17(1), 252-274.
- Wabakken, P., Sand, H., Liberg, O., & Bjärvall, A. (2001). The recovery, distribution, and population dynamics of wolves on the Scandinavian peninsula, 1978-1998. *Canadian Journal of Zoology*, 79(4), 710-725.
- Wallace, D.C. (1982). Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiological Review*, 46(2), 208-240
- Wallace, D. C. (1986). Mitotic segregation of mitochondrial DNAs in human cell hybrids and expression of chloramphenicol resistance. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 12(1), 41-49.
- Walters, C. J., Stocker, M., & Haber, G. C. (1981). Simulation and optimization models for a wolf-ungulate system. In: *Dynamics of large mammal populations*. John Wiley and Sons, New York, New York, USA, 317-337.
- Wang, J. (2005). Estimation of effective population sizes from data on genetic markers.



- Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1459), 1395-1409.
- Waples, R. S. (2002). Evaluating the effect of stage-specific survivorship on the Ne/N ratio. *Molecular Ecology*, 11(6), 1029-1037
- Waples, R. S., & Do, C. (2010). Linkage disequilibrium estimates of contemporary Ne using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications*, 3(3), 244-262.
- Wayne, R. K. (1993). Molecular evolution of the dog family. *Trends in Genetics*, 9(6), 218-224.
- Wayne, R. K., Lehman, N., Allard, M. W., & Honeycutt, R. L. (1992). Mitochondrial DNA variability of the gray wolf: genetic consequences of population decline and habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 6(4), 559-569.
- Weber, J. L., & May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44(3), 388-396.
- Weber, J. L., & Wong, C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2(8), 1123-1128.
- Weckworth, B. V., Talbot, S. L., & Cook, J. A. (2010). Phylogeography of wolves (*Canis lupus*) in the Pacific Northwest. *Journal of Mammalogy*, 91(2), 363-375.
- Weckworth, B. V., Talbot, S., Sage, G. K., Person, D. K., & Cook, J. (2005). A signal for independent coastal and continental histories among North American wolves. *Molecular Ecology*, 14(4), 917-931.
- Wilson, D. E., & Reeder, D. M. (Eds.). (2005). Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference (Vol. 2). *John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland*.
- Wolff, R. K., Plaetke, R., Jeffreys, A. J., & White, R. (1989). Unequal crossingover between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics*, 5(2), 382-384.



- Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology*, 141, 173-216.
- Wright, J. M., & Bentzen, P. (1995). Microsatellites: genetic markers for the future. In: *Molecular Genetics in Fisheries*, 117-121.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97-159.
- Young, S. P., & Goldman, E. A. (1944). The wolves of North America. 2 parts. *Dover Publications, New York*.
- Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(6), 247-251.
- Zimen, E. (1976). On the regulation of pack size in wolves. *Ethology*, 40(3), 300-341.
- Zimen, E. (1981). The wolf: his place in the natural world. 373. *Souvenir Press, London*.



## BIOGRAFIJA



Dragana Šnjegota je rođena 31. maja 1985. godine u Banjaluci, Bosna i Hercegovina. Osnovnu i srednju školu - Gimnaziju završila je u Srpcu, sa odličnim uspjehom. Osnovne studije Biologiju, upisala je 2004. godine, na Prirodno - matematičkom fakultetu, Univerzitet u Banjaluci, a završila 2009. godine, sa prosječnom ocjenom 9,13. U toku osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva prosvjete i kulture Republike Srpske i Fondacije dr Milan Jelić.

Nakon završenih diplomskih studija, zaposlila se u ŠC "Petar Kočić" u Srpcu, kao profesor Biologije, a 2011. godine izabrana je za asistenta na naučnoj oblasti Genetika i nasljeđivanje na Prirodno - matematičkom fakultetu, Univerzitet u Banjaluci. 2015. godine izabrana je za višeg asistenta na istoj naučnoj oblasti. Master akademske studije, modul Zoologija upisala je 2011. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno - matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, a završila 2013. godine, sa prosječnom ocjenom 9.57 i ocjenom 10 iz odbranjenog završnog rada. Na istom Departmanu upisala je Doktorske studije, studijski program Doktor bioloških nauka, 2013. godine. U toku master i doktorskih studija bila je stipendista Ministarstva prosvjete i kulture i Ministarstva nauke i tehnologije Republike Srpske.

