

IZBRANI PRIMERI GENETSKIH ANALIZ PROSTOŽIVEČIH GOZDNIH ŽIVALI V SLQVENIJI

Genetic analyses of forest animals in Slovenia - case studies

Povzetek: Sposobnost preživetja in uspešnost neke populacije sta odvisna od dejavnikov okolja in genetske sestave populacije, kar ugotavljamo z analizami genetskih označevalcev. V prispevku prikazujemo stanje dveh izbranih gozdnih živalskih vrst (divji petelin, Tetrao urogallus in gams, Rupicapra rupicapra) in predstavimo metode za analizo genetske strukture populacij teh vrst v Sloveniji kot pomemben vir informacij za učinkovito trajnostno upravljanje s populacijami in rastišči gozdnih živali, tudi gozdnih živali, ter ohranjanje ogroženih vrst. V sklopu analiz smo pridobili številne biološke vzorce divjega petelina, gamsa ter nekaterih drugih vrst divjadi ter vzpostavili protokole za analizo izbranih genetskih označevalcev in obdelavo pridobljenih podatkov. V pregledu smo predstavili nekaj možnosti in predlogov uporabe genetskih analiz gozdnih živali v Sloveniji. Na primeru podatkov o genetski pestrosti razmejene alpsko-SZ dinarske in JV dinarske populacije divjega petelina predlagamo usmeritve gospodarjenja s habitati v smeri povezovanja obeh populacij in preprečitve prekomernega genetskega siromašenja zaradi fragmentacije in izolacije populacij.

Ključne besede: biotska raznovrstnost na genskem nivoju, gozdne živali, gospodarjenje z gozdom, mikrosateliti, molekularni označevalci

Summary: The survival and the success of a population of any species depend on environmental factors and genetic fitness of the population, which can be assessed by analysis of suitable genetic markers. We discuss the status of western capercaillie (Tetrao urogallus) and chamois (Rupicapra rupicapra) populations in Slovenia and present methods for analysis of genetic composition of populations of these forest animal species. Genetic analyses are discussed as an invaluable source of information for sustainable management of forest animal populations, including game, their habitats and conservation of endangered species. We performed a large scale collection of biological samples of the western capercaillie, the chamois as well as other forest animal species and implemented protocols for analysis of suitable genetic markers. Possibilities, applicability and utility of genetic analyses of game species in Slovenia are succinctly presented. Based on the results of the genetic diversity analysis of the isolated Alpine-NWDinaric and SE Dinaric capercaillie populations in Slovenia we propose the strategy of capercaillie habitat areas management with an aim of reconnecting both populations to prevent excessive genetic impoverishment due to population fragmentation and isolation.

Keywords: biodiversity at gene levele, forest game, forest management, microsattelites, molecular markers

* univ. dipl. inž. gozd., Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija; e-pošta: marko.bajc@yahoo.com

** dr., Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija; e-pošta: miran.cas@gozdis.si

*** dr., Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija; e-pošta: tine.grebenc@gozdis.si

**** prof. dr., Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, SI-1000 Ljubljana, Slovenija; e-pošta: hojka.kraigher@gozdis.si

Prispevek prvih dveh avtorjev je enakovreden.

UVOD

Spremembe v genomu so gibalo evolucije in nastanka novih taksonov v najširšem obsegu - od sevov, genetskih linij, vrst, pa vse do kraljestev in domen (Futuyma, 2009). Vsak organizem ima svojevrstne značilnosti dednega zapisa, ki ga ločijo od ostalih. Govorimo o t. i. genetskem podpisu, ki omogoča nedvoumno identifikacijo organizma na

vseh taksonomskih nivojih, tudi na nivoju osebka (Jeffreys in sod. 1984). Metode analize genetskega podpisa se med organizmi različnih kraljestev bistveno ne razlikujejo, nujen je le izbor ustrezno informativnih označevalcev.

Sposobnost preživetja in uspešnost populacije opisujemo s parametrom, imenovanim fitness, in je odvisna od genetske sestave populacije in dejavnikov okolja. Genetski fitness opredeljuje sposobnost preživetja in reprodukcije populacije (Orr, 2009). V splošnem velja, da je za dolgoročno uspešnost in preživetje populacije potrebna zadostna mera genetske pestrosti. Ta zagotavlja večjo zmožnost prilagajanja populacije na spremembe (podnebne spremembe, pojav novih bolezni ipd.) (Booy in sod., 2000). V sklopu analiz populacijske genetike lahko ugotovljamo različne kazalce genetske pestrosti in nevarnosti parjenja v sorodstvu (Griffiths in sod., 1998). Tako lahko identificiramo populacije, ki so zaradi nizke genetske pestrosti oz. genetske osiromašenosti dolgoročno bolj ogrožene in izpostavljene izumrtju. Za primer izpostavimo populacijo gamsa (*Rupicapra rupicapra* Linnaeus) v gorovju Chartreuse, ki kaže znake genetske osiromašenosti zaradi večkratnega zmanjšanja števila osebkov in geografske izolacije (Rodríguez in sod., 2010). Podobno so Segelbacher in sod. (2003) ter Segelbacher in Piertney (2007) dokazali prve znake zmanjševanja genetske pestrosti v izoliranih populacijah divjega petelina (*Tetrao urogallus* Linnaeus) v srednji Evropi, katerih številčnost v zadnjih desetletjih vztrajno in strmo pada (Storch, 2007; Čas, 1999; Čas, 2006; Purnat in sod., 2007). Stanje genetske ohranjenosti populacij divjega petelina v Sloveniji do sedaj še ni bilo preučeno. Glede na študije prostorske razširjenosti in številčnosti populacij pa lahko sklepamo, da je vrsta na območju ogrožena in podvržena drastičnemu zmanjševanju števila osebkov (Čas, 2001; Kutnar in sod., 2005; Čas, 2008; Čas,



Slika 1. Genetske analize lahko pripomorejo k razvoju ukrepov za trajnostno upravljanje s populacijami in habitatami ogroženega divjega petelina (*Tetrao urogallus* L.) (foto: Milan cerar)

2010a). Namen naloge je pregledati raziskave genetske pestrosti divjega petelina in izbranih vrst divjadi ter oceniti uporabnost genetskih analiz populacij gozdnih živali v Sloveniji, saj so genetske, filogenetske in filogeografske analize lahko pomemben vir informacij za učinkovito trajnostno upravljanje s populacijami in habitatami gozdnih živali, tudi divjadi, ter ohranjanje ogroženih živalskih vrst.

METODOLOGIJA

Prvi korak vseh genetskih analiz je vzorčenje ustreznega biološkega vzorca, ki vsebuje nukleinske kisline tarčnega organizma. Vzorčenje je za divjega petelina potekalo na področju celotne Slovenije na vseh registriranih rastiščih iz popisa leta 2000 (Čas, 2006; Bajc in sod., 2011). Vzorčili smo ves razpoložljiv material, primeren za genetske analize (Bajc in sod., 2011). Za primer gamsa smo vzorce pridobivali na lovskih odkupnih postajah, kjer smo za potrebe analiz odvzeli manjši del trebušnega mišičnega tkiva odstreljenih osebkov (Čas, 2010b).

V laboratoriju Oddelka za gozdno fiziologijo in genetiko (FIGE) Gozdarskega inštituta Slovenije smo uvedli protokole za ekstrakcijo celokupnih nukleinskih kislin iz različnih živalskih vzorcev, ki vključujejo vse vrste mehkih tkiv, iztrebke, kri, peresa (Horvath in sod., 2005) in dlake, membrane jajčnih lupin (Bush in sod., 2005) in tkiva prepariranih trofej in muzejskih primerkov. Zmožnost učinkovite ekstrakcije tarčnih nukleinskih kislin iz iztrebkov, slin, membran že izvaljenih jajc, dlak in peres omogoča, da vzorčenje opravimo neinvazivno, tj. brez fizičnega stika s preučevanimi živalmi in brez prekomernega vznemirjanja živali v naravnem okolju. Ekstrakcije DNK smo izvedli z uporabo predpripravljenih kompletov za ekstrakcijo nukleinskih kislin proizvajalca Mo-bio Laboratories (Carlsbad, ZDA) in postopkov, prilagojenih tipu vzorca (Bajc in sod., 2011). Postopek ekstrakcije sledi navodilom proizvajalca, pri čemer za ekstrakcijo DNK iz iztrebkov uporabljamo komplet PowerSoil® DNA isolation kit, iz vseh tkiv in krvi pa UltraClean® tissue & cells DNA isolation kit.

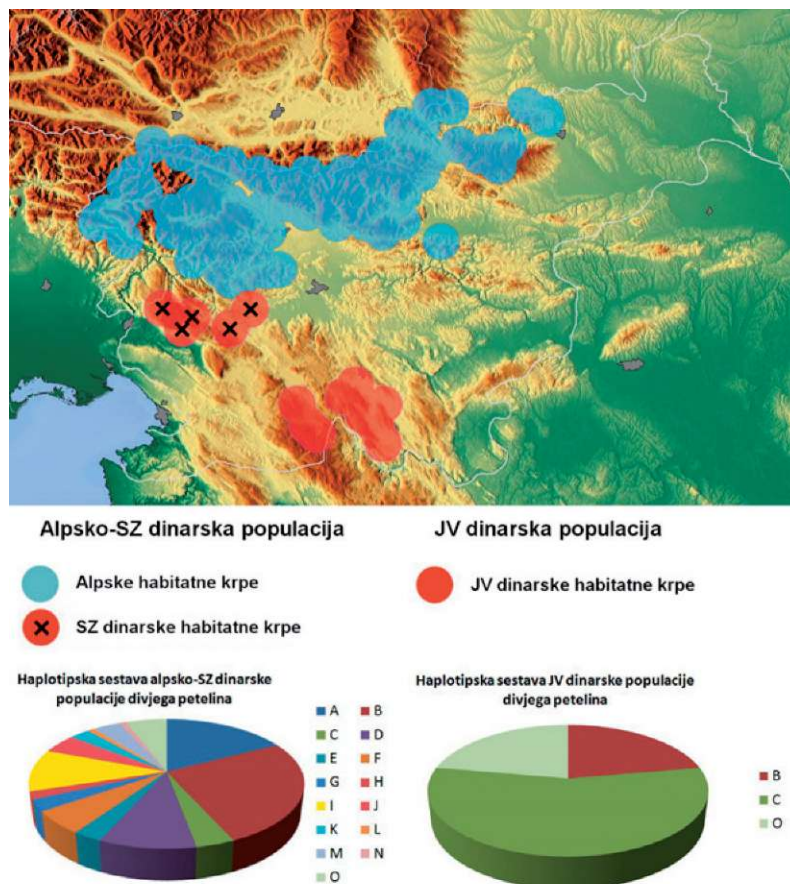
Naslednji korak genetskih analiz je pomnoževanje tarčnega nukleotidnega zaporedja, t. i. genetskih označevalcev, v reakciji pomnoževanja s polimerazo (PCR). Izbor genetskega označevalca je odvisen od namena genetskih raziskav. Med bolj uveljavljene spada analiza mikrosatelitov, ki ob ustreznem izboru označevalcev omogoča tudi ločevanje na nivoju osebka (Blouin in sod., 1996). Poleg analize mikrosatelitov so pogosteje uporabljane tudi analize genov za elongacijske faktorje, gena za citokrom b in nukleotidnih zaporedij različnih odsekov ribosomskega operona ter mitohondrijske DNK (mtDNK) (Lucchini in sod., 2001). Za filogeografske študije divjega petelina (Bajc in sod., 2011) pomnožujemo 435bp dolg odsek CRI

kontrolne regije mtDNK z začetnima oligonukleotidoma GalF in GalRi (Duriez in sod., 2007). Protokol pomnoževanja po Duriez in sod. (2007) smo modificirali z dodatkom petih t. i. »touch-down« predciklov (od 60 °C do 56 °C), ki izboljšajo specifičnost reakcije. Reakcije ugotavljanja nukleotidnega zaporedja s PCR pomnoženih tarčnih označevalcev za nas komercialno opravljajo v podjetju Macrogen inc. (Seul, Republika Koreja).

Analizo osnovnih kazalcev genetske pestrosti - število različnih haplotipov, k; število polimorfnihih nukleotidnih mest, S; nukleotidna diverziteteta, n (Nei, 1987; Tajima, 1983); haplotipska diverziteteta, H (Nei, 1987); homozigotnost, HO (Nei, 1987) - divjega petelina v Sloveniji smo izvedli s programom Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier in Lischer, 2010). Poleg analiz živalske mtDNK smo v laboratoriju FIGE razvili tudi standardne postopke za analizo drugih regij genoma oz. genetskih označevalcev in tudi drugih skupin organizmov (Grebenc in Kraigher, 2004).

REZULTATI IN DISKUSIJA

Analize genetskih označevalcev so pokazale obstoj dveh genetskih linij divjega petelina (*Tetrao urogallus* L.) v Evraziji - t.i. borealne linije in južne linije sensu Duriez in sod. (2007) (Segelbacher in sod., 2003 ; Duriez in sod., 2007; Rodríguez-Munoz in sod., 2007). Izsledki teh raziskav so spodbudili obsežnejšo analizo genetske diferenciacije divjega petelina na področju od slovenskih Alp, vzdolž Balkanskega polotoka do bolgarskih Rodopov, ki smo jo opravili na FIGE v obdobju od 2008 do 2010. Analizirali smo preko 400 vzorcev iztrebkov, peres in drugih tkiv in natančneje opredelili razširjenost in pojavnost obeh genetskih linij ter definirali zahodno kontaktno cono med linijama, ki poteka v centralnem delu Balkanskega polotoka. Vsi vzorci iz Slovenije sodijo v borealno linijo, pri čemer na tem področju obstaja prekinitev nekaj povezane alpsko-dinarske metapopulacije (Slika 2), kar pa se na nivoju kontrolne regije mtDNK še ne odraža značilno, saj obe populaciji izražata skupne haplotipe. JV dinarska populacija, ki je vezana na dinarski fito-geografski prostor, je v primerjavi z alpsko-SZ dinarsko populacijo (Čas, 2006) po številu osebkov in po številu prisotnih haplotipov siromašnejša (Preglednica 1), skupni aleli (aleli B, C in O) pa so v obeh populacijah med dominantnimi



Slika 2. Habitatne krpe alpsko-SZ dinarske in JV dinarske populacije divjega petelina (*Tetrao urogallus* L.) v slovenji - stanje ob popisu v zadnjih desetletjih 20. stoletja (čas, 2006) (zgoraj) in ugotovljeni haplotipi kontrolne regije mtDNK v celotni analizirani alpsko-sZ dinarski (levo spodaj) in Jv dinarski (desno spodaj) populaciji

(Slika 2). JV dinarska populacija tudi izraža skoraj trikrat višjo stopnjo homozigotnosti v primerjavi z Alpsko-SZ dinarsko populacijo (Preglednica 1). Širšo distribucijo genotipov, kot smo jo opazili tudi v Bajc in sod. (2011), avtorji razlagajo v odvisnosti od velikih poledenitev zadnje ledeno dobe (Segelbacher in sod., 2003; Duriez in sod., 2007; Rodríguez-Munoz in sod., 2007).

Genetske analize živali omogočajo opredelitev pripadnosti osebkov določeni podvrsti oz. ugotavljanje območja razširjenosti posamezne podvrste. V primeru divjega petelina rezultati genetskih analiz nasprotujejo in zavračajo tradicionalno delitev na 12 podvrst (de Juana, 1994), ki so bile opisane na osnovi razlik v morfologiji in vedenju, in nakazujejo, da je teh bistveno manj (Liukkonen-Anttila in sod., 2004; Segelbacher in Piertney, 2007). Na širšem območju Balkanskega polotoka genetske analize dokazujejo prisotnost dveh genetskih linij (Duriez in sod., 2007; Bajc

Preglednica 1. Indeksi genetske pestrosti populacij divjega petelina (*T. urogallus* L.) v Sloveniji: k - število različnih haplotipov; s - število polimorfnih nukleotidnih mest; n - nukleotidna diverziteteta; H - haplotipska diverziteteta; HO - homozigotnost; SD - standardna deviacija

Populacija	k	S	n ± SD	H ± SD	HO
Alpsko-SZ dinarska	15	13	0,0047 ± 0,0030	0,8757 ± 0,0179	0,1243
JV dinarska	3	3	0,0036 ± 0,0027	0,6667 ± 0,1318	0,3333



Slika 3. Analize populacijske genetike gamsa (*Rupicapra rupicapra* L.) v Sloveniji lahko razkrijejo vpliv osamitve in obseg le-tega na genetsko sestavo domnevno izoliranih populacij (foto: Peter čadež)

in sod., 2011).

Z rezultati genetske pestrosti divjega petelina lahko podpremo tudi predhodno izraženo potrebo po povezovanju trenutno ločenih območij razširjenosti alpsko-SZ dinarske in JV dinarske populacije na področju Slovenije ter ustreznega gospodarjenja z gozdnim prostorom potencialnih habitatov vrste (Čas, 2010a). S tem bi zagotovili kontinuiran pretok genov, pripomogli k boljši genetski strukturi in posledično dolgoročnemu preživetju obeh, sedaj ločenih populacij. Zlasti JV dinarska populacija je zaradi razdrobljenosti habitata, majhnega števila osebkov (Čas, 2006) in haplotipov ter višje homozigotnosti ogrožena z vidika zmanjševanja genetske pestrosti in potencialno tudi negativnih učinkov parjenja v sorodstvu.

Genetske analize populacij gamsa (*Rupicapra* spp.) so na Gozdarskem inštitutu še v začetnih fazah. Zbrali smo okoli 450 vzorcev tkiv za molekularne analize, ki so v teku. Število in distribucija vzorcev zadostuje za reprezentativno analizo vseh pomembnejših populacij in podpopulacij v Sloveniji (Čas, 2010b, c). Populacije gamsa so v Sloveniji najštevilčnejše v osrednjem alpskem habitatu, ki obsega Julijske Alpe, Karavanke z obrobni hribovjem, Kamniško Savinjske Alpe in Pohorje. Migracijska povezanost v teh območjih predvidoma omogoča dober pretok genov in posledično ohranjanje zadostne genetske pestrosti. Večje

nejasnosti o morebitnem vplivu fragmentacije habitatov na genetsko pestrost in viabilnost se potencialno pojavljajo v izoliranih habitatnih krpah v Zasavju, na Krimskem območju in ob Kolpi, kjer so migracijske poti vsaj delno prekinjene tudi z umetnimi pregradami, npr. z avtocestami. V do sedaj analiziranih populacijah gamsa v Sloveniji se izpostavlja predvsem problem zmanjšanja heterozigotnosti kot posledica razdrobljenosti in izoliranosti (Bužan in Kryštufek, 2010). Rezultati do sedaj opravljenih genetskih raziskav gamsov v Evraziji pa nakazujejo, da je današnja diverzifikacija in subspeciacija predvsem posledica krčitve habitata in geografske izolacije v času poledenitev in križanj izvornih genetskih linij v času razširitve habitata ter da delitev rodu na dve vrsti (*Rupicapra pyrenaica* Bonaparte in *Rupicapra rupicapra* L.) ni povsem jasna in nedvoumna (Rodríguez in sod., 2009; Rodríguez in sod., 2010).

Genetske raziskave imajo v analizah gozdnih živali široke možnosti uporabe. Rezultati analiz divjega petelina nakazujejo na nujnost ohranjanja in zagotavljanja primernih in ustrezno razporejenih habitatov s ciljem povezovanja trenutno ločenih populacij, saj le tako lahko ohranimo zadostno genetsko pestrost in posledično viabilnost populacij. Pričakujemo, da bomo na osnovi podrobne analize na lokalnem nivoju lahko sklepali tudi na stanje populacij in morebitne ukrepe za gospodarjenje z gamsom, za katerega je značilno, da se v več področjih pojavlja v izrazito osamelih habitatnih krpah.

Nadaljnje možnosti uporabe vpeljanih pristopov so na primer identifikacija povzročiteljev plenjenja drobnice v Sloveniji, ki naj bi ga zagrešili volkovi (Černe in sod., 2010; Dolf in sod., 2000; Scandura in sod., 2006). Molekularni pristopi lahko pripomorejo tudi pri ugotavljanju prisotnosti in razširjenosti genetskih bolezni in povzročiteljev okužb v populacijah prostoživečih gozdnih živali (Liz in sod., 2002; Marco in sod., 2009; De Nardi in sod., 2005; Depner in sod., 2006). Rutinskih testov za genetske bolezni gozdnih živali se trenutno še ne izvaja, čeprav so postopki za tovrstne analize za nekatere vrste, npr. domače pse (Optigen®, 2011), že razviti. Ravno tako molekularni pristopi še niso nadomestili seroloških in klasičnih mikrobioloških preiskav (Pravilnik o boleznih živali, 2007) okuženosti populacij gozdnih živali s povzročitelji različnih bolezni (Vengust in sod., 2006b), tudi takih, ki predstavljajo nevarnost prenosa na

ljudi in gospodarsko pomembne domače živali (Meng in sod., 2009) in posledično povzročitev gospodarske škode, kot sta na primer klasična prašičja kuga (Vengust in sod., 2006a) in Aujeszkijska bolezen (Capua in sod., 1997; Vengust in sod., 2005). Možnosti za vpeljavo in uporabo molekularnih pristopov je še mnogo, njihova vpeljava pa bo, tako kot na primeru sodelovanja pri analizah divjega petelina in gamsa, nujno vključevala predloge in potrebe več vpletenih inštitucij in končnih uporabnikov.

ZAHVALA

Raziskave so finančno podprli: Programska skupina P4 0107 (Gozdna biologija, ekologija in tehnologija) in projekti CRP V4-0492 ter Zavod za gozdove Slovenije in Triglavski Narodni Park prek Pogodbe o sodelovanju pri vzorčenju (2008-2011) ter Lovska zveza Slovenije prek zbiranja vzorcev v lovskih družinah, zlasti v izoliranih populacijah in posebnih habitatih, večinoma prostovoljno in zastonj. Posebno zahvalo izrekamo Miru Hladetu, Tomažu Šlibarju in Milanu Jakiču iz podjetja za odkup divjačine Nimrod d.o.o., ki so nam omogočili odvzem čez 400 vzorcev tkiv gamsa.

VIRI

- Bajc M., čas M., Ballian D., Kunovac S., Zubić G., Grubešić M., Zhelev p., paule L., Grebenc T., Kraigher H. (2011) Genetic differentiation of *Tetrao urogallus* L. highlights the importance of South-Eastern Europe for understanding phylogeography of the species. - Public Library of Science (oddano)
- Blouin M.S., parsons M., Lacaille v., Lotz s. (1996) Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular ecology*, 5: 393-401
- Booy G., Hendriks R.J.J., smulders M.J.M., van groenendael J.M., vosma B. (2000) Genetic Diversity and the Survival of Populations. *Plant biology*, 2: 379 - 395
- Bush K.L., vinsky M.D., Aldridge c.L., paszkowski c.A. (2005) A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of greater sage-grouse (*Centrocercus urophasianus*). *Conservation genetics*, 6: 867-870
- Bužan E.v., Kryštufek B. (2010) Ohranjanje gamsa tudi s pomočjo genetike. *Lovec*, 93: 364-365
- capua I., casaccia c., calzetta G., caporale v. (1997) Characterisation of Aujeszky's disease viruses isolated from domestic animals and from a wild boar (*Sus scrofa*) in Italy between 1972 and 1995. *Veterinary Microbiology*, 57: 143-149
- čas M. (1999) Spatial endangerment of capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) populations in Slovenia in 1998. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 60: 5-52
- čas M. (2001) Divji petelin v Sloveniji - indikator devastacij, rabe, razvoja in biodiverzitete gorskih gozdnih. *Gozdarski vestnik*, 59: 411-428
- čas M. (2006) Fluctuation of capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) population in relation to past land use and forest structures in the South-East Alps. University of Ljubljana, 263
- čas M. (2008) Capercaillie monitoring is an important tool for observing changes in boreal forest ecosystems, but introduction of a hunting ban in the Slovenian Alps has highlighted certain problems. *Grouse news*, 35: 16-20
- čas M. (2010a) Disturbances and predation on Capercaillie at leks in Alps and Dinaric mountains. *Šumarski list*, 134, 9/10: 487-495
- čas M. (2010b) Ogrožen osameli habitat gamsa med Starim trgom in Predgradom nad Kolpo. *Lovec*, 93: 221-222
- čas M. (2010c) Raziskave spreminjanja habitatov in genetske pestrosti nekaterih domorodnih vrst (divjji petelin, gams, volk). *Lovec*, 93, 4, 195-197
- černe R., Jerina K., Jonozovič M., Kavčič I., stergar M., Krofel M., Marenče H. (2010) Škode od volkov v Sloveniji: analiza v okviru projekta Life+ SloWolf Akcija A4. Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Ljubljana, 20
- de Juana E. (1994) Family Tetraonidae. V: *Handbook of the birds of the World*. del Hoyo J (Ur.), Elliot A (Ur.), Sargatal J (Ur.), Lynx Edicion, Barcelona, 376-410
- de Nardi R., Terregino c., cattoli G., Toffan A., Beato M.s., Guberti v., scremin M. (2005) Preliminary results of an influenza surveillance in wild birds, game birds, domestic ducks and geese in North Eastern Italy. *Italian Journal of Animal Sciences*, 4: 292-295
- depner K., Bunzenthal c., Heun-Münch B., streblow G., Hoffmann B., Beer M. (2006) Diagnostic evaluation of a real-time RT-PCR assay for routine diagnosis of classical swine fever in wild boar. *Journal of Veterinary Medicine*, B53: 317-320
- dolf G., schläpfer J., Gaillard c., Randi E., Lucchini v., Breitenmoser u., stahlberger-saitbekova N. (2000) Differentiation of the Italian wolf and the domestic dog based on microsatellite analysis. *Genetics, Selection, Evolution*, 32: 533-541
- duriezo., sachet J.M., Menoni E., Miquel c., Taberlet p. (2007) Phylogeography of the capercaillie in Eurasia: what is the conservation status in the Pyrenees and Cantabrian mounts? *Conservation Genetics*, 8: 513-526
- Excoffier L., Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567
- Futuyma D.J. (2009) *Evolution*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 633
- Grebenc T., Kraigher H. (2004) Molekularna analiza bioloških vzorcev : SOP FIGE MET 001 : velja od 01.03.2004. Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, 10
- Griffiths A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.c., Gelbart W.M. (1998) *An introduction to genetic analysis*. New York: W. H. Freeman, 726-727
- Horvath M.B., Martfnez-Ouz B., Negro J.J., Kalmar L., Godoy H.A. (2005) An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of avian biology*, 36: 84-88
- Jeffreys A.J., Wilson v., Thein s.W. (1984) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73
- Kutnar L., Urbančič M., čas M. (2005) Preservation of forest soil and vegetation in the Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) habitat within the eastern Karavanke region in the eastern Kamnik-Savinja Alps in Slovenia. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 77: 5-42
- Liukkonen-Anttila T., Rätti O., Kvist L., Helle p., Orell M. (2004) Lack of genetic structuring and subspecies differentiation in the capercaillie (*Tetrao urogallus*) in Finland. *Ann Zool Fenn*, 41: 619-633
- Liz J.s., sumner J.W., pfister K., Brossard M. (2002) PCR Detection and Serological evidence of Granulocytic Ehrlichial Infection in Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and Chamois (*Rupicapra rupicapra*). *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 892-897
- Lucchini v., Höglund J., Klaus s., swenson J., Randi E. (2001) Historical biogeography and a mitochondrial DNA phylogeny of grouse and ptarmigan. *Molecular phylogenetics and evolution*, 20: 149-162
- Marco I., Rosell R., cabezon O., Mentaberre G., casas E., velarde R., Lavfn s. (2009) Border disease virus among chamois, Spain. *Emerging infectious diseases*, 15: 448-450

31. Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N. (2009) Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Biological Sciences*, 364:2697-2707
32. OptiGen - Tests offered - Canine genetic testing. Optigen®, LLC. (1.4.2011) http://www.optigen.com/opt9_test.html (6.5.2011)
33. Orr H.A. (2009) Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics*, 10: 531-539
34. Pravilnik o boleznih živali (2007) Uradni list Republike Slovenije, 81/7.9.2007: 11096-11142 in Uradni list Republike Slovenije, 24/22.3.2010: 3206-3215
35. Purnat Z., čas M., Adamič M. (2007) Problematika ohranjanja habitata divjega petelina *Tetrao urogallus* na Menini (osrednja Slovenija) in vpliv pašništva. *Acrocephalus*, 28, 134: 105-118
36. Rodríguez F., Hammer S., Pérez T., Suchentrunk F., Lorenzini R., Michallet J., Martinkova N., Albornoz J., Domínguez A. (2009) Cytochrome b phylogeography of chamois (*Rupicapra* spp.). Population contractions, expansions and hybridizations governed the diversification of the genus. *Journal of Heredity* 100: 47-55
37. Rodríguez F., Pérez T., Hammer S., Albornoz J., Domínguez A. (2010) Integrating phylogeographic patterns of microsatellite and mtDNA divergence to infer the evolutionary history of chamois (*genus Rupicapra*). *Evolutionary biology*, 10: 222-240
38. Rodríguez-Munoz R., Mirol P.M., Segelbacher G., Fernandez A., Tregenza T. (2007) Genetic differentiation of an endangered capercaillie (*Tetrao urogallus*) population at the Southern edge of the species range. *Conservation Genetics*, 8: 659-670
39. Scandura M., Capitani C., Iacolina L., Marco A. (2006) An empirical approach for reliable microsatellite genotyping of wolf DNA from multiple noninvasive sources. *Conservation Genetics*, 7: 813-823
40. Segelbacher G., Høglund J., Storch I. (2003) From connectivity to isolation: genetic consequences of population fragmentation in capercaillie across Europe. *Molecular Ecology*, 12: 1773-1780
41. Segelbacher G., Piattney S. (2007) Phylogeography of the European capercaillie (*Tetrao urogallus*) and its implications for conservation. *Journal of Ornithology*, 148: 269-274
42. Storch I. (2007) Grouse: Status survey and conservation action plan 20006-2010. IUCN, Gland/World Pheasant association, Fordingbridge, 114
43. Vengust G., Grom J., Bidovec A., Kramer M. (2006a) Monitoring of Classical Swine Fever in Wild Boar (*Sus scrofa*) in Slovenia. *Journal of Veterinary Medicine*, B53: 247-249
44. Vengust G., Valenčak Z., Bidovec A. (2005) Presence of Antibodies Against Aujeszky's Disease Virus in Wild Boar (*Sus scrofa*) in Slovenia. *Journal of Wildlife Diseases* 41: 800-802
45. Vengust G., Valenčak Z., Bidovec A. (2006b) A Serological Survey of Selected Pathogens in Wild Boar in Slovenia. *Journal of Veterinary Medicine*, B53: 24-27