



Genetisk undersökning av spillning med avseende på genetiskt ursprung och hybridisering med hund

Hybridisering mellan varg och hund är fullt möjlig och har dokumenterats ske i det vilda. Här undersöks DNA från tre spillningar (från två individer) i avseende på om de kan komma från första eller andra generationens hybrider.

Bakgrund

Vargar är kapabla att hybridisera med flera arter inom hunddjursfamiljen, däribland hundar. Det finns ett flertal genetiska studier av förekomst och omfattning av hybridisering mellan varg och hund i det vilda (se Wayne och Vilá 2003). Ett fåtal hybrider har identifierats med genetiska markörer i Lettland (Andersone m.fl. 2002) och i Skandinavien (se Vilá m.fl. 2003). I dessa fall rörde det sig om individer som utifrån deras utseende var misstänkta hybrider. Dessutom visar andra studier att hybridisering skett i begränsad omfattning i Bulgarien (Randi m.fl. 2000), Italien (Verardi 2006) och på Iberiska halvön (Wayne och Vilá 2003, Godinho m.fl. 2011).

Den vanligaste metoden för att identifiera hybrider samt förekomst av introgression (d.v.s. när hybrider genom tillbakakorsning för över gener från en art/population till en annan) är användandet av genetiska markörer från autosomalt DNA, men även mitokondriella DNA samt DNA från Y-kromosomen för att utröna vilken art föräldraren tillhör (se Vila m.fl. 2003). Den absoluta majoriteten av arvsmassan utgörs av autosomalt DNA där varje individ bär på två homologa uppsättningar som nedärvs från fadern respektive modern. Eftersom en individ endast ärver hälften av respektive förälders arvsmassa, så sker det efter hybridisering, med efterföljande återkorsning med varg, en halvering av arvet från hund för varje generation. Genom att uppskatta en vargs genetiska likhet med hund relativt andra "rena" vargar kan man alltså uppskatta i vilken utsträckning en varg bär på en större andel hundtypiskt DNA än vad som förväntas av en ren varg och i viss mån även uppskatta i vilken generation en eventuell hybridisering skett.

För att undersöka spillningarnas härkomst används PCR-baserade metoder för att ta fram den genetiska variationen på autosomala mikrosatelliter och SNPs samt delar av mitokondriellt DNA (mtDNA). Denna genetiska information jämförs med genotyperna från vargar, hundar samt hybrider dem emellan. Ett genetiskt referensmaterial från varg (se nedan) och hund finns tillgängligt men eftersom det saknas genetiskt material från korsningar dem mellan användes simulerade hybrider och tillbakakorsningar, vilkas genotyper togs fram utifrån tillgänglig genetisk information från vargar och hundar.

En förutsättning för att kunna identifiera hybrider är att det finns en observerbar genetisk skillnad (d.v.s. skillnad i allelfrekvenser) mellan de hybridiserande populationerna. Den genetiska differentieringen mellan varg och hund uppskattades därför med bland annat F_{ST} (Weir och Cockerham 1984). Differentieringen kan variera mellan $F_{ST} = 0$ (ingen genetisk skillnad) och $F_{ST} = 1$ (total genetisk isolering). Genetisk differentiering avgör ifall det är möjligt att identifiera hybrider och med ökad differentiering ökar både säkerheten och möjligheten att identifiera hybridiseringar längre bak i generationerna.

För att undersöka om spillningsproven kommer från hybrider gjordes en Bayesiansk klusteranalys med programmet STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard et al 2000) där individerna grupperas helt eller delvis till varg eller hund. Med hundar och vargar separerade i två olika genetiska kluster kommer en "ren" varg eller hund tydligt grupperas med ettdera klustret medan en individ med blandad härkomst kommer att grupperas mer eller mindre markant med båda klustren. En nackdel med Bayesiansk analys är att den statistiska säkerhetsgraden inte går att uppskatta. Därför används

istället tröskelvärden för att bedöma om en individ är hybrid eller inte. För att få en uppfattning om hur stor andel korrekta bedömningar ett visst tröskelvärde ger kördes simulerade hybrider i STRUCTURE på samma sätt som de observerade genotyperna. Dessutom uppskattades mer detaljerade sannolikheter för genotyperna att komma från specifika hybridklasser eller "rena" populationer med NEWHYBRIDS 1.1 (Anderson och Thompson 2002)

En liten del av organismers arvsmassa nedärvs enbart från modern. Denna del av arvsmassan finns i cellernas mitokondrier och kallas mitokondriellt DNA (mtDNA). Mitokondrier är organeller med central roll i cellens ämnesomsättning. Genetisk variation både inom och mellan olika hunddjursarter finns i den mitokondriella arvsmassan och då framförallt på kontrollregionen som är s.k. skräp-DNA på mtDNA-kedjan. Samma variant av kontrollregionen finns dock oftast antingen hos vargar eller hos hundar men sällan hos båda arterna. Förekomsten av en hundtypisk variant i en vild vargpopulation indikerar alltså att hybridisering kan ha skett. Det går dock inte utifrån enbart mtDNA att säga hur många generationer tillbaka en eventuell hybridisering skett. Dessutom avslöjar mtDNA endast de hybridiseringstillfällena då den hybridiserande hunden var en tik. Spillningarna har sekvenserats för med en markör på kontrollregionen och jämförts med vargar och hundar från egna referensmaterial.

Material och metoder

Totalt tre spillningar insamlade i Södermanlands län analyserades: SEP0020759, SEP0020765 och SEP0123573 (Tabell 1).

Tabell 1. Insamlingsdata för tre spillningsprov som samlats in Södermanlands län.

<i>Prov-ID</i>	<i>Insamlingsdatu m</i>	<i>Material</i>	<i>Insamlare</i>	<i>Y-koordinat (RT90)</i>	<i>X-koordinat (RT90)</i>
SEP0020759	2017-09-26	Spillning	Alf Lettesjö	6557650	569859
SEP0020765	2017-09-26	Spillning	Lovisa Häggström	6556060	571356
SEP0123573	2017-09-29	Spillning	Alf Lettesjö	6556051	570986

För att testa ursprunget för de fyra vargarna har referensprov från varg och hund använts, varav

- 149-150 vargar från den Skandinaviska vargpopulationen
- 51 vargar från Finland eller västra Ryssland.
- 29 hundar (hårprov) från 16 olika raser (Australian Shepard, Blandras (5st), Borderterrier, Boxer (2st), Holländsk Herdehund, Hovawart, Jämthund (3st), Labrador (3st), Labrador Retriever, Risenschnauzer, Rottweiler (2st), Schillerstövare, Schweizisk Sennerhund, Schäfer (2st), Skotsk Hjorthund, Vorsteh) och 5 olika typer av blandraser.

För att uppskatta om spillningarna kommer från avkommor eller ättlingar till hund togs genotypen för 90 autosomala SNPs samt 27 autosomala mikrosatelliter fram med hjälp av PCR. Dessa utgjordes av 20, 123, 225, 250, 253 (Ostrander et al. 1993), 2001, 2010, 204, 2006, 2054, 2079, 2096, 2137, 2140, 2201 (Francisco et al. 1996), AHT002, AHT004, AHT101, **AHT106** (Holmes et al. 1993), AHT103, AHT119, AHT121, AHT126, AHT138 (Holmes et al. 1995), Vwf (Shibuya et al. 1994), PEZ03 och PEZ06 (Neff et al. 1999). Reaktionslösningen för PCR var 10 µl och innehöll 1-2 µl templatlösning (25 ng DNA/ µl), 2 u Taq DNA polymeras, 1 µM primer (forward och reverse), 1.25 mM dNTPs, 1 µl 10X PCR buffert och 2.5-5 mM MgCl₂. PCR-reaktionen utgjordes av en inledande denatureringsfas på 95°C i 10 minuter, följt av 35 cykler med 95°C i 30 s, 50-60°C i 90 s och 72°C i 90 s, och avslutningsvis en elongeringstid på 72°C i 10 minuter.

Könsbestämning gjordes dels genom analysen av en mikrosatellitmarkör (MS41B, Sundqvist m.fl. 2001) bunden till Y-kromosomen .

För varje markör gjordes PCR på fyra replikat av spillningsproven, en negativ kontroll och en referens. PCR-produkterna separerades och visualiserades genom kapillär elektrofores med en ABI3730XL (Applied Biosystems). Detta utfördes av Uppsala Genome Center (Rudbecklaboratoriet, 751 85 Uppsala). Alleler bestämdes med Genemapper 4.0 (Applied Biosystems) och kontrollerades manuellt.

Mitokondriellt DNA nedärvs maternellt, vilket innebär att mitokondriella markörer avslöjar moderslinjens ursprung. Förekomsten av en hund-specifik haplotyp på mitokondrien hos en förmodad varg skulle alltså indikera att en hund-tik en till flera generationer tillbaka reproducerat sig med en varg. Av denna anledning har ett kort fragment (192 baspar) på kontrollregionen (position 15525-15716 på DQ480503 i GenBank) amplifierats med primers 4F (TCA GTA TCT CCA GGT AAA CC) and 4R (GAG GGA CAT TAC GAG CAA). Kontrollregionen utgör den mest variabla regionen på mitokondriellt DNA (mtDNA) och lämpar sig särskilt vid särskiljningen mellan närbesläktade arter och populationer. Haplotyperna från spillningarna jämfördes med erhållna sekvenser från referensproverna (se ovan).

Genetisk variation och differentiering mellan referenspopulationerna

För att kunna identifiera hybrider mellan olika källpopulationer m.h.a. autosomala SNPs eller mikrosatelliter krävs det att populationerna skiljer sig åt genetiskt (d.v.s. mikrosatelliterna bär på alleler med olika frekvens mellan populationerna). Den genetiska differentieringen mellan hund och varg (samt mellan de olika populationerna av varg) uppskattades med parvis F_{ST} (Weir and Cockerham 1984) tillsammans med 95% konfidensintervall från 100 bootstraps i Genetix 4.05. En grafisk visualisering av den genetiska differentieringen mellan hundar och varg gjordes med FCA (Factorial Correspondence Analysis) i Genetix 4.05 (Belkhir m.fl. 2004).

För att uppskatta vilken av de referenspopulationerna Skandinavisk varg, Finsk-Rysk varg och hund som bäst förklarar genotypen för respektive spillning samt hur sannolikt det är att genotypen skulle påträffas hos en avkomma från respektive referenspopulation uppskattades med ett s.k. grupperingstest. Testet bygger på principen att det är mer sannolikt att en individ härstammar från en population där allelerna som individen bär på är vanligt förekommande. Den samlade sannolikheten (L_i) att en individ bär på en viss uppsättning alleler baseras på allfrekvenserna i respektive ursprungspopulation i . Förutsatt att allelfrekvenserna skiljer sig mellan de olika populationerna kommer därmed populationen i med högst L_i utgöra den mest sannolika ursprungspopulationen. Alla analyser gjordes i GeneClass2 (Piry m.fl. 2004) med uträkning av L_i i enlighet med Rannala och Mountain (1997). Notera att vi med denna metod endast tar reda på med vilken population en genotyp passar bäst bland de inbördes jämförda populationerna. Det utesluter därmed inte att individen härstammar från en population varifrån prover saknas i jämförelsematerialet.

För att kunna utesluta populationstillhörighet användes ett permuteringstest (Paetkau m.fl. 2004), vilket innebär att genotyper simulerades fram i respektive population, efterföljt av uträkningen av L_i för varje simulerad genotyp. Verkliga genotyper vars L_i ligger utanför 99 procent av den simulerade fördelningen av L_i -värden definierades att med signifikant sannolikhet sägas inte tillhöra populationen i fråga.

STRUCTURE-analys

För att undersöka huruvida en individ bär på genetiskt material från både varg och hund eller bara en av dem utfördes en modellbaserad klusteranalys med programmet STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al 2000). Analysen är individbaserad och bygger på att gruppera individer helt eller delvis till ett förbestämt antal genetiska kluster (K). Efter att ha hört modellen utgör klustren utgör grupper av individer (eller snarare delarna av individernas arvsmassa) som, utifrån det givna antalet kluster (K), troligast kommer från samma population. Genom att definiera antalet kluster till $K=2$ kommer vargar och hundar att gruppera till separata kluster. Med hundar och vargar separerade i två olika kluster kommer en hybrid att visa mindre markant gruppering till någon av klustren. Värdet q_i anger andelen av en individs arvsmassa som beräknas härstamma till kluster i . Med genotyperna från spillningarna bestämdes deras genetiska härkomst med avseende på hund och varg genom att uppskatta q_i och felmarginalen hos q_i (med s.k. kreditabilitetsintervall). Båda modellerna replikerades fem gånger med samma slutsats. Därför rapporteras bara ett av replikaten för respektive modell.

För att få en uppfattning hur effektivt hybrider och individer från föräldrapopulationerna kan identifieras användes simulerade scenarion där olika hybridklasser "skapades" i Hybridlab 1.0 (Nielsen et al 2006). Baserat på allelfrekvenserna hos 29 genotyper från hund (H) och 150 genotyper från Skandinavisk varg (V) simulerades:

- 500 genotyper av första generationens hybrider (F1) mellan H och V
- 500 tillbakakorsningar mellan F1 och varg (F1xV)
- 500 tillbakakorsningar mellan F1 och hund (F1xH)

Med $K=2$, användes STRUCTURE för att bestämma de simulerade individernas ursprung. Med ett $q_i > 0.65$ bedömdes individen komma från föräldrapopulationen i , medan ett $q_i < 0.65$ innebar att individen bedömdes som hybrid. Med de simulerade individernas sanna härkomst beräknades andelen korrekta bedömningar. Denna andel ger en indikation på hur effektivt det går att identifiera hybrider av olika klasser (F1, F2, F1xVi and F1xH).

NEWHYBRIDS-analys

Ytterligare en metod för att undersöka huruvida en individ tillhör en blandad stam mellan varg och hund är en modellbaserad (Bayesiansk) grupperingsmetod som utförs med programmet NewHybrids 1.1. (Anderson och Thompson 2001). Istället för att gruppera alleler och genotyper till två kluster erbjuder denna metod möjligheten att beräkna inbördes sannolikheter för att individen tillhör en viss föräldrapopulation eller hybridklass. Notera att sannolikheterna endast går att jämföra inbördes i det paret av populationer som undersöks. I likhet med STRUCTURE-analysen användes simulerade genotyper för att uppskatta andelen korrekta bedömningar av bestämningarna utifrån de inbördes sannolikheterna.

Resultat

De tre spillningsproven gav resultat på både mikrosatelliter och SNPs. SEP002059 och SEP0123573 hade identiska genotyper på de autosomala markörerna, vilket indikerar att spillningarna kom från samma individ. Av denna anledning användes endast SEP002059 och SEP0020765 i analyserna med avseende på hybridisering. I samtliga fall visade proven på förekomsten PCR-produkter från Y-kromosomen, vilket indikerar att båda individerna är hanar. I analysen av 90 SNPs erhöles resultat på 87 markörer för SEP0020759 och SEP0020765. Av 27 analyserade autosomala mikrosatelliter erhöles resultat på 27 respektive 26 markörer för SEP0020759 och SEP0020765.

SNP

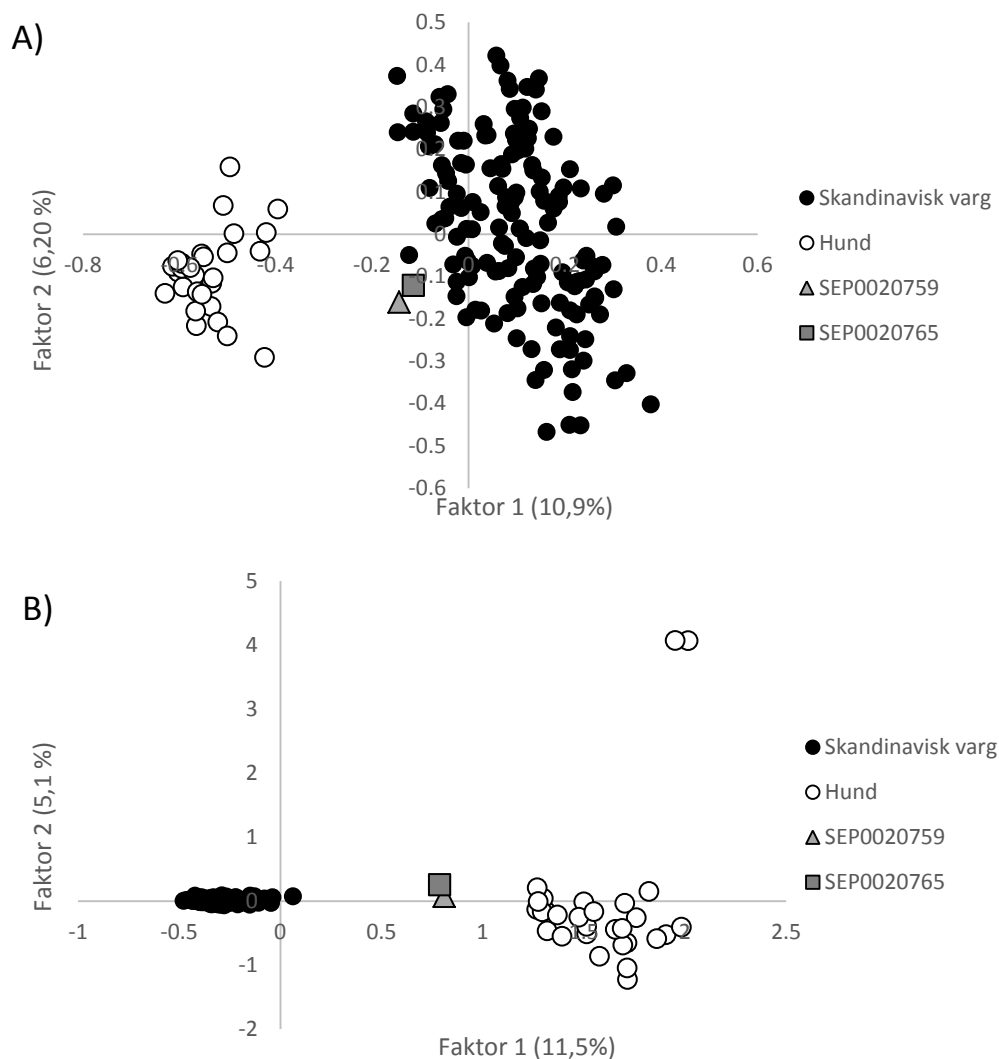
Den genetiska differentieringen på 90 SNPs mellan varg och hund var 0.151 (95% Konfidensintervall: 0.098 - 0.203), vilket indikerar att det finns genetiska skillnader på SNP mellan de två referenspopulationerna.

I ett grupperingstest med programmet GeneClass2 visade båda proven en signifikant avvikelse från den Finsk-Ryska vargpopulationen. Även om det inte gick att utesluta Skandinavisk varg eller hund gick det heller inte att särskilja mellan dessa populationer baserat på LogL (Tabell 2).

Tabell 2. Antal fungerande markörer och logaritmerade likelihood (logL)-värden för grupperingstest av angivna prov. Det minst negativa värdet antyder bäst passning och en skillnad på över tre indikerar signifikant skillnad.

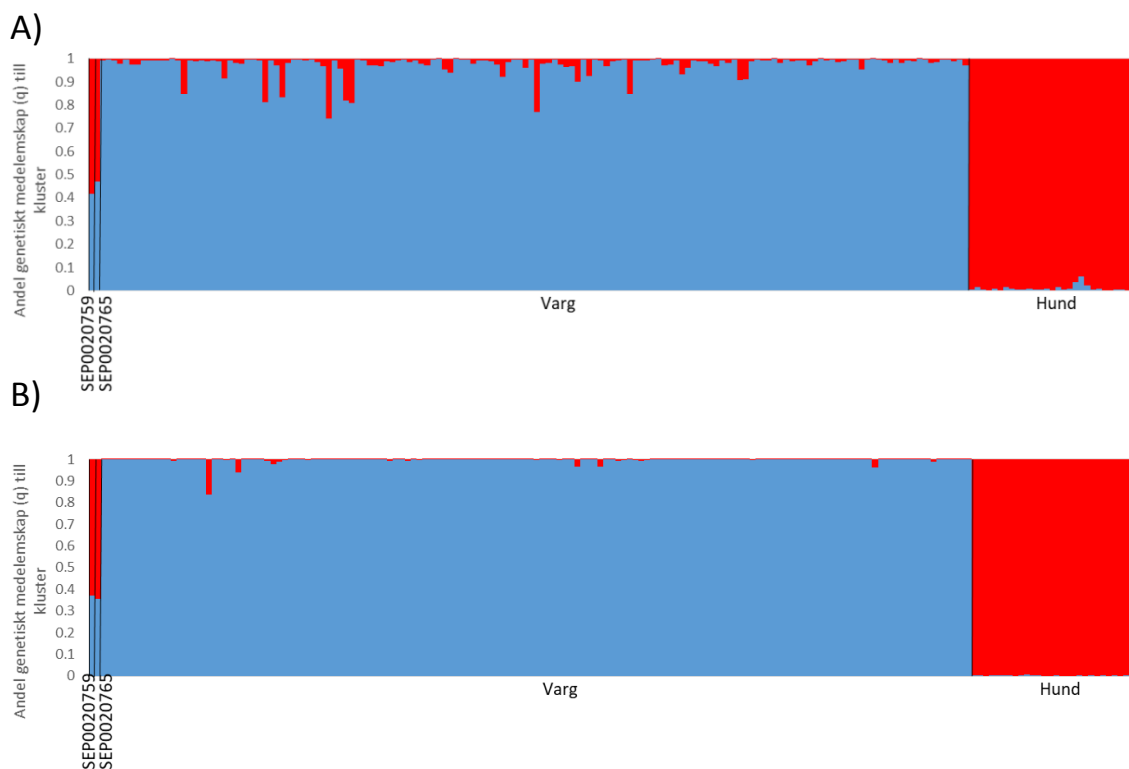
Prov	Antal markörer	LogL		
		Skandinavisk varg	Finsk-Rysk varg	Hund
<i>SNP</i>				
SEP0020759	87	-42,3	(-51,7)	-42,4
SEP0020765	87	-41,2	(-54,3)	-42,9
<i>Mikrosatelliter</i>				
SEP0020759	27	(-64,9)	(-52,8)	(-53,7)
SEP0020765	26	(-62,1)	(-50,2)	(-49,6)

Den genetiska skillnaden mellan varg och hund är tydlig även vid plottning med hjälp av FCA (Factorial Correspondence Analysis; Figur 1A). Den genetiska variationen mellan individerna delas då upp i två (eller flera) oberoende komponenter (faktorer) som bäst förklarar den genetiska variationen bland individerna. Som kan ses i Figur 1A finns det inget överlapp mellan varg och hund i faktor 1 (som förklarar 10,9% av den genetiska variationen). De två spillningsproven visade ingen tydlig gruppering med någon av populationerna även om de positionerades närmare den Skandinaviska vargpopulationen än hundarna.

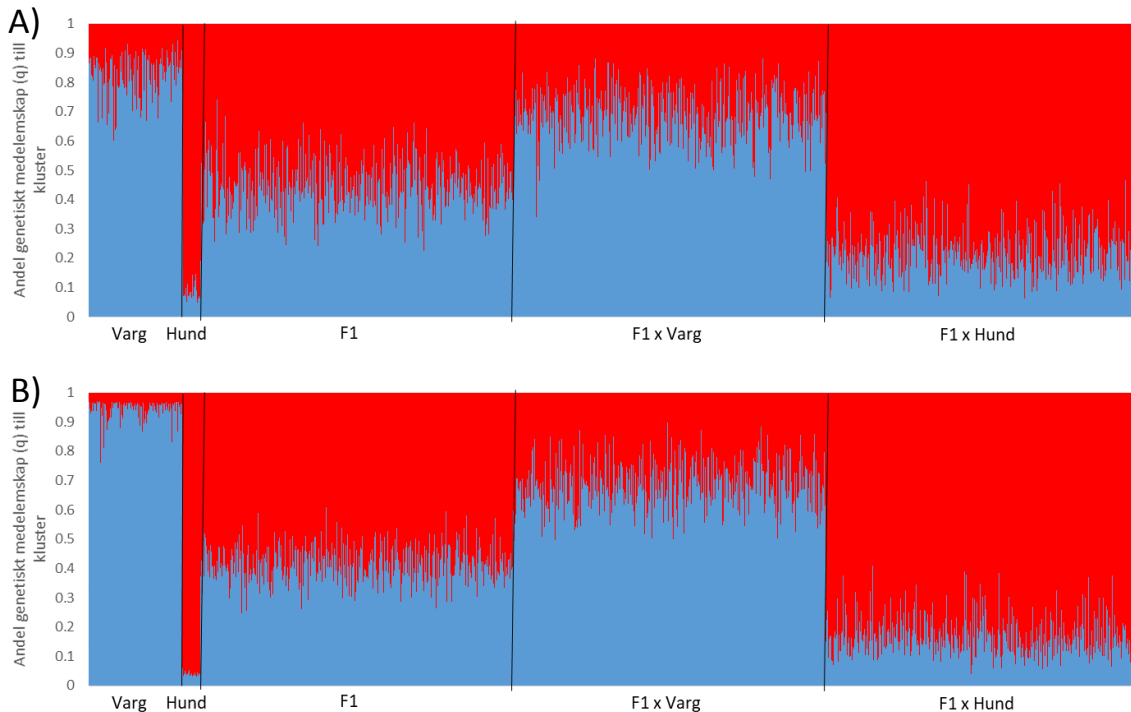


Figur 1. Gruppering av de analyserade genotyperna från hundar och vargar med FCA (Factorial Correspondence Analysis) and A) 90 SNPs och B) 27 mikrosatelliter. Faktor 1 och 2 är de komponenter av den genetiska variationen bland markörerna som förklarade den mesta variationen bland de analyserade individerna.

Analysen i STRUCTURE med hundar och vargar som referenspopulationer visade på en gruppering av varg respektive hund, populationerna (Figur 2A), om än något otydligare än motsvarande gruppering med mikrosatelliter (Figur 2B, se nedan). Bland hundarna var medelmedlemskapet till hundklustret $Q_2 = 0,988$. Vargarnas medelmedlemskap till vargklustret var $Q_1 = 0,973$. Spillningarna visade ingen tydlig gruppering med varken varg eller hund $q_1 = 0,416$ för SEP002759 och $q_1 = 0,469$ för SEP002765 (Figur 2A, Tabell 3B).



Figur 2. Gruppering till genetiskt kluster utifrån A) 90 SNPs och B) 27 mikrosatelliter uppskattade med STRUCTURE-analys med $K = 2$ utan någon förhandsinformation om populationstillhörighet för två spillningsprov tillsammans med hundar och Skandinaviska vargar



Figur 3. Gruppering till genetiskt kluster utifrån A) 90 SNPs och B) 27 mikrosatelliter uppskattat med STRUCTURE-analys med $K=2$ utan förhandsinformation om populationstillhörighet för Skandinaviska vargar och hundar tillsammans simulerade F1, och återkorsningar mellan F1 och hund (F1xH) samt mellan F1 och varg (F1xV).

STRUCTURE-analysen av referensproven från varg och hund tillsammans med de simulerade genotyperna över F1, F1xH och F1xV visade att föräldrapopulationerna grupperades korrekt till 98 % och 100% av fallen för vargar respektive hundar då ett tröskelvärde på $q_i > 0,65$ användes (Figur 3A). För F1-hybriderna var medelmedlemskapet $q_i = 0,467$ och $q_i > 0,65$ i 2.2% av fallen. För F1xH och F1xV var medelmedlemskapet $q_i = 0,765$ (till hundklustret) respektive 0,709 (till vargklustret). I 76% respektive 90% av fallen var $q_i > 0,65$ och därmed bestämda till en av föräldrapopulationerna. Detta indikerar alltså att förmågan att detektera en återkorsning är avsevärt lägre för tillbakakorsningar än för F1- hybrider.

Med analysen i NewHybrids av 90 SNPs visade simuleringen att endast 61% samt 62% av alla vargar och hundar grupperades korrekt med respektive föräldrapopulation med ett tröskelvärde på $p = 0,65$. Ingen av de simulerade F1:orna och hybridåterkorsningarna grupperade med $p > 0,65$ till föräldrapopulationerna. De simulerade F1:orna grupperades korrekt (dvs med $p > 0,65$) i 86% av fallen. Detta visar att metoden och det givna tröskelvärdet inte lämpar sig bra för att detektera och särskilja föräldrapopulationerna från hybrider. Bland de simulerade återkorsningarna till varg (F1xV) och hund (F1xH) klassificerades 81% och 90% korrekt. Bland spillningarna klassificerades både SEP0020759 och SEP0020765 dock båda till första generationens hybrider med en sannolikhet $p > 0,65$ (Tabell 4).

Tabell 3. Gruppering (q_i) med hundkluster respektive vargkluster från STRUCTURE-analys samt inbördes sannolikheter att tillhöra en viss föräldrapopulation eller hybridklass från NEWHYBRIDS. För vargar och hundar i referenspopulationerna anges medelvärdet för q_i och inom parentes anges det genomsnittliga 90-procentiga kredibilitetsintervallet för q_i . Under NEWHYBRIDS-analys anges de inbördes sannolikheterna att tillhöra grupperna varg, hund, F1, F2, F1xV och F1xH för referenspopulationerna (medelvärdet anges).

	q_i STRUCTURE-analys		NEWHYBRIDS-analys					
	Varg	Hund	Varg	Hund	F1	F2	F1xV	F1xH
<i>A) 27 mikrosatelliter</i>								
Varg	0,946 (0,859-0,955)	0,054 (0,005-0,141)	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Hund	0,042 (0,002-0,120)	0,958 (0,880-0,998)	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SEP0020759	0,372 (0,221-0,530)	0,628 (0,470-0,779)	0,000	0,000	0,838	0,044	0,000	0,117
SEP0020765	0,357 (0,196-0,524)	0,643 (0,476-0,804)	0,000	0,000	0,530	0,158	0,000	0,313
<i>B) 90 SNPs</i>								
Varg	0,837 (0,669-0,967)	0,163 (0,033-0,331)	0,996	0,000	0,002	0,000	0,001	0,000
Hund	0,094 (0,012-0,221)	0,906 (0,779-0,987)	0,000	0,995	0,001	0,000	0,000	0,004
SEP0020759	0,416 (0,218-0,629)	0,584 (0,371-0,782)	0,000	0,000	0,965	0,020	0,001	0,014
SEP0020765	0,469 (0,261-0,684)	0,531 (0,316-0,739)	0,000	0,000	0,966	0,023	0,004	0,007

Mikrosatelliter

Den genetiska differentieringen på 27 autosomala mikrosatelliter mellan varg och hund var 0.234 (95% Konfidensintervall: 0.183 - 0.283), vilket indikerar att det finns genetiska skillnader mellan de två referenspopulationerna.

Båda spillningarna visa på förekomsten av alleler som inte är känt förekommande bland Skandinaviska och/eller Finsk-Ryska vargar. Samtidigt visa proven även på förekomsten av alleler som inte finns bland de hundarna i referensmaterialet. I ett grupperingstest med programmet

GeneClass2 visade båda proven en signifikant avvikelse från alla referensproverna som representerar den Finsk-Ryska vargpopulationen (Tabell 2).

Plottningen med hjälp av FCA (Factorial Correspondence Analysis; Figur 1B) visade i likhet med SNPs att det inte finns det något överlapp i faktor 1 (som förklarar 11,5% av den genetiska variationen) mellan hundar och vargar. De två spillningsproven visade ingen tydlig gruppering med någon av populationerna utan positionerades istället i ett eget "kluster" mellan varg och hund.

STRUCTURE-analysen av referensproven från varg och hund tillsammans med de simulerade genotyperna över F1, F1xH och F1xV visade att föräldrapopulationerna grupperades korrekt till 100% av fallen för både vargar respektive hundar då ett tröskelvärde på $q_i > 0,65$ användes (Figur 3B). För F1-hybriderna var medelmedlemskapet $q_1 = 0,429$ och $q_i > 0,65$ i 0 % av fallen. För F1xV och F1xH var medelmedlemskapet $q_1 = 0,703$ (till vargklustret) respektive $q_2 = 0,818$ (till vargklustret). I 72% respektive 98% av fallen var $q_i > 0,65$ och därmed bestämda till en av föräldrapopulationerna. Detta indikerar alltså att förmågan att detektera F1-hybrider med mikrosatelliter är god $q_i = 0,65$ som gränsvärde medan förmågan att detektera återkorsningar är avsevärt lägre, vilka i hög grad grupperas med föräldragenerationerna.

Analysen i STRUCTURE med hundar och vargar som referenspopulationer visade på en tydlig gruppering av populationerna (Figur 2B). Bland hundarna var medelmedlemskapet till hundklustret $Q_2 = 0,958$. Vargarnas medelmedlemskap till vargklustret var $Q_1 = 0,946$. Spillningarna visade ingen tydlig gruppering med varken varg eller hund med $q_1 = 0,372$ för SEP0020759 och $q_1 = 0,357$ för SEP0020765 (Figur 2B, Tabell 3A). Inget av proven överstiger alltså gränsvärdet $q_i = 0,65$ för endera av föräldrapopulationerna, vilket indikerar genotyperna har ett blandat medlemskap med varg och hund.

Med analysen i NewHybrids av mikrosatelliterna visade simuleringen att 97% samt 100% av alla vargar och hundar grupperades korrekt med respektive föräldrapopulation med ett tröskelvärde på $p = 0,65$. Ingen av de simulerade F1:orna och hybridåterkorsningarna grupperades med $p > 0,65$ till föräldrapopulationerna. De simulerade F1:orna grupperades dessutom korrekt (d.v.s. med $p > 0,65$) i 99% av fallen. Detta visar att metoden och det givna tröskelvärdet lämpar sig, med mikrosatelliter, bra för att detektera och särskilja föräldrapopulationerna från hybrider. Bland de simulerade återkorsningarna till varg (F1xV) och hund (F1xH) klassificerades 96% och 97% korrekt. Bland spillningarna klassificerades SEP0020759 båda till första generationens hybrider med en sannolikhet $p > 0,65$ (Tabell 4), medan SEP0020765 visade hög sannolikhet att utgöra både F1 ($p = 0,530$) och hybridåterkorsning med hund ($p = 0,312$).

Mitokondriellt DNA (mtDNA)

Med mitokondriellt DNA (som nedärvs maternellt) är det möjligt att utvärdera moderslinjens ursprung. Bland de referensprov vi har från Skandinaviska och Finsk-Ryska vargar samt hundar har vi byggt upp en databas på 17 olika haplotyper (d.v.s. genetiska varianter), varav fyra har dokumenterats hos varg och 13 hos hund. Ingen av de genetiska varianterna har ännu dokumenterats från både varg och hund. SEP0020759, SEP0020765 och SEP0123573 visade alla på en identisk haplotyp. Denna haplotyp är den vanligast förekommande bland Skandinaviska vargar, vilket beror på att den kom in med den första tiken som grundade populationen. Detta indikerar att moderslinjen för de tre spillningarnas DNA kan härledas till varg.

Föräldraskap

Under 2017 har fem olika vargar (G11-17, G113-16, G137-17, G74-17, G92-16) identifierats i Södermanlands län. Eftersom flera resultat ovan indikerar på att spillningarna kommer från individer med ett blandat ursprung med avseende Skandinavisk varg och hund testades om någon av identifierade vargarna skulle kunna vara föräldrar till de två nya individerna. Utifrån antagande om Mendelsk nedärvning går det att utesluta om en avkommas genotyp kan komma från en given föräldrakandidat. Vid jämförelsen av de två spillningsgenotyperna mot de fem vargarna kunde föräldraskap uteslutas för fyra av dem. Den individ som inte gick att utesluta som potentiell förälder var G74-17, en tik som senast identifierades 2017-09-19. SEP0020759 matchade med G74-17 på alla 117 SNP- och mikrosatellitmarkörerna och SEP0020765 matchade på 116 av 117 markörer.

Felmatchen på en mikrosatellit (2054) mellan SEP0020765 och G74-17 kan bero allerbortfall, d.v.s. ett metodologiskt fel.

Sammanfattning och Slutsats

Tre spillningar från Södermanlands län har analyserats på 90 autosomala SNPs, 27 autosomala mikrosatelliter och en sekvens av mitokondriellt DNA. Ändmålet var att utreda ifall hybridisering med hund en eller flera generationer tillbaka kan påvisas hos DNA från spillningarna. Studien visar att de tre spillningarna kommer från två olika individer. Vid ett grupperingstest av spillningarna mot referensprov från Skandinavisk varg, Finsk-Rysk varg och hund visa varken SNP- eller mikrosatellitgenotyperna någon tydlig gruppering med någon av populationerna. Individernas genotyper visar dessutom på förekomsten av flera genetiska mikrosatellitvarianter (alleler) som ännu inte är känt förekommande bland Skandinaviska och/eller Finns-Ryska vargar. Samtidigt visar proven även på förekomsten av alleler som inte finns bland analyserade hundar i referensmaterialet. Flera av allelerna som individerna bär på är antingen påträffade hos Skandinavisk varg eller hundar.

Studien visar att varg och hund är genetiskt differentierade på både mikrosatelliter och SNPs, vilket är en förutsättning för att identifiera hybrider dem emellan. För att undersöka om spillningarna bar på genetiskt material från både varg och hund eller bara en av dem utfördes en klusteranalys i STRUCTURE. I analysen av både SNP och mikrosatelliter fanns det en tydlig skillnad mellan varg och hund i avseende på medlemskapet till respektive kluster. Den tydligaste skillnaden fanns dock på mikrosatelliter. Både analysen av SNPs och mikrosatelliter visade dock tydliga indikationer på att genotyperna från spillningar hade ett högt medlemskap till båda klustren (varg- respektive hundklustren) vilket alltså indikerar på individerna har blandat genetisk ursprung.

Den mer detaljerade undersökningen av sannolikheterna för spillningarna att gruppera med någon av de undersökta föräldrapopulationerna (varg och hund) eller hybridklasserna (F1, F2, F1 x Hund och F1 x Varg) resulterade i att SEP0020759 visade högst sannolikhet att gruppera med första generationens hybrider mellan varg och hund (F1) på både SNP och mikrosatelliter. SEP0020759 visade på SNPs och på en hög sannolikhet att gruppera med F1, medan den på mikrosatelliter visade på något otydligare gruppering till både F1 och hybridåterkorsning med hund. Detta indikerar att proven med störst sannolikhet kommer från första generationens hybrider mellan varg och hund.

Vid jämförelsen av de två spillningsgenotyperna mot de fem vargar som identifierat i Södermanlands län under 2017 kunde föräldraskap uteslutas för fyra av dem. Den individ som inte gick att utesluta som potentiell förälder var G74-17, en tik som senast identifierades 2017-09-19. Att det skulle vara en varg som var mor till de två nya individerna stöds även utifrån analysen av mitokondriellt DNA visade spillningarna på förekomsten av haplotyp som är vanligt förekommande bland Skandinaviska vargar. Eftersom mitokondriellt DNA nedärvs materiellt indikerar detta alltså på modern till de två individerna är en varg eller att moderslinjen kan härleds till en varg.

Referenser

Anderson EC och Thompson EA. 2002. A model-based method for identifying hybrid using multilocus genetic data. *Genetics* 160:1217-1229

Andersone Z, Lucchini V, Randi E, och Ozolins J. 2002. Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammalian Biology* 67: 79-90

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, och Bonhomme F. 2004. GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Francisco, LV, Langston, AA, Mellersh, CS och Neal, CL. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 7: 359-362.

- Godinho, R., Llaneza, L., Blanco, J. C., Lopes, S., Álvares, F., García, E. J., ... Ferrand, N. 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology*, 20: 5154–5166.
- Holmes NG, Mellersh CS, Humphreys SJ, Binns MM, Holliman A, Curtis R och Sampson J. 1993. Isolation and characterization of microsatellites from the canine genome. *Animal Genetics* 24: 289-292.
- Holmes G, et al 1995. Eighteen canine microsatellites. *Animal Genetics* 26: 132-133.
- Neff et al. 1999 A Second-Generation Genetic Linkage Map of the Domestic Dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 151:803-820
- Nielsen, E. E., Bach, L. A., & Kotlicki, P. 2006. Hybridlab (Version 1.0): a Program for Generating Simulated Hybrids From Population Samples. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 971–973.
- Ostrander EA, Sprague, G F och Rine, J. 1993 Identification and characterization of dinucleotide repeat (ca)n markers for genetic-mapping in dog. *Genomics* 16: 207-213.
- Paetkau, D, Slade, R, Burden, M och Estoup, A. 2004. Direct, real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13:55-65.
- Piry, S, Alapetite, A., Cornuet, JM, Paetkau, D, Baudouin, L och Estoup, A. 2004. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95:536-539.
- Pritchard, JK, Stephens, M. och Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Randi E, Lucchini V, Christensen, MF m.fl. 2000. Mitochondrial DNA Variability in Italian and East European Wolves: Detecting the Consequences of Small Population Size and Hybridization. *Conservation Biology* 14: 464–473.
- Rannala, B, Mountain, JL. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94:9197-9201.
- Shibuya H, et al 1994. A polymorphic (AGGAAT)n tandem repeat in anintron of the canine von Willebrand factor gene. *Animal Genetics* 25: 122.
- Sundqvist AK, et al 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology* 10:1959-1966
- Wayne RK och Vilá C. 2003. Molecular genetic studies of wolves. Kapitel 9 I Meach, LD och Boitani, L. *Wolves: behavior, ecology and conservation*. University of Chacaco Press, Chicaco, Illinois.
- Verardi A, Lucchini V och Rand E. 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology* 15: 2845–2855
- Vilà C, Walker C, Sundqvist A-K m.fl.. 2003. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf–dog hybrids. *Heredity* 90, 17–24.
- Wayne RK och Vilá C. 2003. Molecular genetic studies of wolves. Kapitel 9 I Meach, LD och Boitani, L. *Wolves: behavior, ecology and conservation*. University of Chacaco Press, Chicaco, Illinois.

Weir, BS och Cockerham, CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370