U periodu od 2013 - 2018. godine povremeno je boravila u Laboratoriji za Genetiku, Prirodno - matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, gdje je radila na izradi teze, kao stipendista Ministarstva nauke i tehnologije Republike Srpske (stipendije za sufinansiranje međunarodne razmjene studenata i akademskog osoblja). U februaru i junu 2017. godine, te u septembru 2018. godine boravila je i radila analize u okviru projekta "Phylogeography of contemporary wolves *Canis lupus* inhabiting the presumed LGM refugia in south - eastern Europe: the Balkan, the Carpathian, and the Caucasian regions" u Centru za istraživanje sisara (Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences in Białowieża, Poland), Bjalovježa, Poljska.

Koautor je 2 rada koja su objavljena u međunarodnim časopisima, 4 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u cjelini, 7 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu, 1 rada u časopisu nacionalnog značaja, 2 rada u naučnom časopisu, 4 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampanih u cjelini i 2 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja

štampanih u izvodu.

Koordinator je projekata koji se bave proučavanjem populacije vuka Bosne i Hercegovine, finansiranih od strane Rufford Fondacije, Velika Britanija.

Član je Društva genetičara Srbije, Biohemijskog društva Srbije i GAMEST (Wildlife and Game Management Scientific Society) društva Srbije.

Aktivno se služi engleskim jezikom.

Novi Sad, 2018. godine

Dragana Šnjegota

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**PRIRODNO MATEMATIČKI FAKULTET**  
**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	<i>Monografska dokumentacija</i>
Tip zapisa: TZ	<i>Tekstualni štampani materijal</i>
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	<i>Doktorska disertacija</i>
Ime i prezime autora: AU	<i>Dragana Šnjegota</i>
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	<i>Dr Mihajla Đan, redovni profesor, PMF, Novi Sad</i>
Naslov rada: NR	<i>Genetička struktura i filogeografski položaj vuka (Canis lupus L. 1758) Bosne i Hercegovine</i>
Jezik publikacije: JP	<i>Srpski / Latinica</i>
Jezik izvoda: JI	<i>Srpski</i>
Zemlja publikovanja: ZP	<i>Srbija</i>
Uže geografsko područje: UGP	<i>Vojvodina</i>
Godina: GO	<i>2019</i>
Izdavač: IZ	<i>Autorski reprint</i>
Mesto i adresa: MA	<i>Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Trg Dositeja Obradovića 2</i>
Fizički opis rada: FO	<i>10 poglavlja, 164 strane, 30 slika, 11 tabela, 5 priloga, 277 literaturnih navoda</i>
Naučna oblast: NO	<i>Biologija</i>
Naučna disciplina: ND	<i>Genetika</i>
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Mikrosateliti, mtDNK, struktura populacije, genetička varijabilnost, filogeografija, vuk</i>

---

UDK

Čuva se:

*Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju,  
PMF, Novi Sad*

---

ČU

Važna napomena:

VN

---

Izvod:

IZ

*Ovom tezom je obuhvaćena analiza genetičke strukture i filogeografskog položaja vuka (*Canis lupus* L. 1758) na teritoriji Bosne i Hercegovine, na uzorku od ukupno 79 jedinki. Analize su sprovedene primjenom (i) 18 mikrosatelitskih lokusa nDNK pomoću kojih su detektovani: nivo genetičke varijabilnosti, populaciona struktura, prolazak populacije kroz genetičko usko grlo, te ukrštanje u srodstvu, i (ii) kontrolnog regiona (CR) regiona mtDNK pomoću kojih su sprovedene filogeografske analize. U radu je uočeno je grupisanje jedinki vuka Bosne i Hercegovine u dva genetička klastera što, s obzirom na slabu statističku podržanost, najvjerojatnije ukazuje na prisustvo strukture na većem nivou. Prethodno navedeno je detektovano analizama populacione strukture dijela dinarsko - balkanske populacije vuka, gdje je uočena distribucija vukova Bosne i Hercegovine i Srbije u odvojene genetičke klastere. Statistički značajni signali prolaska populacije vuka Bosne i Hercegovine kroz genetičko usko grlo u skorijoj prošlosti nisu detektovani. Sekvence kontrolnog regiona mtDNK vuka pokazale su se dovoljno informativnim za detekciju jedinstvenih haplotipova vuka Bosne i Hercegovine, za koje je uočena distribucija u dvije, prethodno u literaturi, detektovane haplogrupe bez jasnog alopatrijskog obrasca. Pored toga, analizama sekvenci dijela kontrolnog regiona mtDNK uzorka vuka Evrope, uočeno je da se demografska ekspanzija haplogrupe 2 desila mnogo ranije u prošlosti u odnosu na period ekspanzije haplogrupe 1, koji se poklapa sa periodom razdvajanja navedenih haplogrupa, prije oko 13000 godina, što ukazuje da je posljednji glacijalni maksimum imao uticaja u oblikovanju strukture genetičkih linija vuka u prošlosti. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su veoma informativni u cilju uspostavljanja pravilnog menadžmenta vrste i kreiranja plana zaštite vuka na nivou Bosne i Hercegovine, odnosno, na nivou dinarsko - balkanske populacije vuka iz koje se vrše rekolonizacije jedinki u susjedne populacije.*

---

Datum prihvatanja teme od strane

Senata:

*13.7.2017. godine*

DP

---

---

Datum odbrane:

DO

---

Članovi komisije:

KO

*Predsednik: dr Nevena Veličković, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

*Član: dr Stojko Vidović, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjaluci*

*Član: dr Duško Ćirović, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu*

*Član: dr Nataša Kočić Tubić, naučni saradnik, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

*Mentor: dr Mihajla Djan, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

---

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES  
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	<i>Monograph documentation</i>
Type of record: TR	<i>Textual printed material</i>
Contents code: CC	<i>PhD Thesis</i>
Author: AU	<i>Dragana Šnjegota</i>
Mentor: MN	<i>Mihajla Đan, associate professor, Faculty of Sciences, Novi Sad</i>
Title: TI	<i>Genetic structure and phylogeography of the wolf (<i>Canis lupus</i> L. 1758) from Bosnia and Herzegovina</i>
Language of text: LT	<i>Serbian / Latin</i>
Language of abstract: LA	<i>Serbian</i>
Country of publication: CP	<i>Serbia</i>
Locality of publication: LP	<i>Vojvodina</i>
Publication year: PY	<i>2018</i>
Publisher: PU	<i>Author's reprint</i>
Publication place: PP	<i>Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2</i>
Physical description: PD	<i>10 chapters, 164 pages, 30 figures, 11 tables, 5 appendices, 277 references</i>
Scientific field SF	<i>Biology</i>

Scientific discipline

*Genetics*

SD

---

Subject, Key words

SKW

*Microsatellites, mtDNA, population structure, genetics variability, phylogeography, wolf*

---

UC

---

Holding data:

HD

*The Library of the Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Novi Sad*

---

Note:

N

---

Abstract:

AB

*In this thesis, the genetic structure and phylogeography of the wolf (*Canis L. 1758*) in the territory of Bosnia and Hercegovina were analysed, from a total sample of 79 individuals. Analyses were conducted by applying (i) 18 microsatellite loci of nuclear DNA, by which we estimated: the level of genetic variability, population structure, kinship, bottleneck and inbreeding, and (ii) control region of mtDNA by which we analysed phylogeography. Two genetic clusters were observed for the wolf population from Bosnia and Hercegovina, although with statistically low support, which may point to structuring at the higher level. Indeed, after analysing the population structure at the higher, Dinaric - Balkan level, the distribution of wolves from Bosnia and Hercegovina and Serbia was observed as falling into two distinct genetic clusters. Statistically significant signs of the recent bottleneck were not observed in the wolf population from Bosnia and Hercegovina. Analyses of control region mtDNA were conducted with the aim of detecting haplotypes in the Bosnia and Hercegovina population, as well as in the European samples. Distribution of haplotypes into two haplogroups, described in previous literature, was observed, without a clear alopatric phylogeny pattern. Furthermore, the analyses of the same molecular marker showed that demographic expansion of haplogroup 2 occurred significantly earlier when compared to the demographic explosion of haplogroup 1. Results from this study are extremely important for the creation of a management plan for wolves from Bosnia and Hercegovina, and at the higher Dinaric - Balkan level.*

---

Accepted on Senate on:

*13.7.2017.*

---

AS

---

Defended:

DE

---

---

Thesis Defend Board:

DB

*President: dr Nevena Veličković, Assistant Proffesor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad*

*Member: dr Stojko Vidović, Full Professor, Faculty of Medicine, University of Banja Luka*

*Member: dr Duško Ćirović, Assistant Proffesor, Faculty of Biology, University of Belgrade*

*Member: dr Nataša Kočić Tubić, Research Associate, Faculty of Sciences, University of Novi Sad*

*Mentor: dr Mihajla Djan, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad*