



Genetisk undersökning av varg från svenska djurparker med avseende på genetiskt ursprung och hybridisering med hund

Hybridisering mellan varg och hund är fullt möjlig och har dokumenterats ske i det vilda. Eftersom detta kan påverka vargars förmåga att överleva och få partners är undersökningar och uppföljningar av eventuella hybridiseringar i det vilda bevarandegenetiskt viktigt. Här undersöks om grundare till den skandinaviska djurparksstammen kan vara 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). Dessa studier indikerar att hybridisering är relativt ovanligt förekommande i Europa trots att varg samexisterar med hund över i princip hela dess utbredning och att hundar på flera ställen är mycket vanligare än vargar. Ett fåtal hybrider har identifierats med genetiska markörer i Lettland (Anderson m.fl. 2002) och i Skandinavien (se Vilá och Walker 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 högvariabla genetiska markörer (främst mikrosatelliter) från autosomalt DNA. 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.

Den skandinaviska djurparksstammen har grundats av totalt nio individer med härkomst från vilda vargpopulationer i Skandinavien (både från den före och efter 1983 då den "nya" vargpopulationen grundades), Finland, Ryssland, Estland och Lettland. I denna studie utvärderas ifall tre av dessa grundare samt en dotter till en fjärde grundare visar indikationer på att vara sena hybrider mellan varg och hund. Följande individer har behandlats:

- "Laika"; tik född 1980 i Moskva Zoo från vildfödda föräldrar
- "Tyra"; tik född i vilt tillstånd i Estland 1989 och inlämnad till Tallinn Zoo samma år
- "Gaisma"; en hane född i vilt tillstånd i Lettland 1996 och överförd till Riga Zoo samma år
- "Tarja"; tik född 1998 i Lycksele Djurpark och dotter till "Ester", vilket är en vildfödd tik från Estland

För att undersöka dessa vargars härkomst används PCR-baserade metoder för att ta fram den genetiska variationen på autosomala mikrosatelliter samt delar av mitokondriellt DNA (mtDNA). Denna genetiska information jämförs med genotyperna från vargar, hundar samt hybrider dem emellan. Ett genetisk 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.

Ett viktigt antagande vid användandet av allelfrekvenser för att identifiera hybrider är att referenspopulationerna genetiskt representerar de populationer som testindividerna härstammar från. Referensmaterial saknas tyvärr från just de områden (Estland, Lettland och i området kring Moskva, Ryssland) som djurparksvargarna sannolikt härstammar från. Istället användes referenspopulationer som vi har material från, nämligen nordvästra Ryssland (i regionerna Karelen och Arkhangelsk) och Litauen. Som ett led i analysen var det därför viktigt att kvantifiera och testa likheten mellan genotyperna från djurparksvargarna och vargarna i referenspopulationerna. Detta kan även ge en viss vägledning till vilken referenspopulation som lämpar sig bäst för hybrididentifiering.

För att undersöka om djurparksvargarna är hybrider eller avkommor till 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 gruppera med ettdera klustret medan en individ med blandad härkomst kommer att gruppera 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 vargpopsulation 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 hybridiseringstillfällen då den hybridiserande hunden var en tik. Djurparksvargarna har sekvenserats för tre markörer på kontrollregionen och jämförts med vargar från referensmaterial samt med publicerade sekvenser på varg och hund.

Material och metoder

Totalt har fyra DNA-prov (från blod och serum) från svenska djurparksvargar analyserats: "Laika" (serum), "Tyra" (blod), "Gaisma" (blod), "Tarja" (serum). Serum innehåller mycket lägre koncentrationer DNA än blod, men tillräckligt med DNA kunde prepareras (enligt nedan) för att bedriva studien. De tre första vargarna utgör tillsammans med Ester (mor till Tarja) fyra av nio grundare till den svenska djurparsstammen. De andra fem vargarna utgörs av ett syskonpar födda 1965 i det vilda i Skandinavien, ett syskonpar födda 1950 i det vilda i Finland samt tiken "Vilde" som är född i Koppangsreviret (Norge) år 1997.

För att testa ursprunget för de fyra vargarna har 90 referensprover använts, varav

- 13 vargar (vävnadsprov) dödade mellan 1995 och 2000 i Arkhangelsk, Ryssland
- 23 vargar (vävnadsprov) dödade mellan 1995 och 2000 i Karelen, Ryssland

- 28 vargar (hud- och hårprov) provtagna från skinn i Litauen
- 26 hundar (hårprov) från 19 olika raser och blandraser (Griffon, Westi, Kelpie (2 st), Borderterrier, Amerikansk Cocker Spaniel x Pudel, Malinois (2 st), Schäfer x labrador, Schäfer x Malinois, Schäfer (3st), Irländsk Setter, Vorster, Hovawart, Cocker Spaniel (2 st), Pudel, Finsk Spets (2 st), Münsterländer, Leonberger, Riesenschnauzer och Östsibirisk Laika (2 st)

DNA från hår preparerades i 200 µl lysis-buffert (0.1 M Tris, 0.005 M EDTA, 0.2% SDS, 0.2 M NaCl) och 1.5 µl Proteinase K (20 mg/µl) följt av inkubering på 55°C i tre timmar. DNA fälldes ut och centrifugerades efter att 10 µl natriumacetat (3M) och 220 µl ren etanol tillsatts. Lösningen avlägsnades med pipet och precipitatet löstes i destillerat vatten.

DNA från blod (200µl) och vävnad preparerades i 300-500 µl SET-buffert (0.15 M NaCl, 0.05 M TRIS, 0.001 M EDTA), 10 µl SDS (20 %) och 13 µl Proteinase K (10 mg/µl) följt av inkubering på 55°C över natten. DNA renades sedan genom extraktion med fenol och kloroform-isoamylalkohol. Därefter följde precipitering av DNA med 10 µl natriumacetat (3M) och 440 µl ren etanol, tvättning med 75 % etanol och torkning i rumstemperatur över natten. Slutligen löstes precipitatet i destillerat vatten.

För att uppskatta om djurparksvargarna utgör avkommor eller ättlingar till hund togs genotypen för 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, 2159, 2168, 2201 (Francisco et al. 1996), AHT002, AHT004, AHT101 (Holmes et al. 1993), AHT103, AHT119, AHT121, 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.

För varje markör gjordes PCR på två replikat av provet, 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). Vargarna från Arkhangelsk och Karelen samt hundarna har också typats på de 27 autosomala mikrosatelliterna, även om det finns viss variation i antalet markörer mellan prover (Arkhangelsk: 24-27 markörer (max-min), Karelen: 23-27 markörer, Hund: 15-27 markörer). Vargarna från Litauen har typats på högst 20 markörer (variation mellan 17 och 20 markörer). 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 djurparksvargarna jämfördes med erhållna sekvenser från referensproverna samt sekvenser publicerade i GenBank. Eftersom en haplotyp hos djurparksvargarna påträffats både bland vargar och hundar så sekvenserades ett längre fragment (379 baspar) av kontrollregionen på mtDNA från djurparksvargarna motsvarande position 15745-16124. Detta gjordes med primers L16452 (GGG CCC ATA CTA ACG TGG GG) och H222 (AAC TAT ATGT CCT GAA ACC) i enlighet med Vilá m.fl. (1997). Sekvensen jämfördes därefter med publicerade sekvenser i GenBank efter alignment i Geneious Pro 5.1.6 (Drummon m.fl. 2011).

Genetisk variation och differentiering mellan referenspopulationerna

Mikrosatelliternas diversitet, d.v.s. medelantalet alleler per markör (N_a), antal unika alleler, samt observerad (H_o) och förväntad (H_e) heterozygoti samt F_{IS} uppskattades FSTAT v2.9.3.2 (Goudet 2001).

För att kunna identifiera hybrider mellan olika källpopulationer m.h.a. 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) i FSTAT och s.k. AMOVA (Analysis of Molecular Variance; Michalakis och Excoffier 1999) i programmet Arlequin 3.5 (Excoffier och Lischer 2010).

En grafisk visualisering av den genetiska differentieringen mellan hundar och de tre olika vargpopulationerna gjordes med FCA (Factorial Correspondence Analysis) i Genetix 4.05 (Belkhir m.fl. 2004).

Eftersom inget referensmaterial finns tillgängligt från de områden där de fyra djurparsvargarna härstammar från, används ett s.k. grupperingstest för att uppskatta vilken av de tre referenspopulationerna som bäst förklarar genotypen för respektive varg samt hur sannolikt det är att genotypen skulle påträffas hos en avkomma från respektive referenspopulation. Grupperingstestet 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 and 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 95 procent av den simulerade fördelningen av L_i -värden kan 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 grupperas till separata kluster. Med hundar och vargar separerade i två olika kluster kommer en hybrid att visa mindre markant gruppering till någon klustren. Värdet q_i anger andelen av en individs arvsmassa som beräknas härstamma till kluster i . Med genotyperna från de fyra djurparksvargarna bestämdes deras genetiska härkomst med avseende på hund och varg genom att uppskatta q_i och felmarginalen hos q_i (med s.k. kredibilitetsintervall). Två olika modeller med djurparksvargarna kördes med 1) hundar och vargar från Karelen samt 2) hundar och vargar från Litauen. Båda modellerna replikerades fem gånger med i princip identiska resultat. 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 hundar och vargar i referensmaterialet skapades:

- 100 simulerade genotyper baserat på allelfrekvenserna av hund (H)
- 100 simulerade genotyper baserat på allelfrekvenserna hos en av populationerna av varg (V_i)
- 100 simulerade genotyper av första generationens hybrider (F1) mellan H och V_i
- 100 andra generationens hybrider (F2), d.v.s. avkomman mellan två F1-individer
- 100 tillbakakorsningar mellan F1 och varg (F1x V_i)
- 100 tillbakakorsningar mellan F1 och hund (F1xH)

Med $K=2$, användes STRUCTURE för att bestämma de simulerade individernas ursprung. Med ett $q_i > 0.85$ bedömdes individen komma från föräldrapopulationen i , medan ett $q_i < 0.85$ 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

Totalt har mellan 15 och 27 autosomala mikrosatelliter analyserats på 26 hundar och 68 vargar, varav 13 insamlade i Ryska Arkhangelsk, 23 i Ryska Karelen, 28 i Litauen och 4 vargar från svenska djurparker. Med undantag av 7 markörer som inte analyserats på de Litauiska vargarna, var alla markörer polymorfa (variabla) i alla grupper med 2 till 19 alleler per markör och heterozygotivärden mellan 0.396 (225) och 0.948 (2137; Tabell 1).

Tabell 1. Genetisk variation på a) 20 respektive b) 27 autosomala mikrosatelliter för referenspopulationerna med avseende på medelantalet alleler, heterozygoti (H_e) samt antalet totala unika alleler för respektive vargpopulation i relation till hund (och tvärtom). Standardavvikelsen för angivna medelvärden anges inom parantes.

	Varg			Hund
	Arkhangelsk	Karelen	Litauen	
Antal individer	13	23	28	26
<i>a) 20 autosomala markörer</i>				
Antal alleler	7.10 (2.81)	8.05 (2.93)	8.00 (3.76)	8.8 (3.94)
Antal unika alleler	55	63	56	89 Archangelsk) 78 (Karelen) 72 (Litauen)
Heterozygoti	0.77 (0.12)	0.79 (0.10)	0.78 (0.10)	0.77 (0.12)
<i>b) 27 autosomala markörer</i>				
Antal alleler	6.78 (2.46)	7.74 (2.96)		8 (4.24)
Antal unika alleler	67	82		100 Archangelsk) 89 (Karelen)
Heterozygoti	0.77 (0.11)	0.78 (0.10)		0.75 (0.14)

Avvikelser mellan den observerade heterozygotin (H_o) inom referenspopulationerna med heterozygotin som förväntas (H_e) utifrån allelfrekvenser kan bero på att någon specifik markör bär på nollalleler (vilket leder till en underskattning av de observerade heterozygotin). Ifall avvikelse mellan H_o och H_e observeras på flera markörer kan det dock vara mer troligt en utomstående faktor (t.ex. en spridningsbarriär eller frekvent inavel) påverkar jämvikten mellan homozygoter och heterozygoter (den s.k. Hardy-Weinbergjämvikten). Avvikelser från Hardy-Weinbergjämvikt brukar

uppskattas med F_{IS} -värden, vilka varierar mellan -1 (total brist på homozygoter) och 1 (total brist på heterozygoter), medant $F_{IS}=0$ innebär Hardy-Weinbergjämvikt. Bland litauiska vargar observerades en signifikant avvikelse från Hardy-Weinbergjämvikt ($F_{IS} = 0.109$, $p<0.05$), vilket förklaras av två markörer 2159 ($F_{IS} 0.697$, $p<0.05$) och AHT119 ($F_{IS}=0.426$, $p<0.05$). Detta kan bero på förekomsten av nollaller hos dessa markörer. Slutsatserna av fortsatta analyser påverkades dock inte nämnvärt av borttagandet av dessa markörer från analysen. De rapporterade analyserna nedan inkluderar därför alla tjugo markörerna från de litauiska vargarna. Hundarna visar en markant avvikelse från Hardy-Weinbergjämvikt ($F_{IS} = 0.277$, $p<0.05$) och detta förklaras av att alla utom en av de 27 markörerna visade lägre heterozygoti än förväntat (varav sex markörer till signifikant grad). Eftersom flera raser använts och det finns markanta barriärer för ett fritt genflöde dem emellan så är denna avvikelse från Hardy-Weinberg inte oväntad.

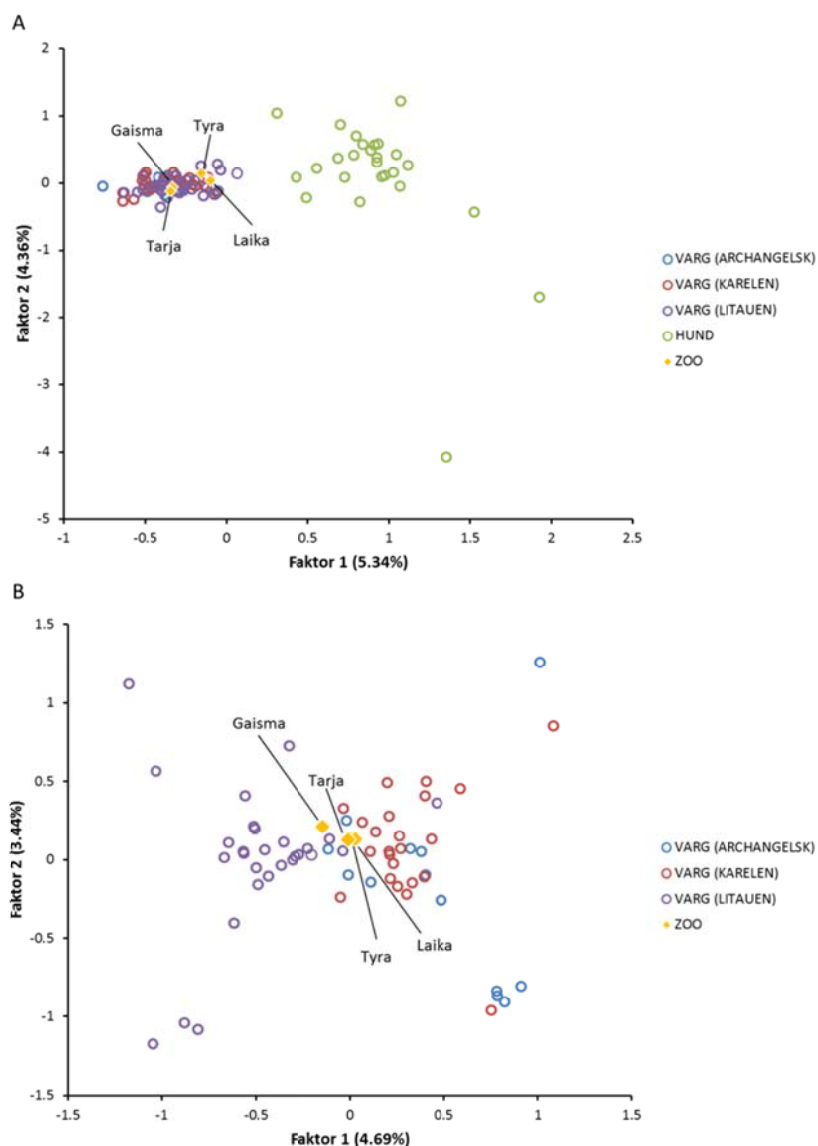
Andelen genetisk variation som kunde förklaras av uppdelningen mellan varg och hund var 4.5% av den totala genetiska variationen. Ytterligare 2.9% av variationen förklaras av uppdelningen mellan de tre olika vargpopulationerna. Den genetiska differentieringen mellan varg och hund varierade mellan 0.089 och 0.095 (alla med $p<0.05$; Tabell 2). Den genetiska differentieringen mellan de olika vargpopulationerna var som förväntat lägre och varierade mellan 0.014 (Karelen och Archangelsk; $p>0.05$) och 0.051 (Karelen och Litauen; $p<0.05$).

Tabell 2. Genetisk differentiering F_{ST} (Weir och Cockerham 1984) mellan de olika referenspopulationerna uppskattade med 20 autosomala mikrosatellitmarkörer (över diagonalen) samt 27 autosomala mikrosatellitmarkörer (under diagonalen). Signifikans (* = $p<0,05$) indikerar att populationerna är differentierade.

	Varg (Arkhangelsk)	Varg (Karelen)	Varg (Litauen)	Hund
Varg (Arkhangelsk)	-	0.014	0.050*	0.093*
Varg (Karelen)	0.017	-	0.051*	0.089*
Varg (Litauen)	-	-	-	0.095*
Hund	0.087*	0.092*	-	-

Den högre genetiska skillnaden mellan vargpopulationerna och hundpopulationen är observerbar även vid plottning med hjälp av FCA (Factorial Correspondence Analysis; Figur 1). 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 i faktor 1 (som förklarar 5.34% av den genetisk variationen) mellan hundar och vargar. Alla fyra vargarna från de svenska djurparkerna grupperar relativt väl med vargarna. En FCA med endast vargarna representerade i analysen resulterade (i enlighet med F_{ST} -analysen) i en separation mellan litauiska vargar och ryska vargar (Figur 1B). Någon tydlig gruppering med endera populationerna kan dock inte ses för djurparksvargarna.

Vid grupperingsanalysen av djurparksvargarna visar alla djurparksvargarna en mycket liten sannolikhet ($p<0.001$) att vara av direkt börd från populationen av vargar i Arkhangelsk samt från hundpopulationen. Det fanns emellertid en viss skillnad mellan djurparksvargarna med vilken av de andra två referenspopulationerna de grupperade bäst (Tabell 3). Tyra (från Estland) grupperade bäst med de Karelska vargarna medan Gaisma (från Lettland) och Tarja (dotter till Ester från Estland) grupperade bäst med de litauiska vargarna. Laika (från Ryssland) däremot grupperade ungefär lika väl med Karelen som Litauen. Utifrån dessa resultat utförs hybridtesterna av djurparksvargarna endast med de karelska och litauiska referenspopulationerna.



Figur 1. Gruppering av de analyserade genotyperna från hundar och vargar (från Karelen, Arkhangels, Litauen och svenska djurparker (ZOO)) med FCA (Factorial Correspondence Analysis). Faktor 1 och 2 är de komponentar av den genetiska variationen bland 20 mikrosatelliter som förklarade den mesta variationen bland de analyserade individerna.

Tabell 3. Sannolikheten ($\log(L_i)$) att djurparksvargarnas genotyper skulle påträffas bland direkta avkommor till de fyra testade referenspopulationerna. Det minst negativa värdet utgör den mest sannolika gruppen. Inom parantes anges ett värde som motsvarar den procentuella andelen sannolikheten i relation till summan sannolikheterna för alla referenspopulationer. Ett värde på ~100% innebär att sannolikheten att påträffa genotypen i andra populationer än den aktuella är försumbar. Signifikans (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) indikerar att det är osannolikt att individen härstammar direkt från populationen.

	Varg (Arkhangelsk)	Varg (Karelen)	Varg (Litauen)	Hund
Laika	-41.7 (0) **	-33.2 (58.2)	-33.3 (41.8)	-44.9 (0) **
Tyra	-35.5 (0)	-31.7 (99.9)	-35.1 (0)	-44 (0) **
Gaisma	-41.5 (0) **	-36.9 (0)**	-33.4 (100)	-52.2 (0) ***
Tarja	-42.6 (0) **	-39.5 (5.4) **	-38.2 (94.6)	-53.2 (0) ***

STRUCTURE-analys

Analysen i STRUCTURE med hundar och karelska vargar som referenspopulationer visade på en tydlig gruppering av populationerna (Figur 2A). Bland hundarna var medelmedlemskapet till hundklustret $Q_1 = 0.985$. Den hund (en korsning mellan Amerikansk Cocker Spaniel och Pudel) som visad lägst medlemskap hade $q_1 < 0.85$. De karelska vargarnas medelmedlemskap till vargklustret var $Q_2 = 0.994$. Djurparksvargarna visade alla en tydlig gruppering med varg med $q_i > 0.943$ (Figur 2A, Tabell 4A) även om osäkerheten för Laika och Tyra är något för stor för att säkert dra slutsatsen att de grupperas med vargarna. Detta baseras på kreditabilitetsintervallen för q_i för Laika och Tyra ligger över tröskelvärde ($q_i = 0.85$).

STRUCTURE-analysen av de simulerade genotyperna över karelska vargar, hundar, F1, F2, F1xH och F1xV visade att föräldrapopulationerna grupperades korrekt till 98 % och 100% av fallen för vargar respektive hundar (Figur 3A). Tröskelvärde på q_i för bestämning till en av föräldrapopulationer var då värdet översteg 0.85. Medelmedlemskapet för simulerade vargar respektive hundar var $q_i = 0.994$ och $q_i = 0.986$. För F1-hybriderna var medelmedlemskapet $q_i = 0.513$ och aldrig var $q_i > 0.85$. För F2-hybriderna var medelmedlemskapet $q_i = 0.514$ och i 1 av 50 fall var $q_i > 0.85$ och hade därmed med detta tröskelvärde felaktigt bestämts till en hund. För F1xH och F1xV var medelmedlemskapet $q_i = 0.771$ (till hundklustret) respektive 0.767 (till vargklustret). I 24% respektive 12 % av fallen var dock $q_i > 0.85$ och därmed bestämda till en av föräldrapopulationerna. Detta indikerar alltså att förmågan att detektera en återkorsning är avsevärt lägre för tillbakakorsningar än för F1- eller F2-hybrider.

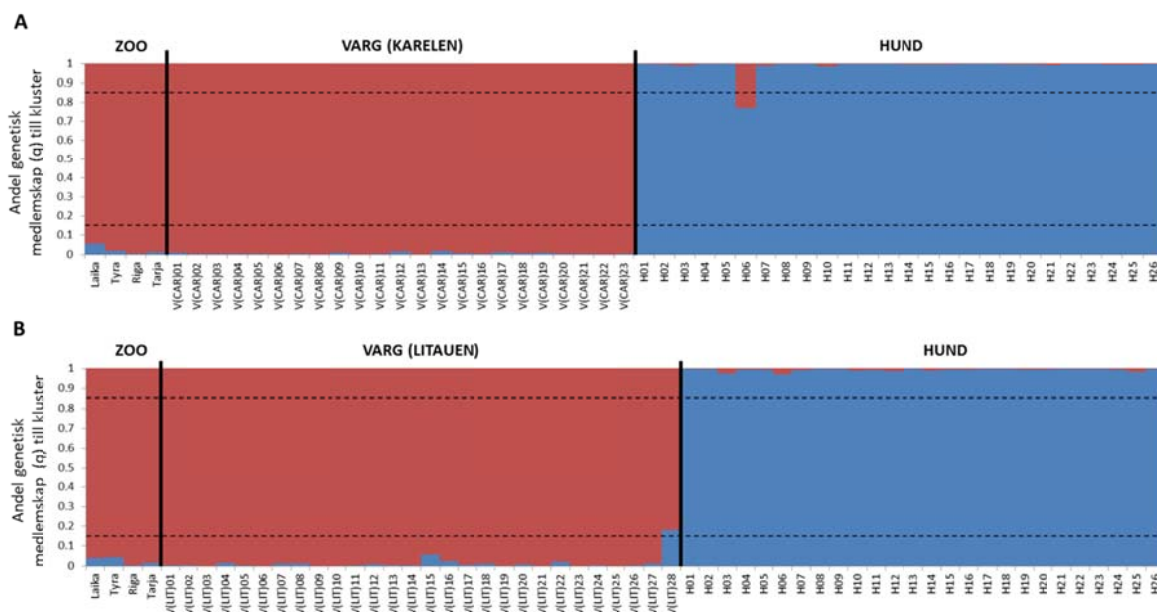
Tabell 4. Gruppering (q_i) med hundkluster respektive vargkluster från STRUCTURE-analys samt inbördes sannolikheter att tillhöra en viss föräldrapopulation eller hybridklass från NEWHYBRIDS. För vargar och hundar i referenspopulationerna anges medelvärdet för q_i och inom parentes anges det 90-procentiga 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) och djurparksvargarna.. Värden i fet stil anger de mest sannolika grupperna.

	STRUCTURE-analys		NEWHYBRIDS-analys					
	Varg	Hund	Varg	Hund	F1	F2	F1xV	F1xH
<i>A) Karelska vargar som referenser</i>								
Varg	0.994 (0.857-1)	0.006 (0, 0.143)	0.988	0.000	0.000	0.001	0.011	0.000
Hund	0.014 (0-0.747)	0.986 (0.253, 1)	0.000	0.990	0.000	0.001	0.000	0.008
Laika	0.943 (0.661, 1)	0.057 (0-0.339)	0.616	0.000	0.059	0.070	0.254	0.001
Tyra	0.979 (0.842, 1)	0.021 (0-0.158)	0.889	0.000	0.005	0.021	0.085	0.000
Gaisma	0.996 (0.981, 1)	0.004 (0-0.019)	0.997	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
Tarja	0.988 (0.913, 1)	0.012 (0-0.087)	0.959	0.000	0.000	0.001	0.039	0.000
<i>B) Litauiska vargar som referenser</i>								
Varg	0.984 (0.317-1)	0.016 (0, 0.683)	0.984	0.000	0.001	0.003	0.011	0.000
Hund	0.008 (0-0.218)	0.992 (0.782, 1)	0.000	0.987	0.001	0.002	0.000	0.010
Laika	0.960 (0.715, 1)	0.040 (0-0.285)	0.874	0.000	0.026	0.015	0.085	0.000
Tyra	0.959 (0.695, 1)	0.041 (0-0.305)	0.956	0.000	0.002	0.010	0.032	0.000
Gaisma	0.995 (0.977, 1)	0.005 (0-0.023)	0.997	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000
Tarja	0.984 (0.882, 1)	0.016 (0-0.118)	0.985	0.000	0.000	0.001	0.015	0.000

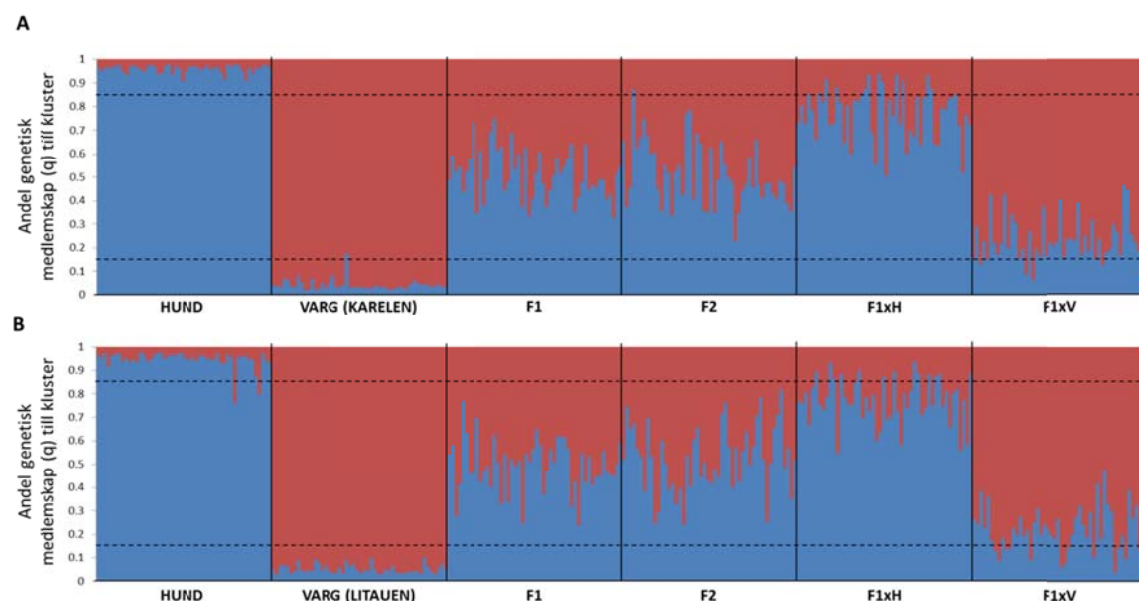
I STRUCTURE-analysen med Litauiska vargar och hundar som referenspopulationer erhöles också en tydlig uppdelning mellan populationerna med ett medelmedlemskap på $Q_1 = 0.992$ för hundar och $Q_2 = 0.984$ för Litauiska vargar. En litauisk varg visade ett medlemskap $q_1 < 0.85$. Notera att medlemskapet var något lägre jämfört med analysen med karelska vargar, vilket troligen beror på att analysen bygger på färre markörer. Djurparksvargarna visade även här en tydlig gruppering

med vargarna med $q_i > 0.959$ (Figur 2B, Tabell 4B) och återigen är osäkerheten för Laika och Tyra är något för stor för att säkert dra slutsatsen att de grupperas med vargarna.

STRUCTURE-analysen av de simulerade genotyperna över litauiska vargar, hundar, F1, F2, F1xH och F1xV visade att föräldrapopulationerna grupperades korrekt till 100 % och 96% av fallen för vargar respektive hundar (Figur 3B). Medelmedlemskapet för simulerade vargar respektive hundar var $q_i = 0.946$ och $q_i = 0.948$. För F1 och F2 var medelmedlemskapet $q_i = 0.505$ och $q_i = 0.524$ och i inget av fallen var $q_i > 0.85$ för något av klustren. För F1xH och F1xV var medelmedlemskapet $q_i = 0.773$ (till hundklustret) respektive 0.784 (till vargklustret). I 26% respektive 28 % av fallen var dock $q_i > 0.85$ och därmed felbestämda. I likhet med analysen med de karelska vargarna är det en avsevärd andel av åter korsningar som skulle missas.



Figur 2. Gruppering till genetiskt kluster uppskattade med STRUCTURE-analys med $K = 2$ utan någon förhandsinformation om populationstillhörighet för fyra djurparksvargar tillsammans med hundar och (A) karelska vargar samt (B) litauiska vargar. De streckade linjerna motsvarar tröskelvärdet 85% för en säker bestämning till ettdera klustret.



Figur 3. Gruppering till genetiskt kluster uppskattat med STRUCTURE-analys med $K=2$ utan förhandsinformation om populationstillhörighet för simulerade (A) karelska vargar och (B) litauiska vargar tillsammans med simulerade hundar, F1, F2 och åter korsningar mellan F1 och hund (F1xH)

samt mellan F1 och varg (F1xV). De streckade linjerna motsvarar tröskelvärden 85%, 90% och 95% för att bestämmas till ettdera klustret.

Ett antagande vid STRUCTURE-analys är att populationerna som samplas är i Hardy-Weinbergjämvikt. F_{IS}-studierna visade dock tydligt att hundarna avviker från Hardy-Weinbergjämvikt. Detta är inte oväntat eftersom flera raser är representerade i referensmaterialet och genflödet mellan raser är mycket begränsat. Det är okänt om denna differentiering mellan hundraser påverkar möjligheten att identifiera hybrider, men användandet av $K > 2$ förbättrade inte modellerna avsevärt. I fallet med de karelska vargarna innebar en modell med $K = 3$ att hundarna delades upp i två relativt distinkta grupper. Slutsatserna om djurparksvargarnas tillhörighet med vargklustren påverkades dock inte i detta fall.

NEWHYBRIDS-analys

För en mer detaljerad beräkning av sannolikheterna att gruppera med hela eller korsningar mellan vargar och hundar användes ytterligare en modellbaserad (Bayesiansk) grupperingsmetod som utförs med programmet NewHybrids 1.1. (Anderson och Thompson 2001). Simuleringen av föräldrapopulationer resulterade i att 97% av alla simulerade vargar (karelska och litauiska) och hundar grupperades korrekt med ett tröskelvärde på $p = 0.85$. De simulerade F1:orna grupperades korrekt i endast 48% och 40% av fallen för karelska respektive litauiska hybrider. Detta visar att det redan vid första generationens hybridisering är svårt att säkert bestämma att exakt vilken hybridklass en individ tillhör. Ingen av de simulerade F1:orna grupperades dock med $p > 0.85$ till föräldrapopulationerna. Bland de simulerade återkorsningarna till varg (F1xV) klassificerades 6% och 0% korrekt, medan 4% och 16% av de simulerade återkorsningarna med karelska respektive litauiska vargar klassificerades felaktigt till föräldrapopulationerna. Bland djurparksvargar klassificerades alla utom Laika till vargpopulationerna med en sannolikhet $p > 0.85$ (Tabell 4). Laika visade dock fortfarande en högre sannolikhet att tillhöra varggruppen med en sannolikhet $p = 0.616$ (Tabell 4), lägre än tröskelvärden.

Utvärdering av mtDNA

Med mitokondriella markörer (som nedärvs maternellt) är det möjligt att utvärdera 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 hund. Två komplementerande sekvenser från mtDNA har därför tagits fram för djurparksvargarna och jämförs med publicerade sekvenser i GenBank samt sekvenser hos referensindividerna i studien. Sekvenserna visar att Tyra, Gaisma och Tarja bar på samma haplotyp och matchar på 486 (166+317) baser med haplotypen FJ978010 (; åtkomstnummer i NCBI's GenBank). Haplotypen kallas även "w1" i Pilot m.fl. (2010). Denna haplotyp har observerat bland vargar från Skandinavien, Finland, Ryssland, Ukraina, Vitryssland, Estland, Lettland och Polen. Laika bar dock på en haplotyp som observerat både bland hundar (t.ex. AB605514) och vargar (däribland FJ978006; kallad w4 i Pilot et al 2010). Bland vargar har haplotypen observerats i Vitryssland, Ukraina, Ryssland, Rumänien, Bulgarien och Grekland (Pilot et al 2010). De mitokondriella markörerna avslöjar alltså inte på några säkra indikationer på att vargarna är ättlingar till någon hundtik (åtminstone inte några få generationer tillbaka i tiden) även om det föreligger osäkerhet hos Laika.

Sammanfattning och Slutsats

Tre grundare och en avkomma till en grundare av den skandinaviska djurparksstammen har analyserats på 27 autosomala mikrosatelliter och två sekvenser av mitokondriellt DNA. Ändmålet var att utreda ifall hybridisering med hund en eller flera generationer tillbaka kan påvisas hos djurparksvargarna. Studien visar att varg och hund är genetiskt differentierade, vilket är en förutsättning för att identifiera hybrider dem emellan. I referensmaterialet har vargar från tre olika geografiska områden använts, däribland ryska Arkhangelsk, ryska Karelen och Litauen. Vargarna

från olika geografiska områdena visade genetisk differentiering och alla djurparksvargarna visade störst likhet med vargar från Karelen och/eller Litauen.

För att undersöka om djurparksvargarna bar på genetiskt material från både varg och hund eller bara en av dem utfördes en klusteranalys i STRUCTURE. Djurparksvargarna visade från denna en tydlig gruppering med varg ($0.995 > q_i > 0.943$, vilket anger andelen av en individs arvs massa som beräknas härsamma från varg). Det finns dock en osäkerhet i de uppskattade q_i -värdena och det går inte säkert att utesluta att q_i för två av djurparksvargarna (Laika och Tyra) ligger utanför tröskelvärdet $q_i = 0.85$ för säker artbestämning till varg (Tabell 4). Med det använda tröskelvärdet förväntas nära 100% av alla förstagenerationshybrider identifieras, medan andelen identifierade tillbakakorsning mellan F1 och varg beräknas till 72-88%.

Den mer detaljerade undersökningen av sannolikheterna för djurparksvargarna 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 tre av fyra vargar visade tydlig samhörighet med varg. Återigen visade dock Laika på lägre (om än högst) sannolikhet att gruppera med varg (Tabell 4). Med användandet av litauiska vargar som referenser visade Laika en hög ($p > 0.85$) sannolikhet att komma från varg medan användandet av karelska vargar som referens gav en lägre sannolikhet ($p = 0.616$). Laika visade med karelska vargar som referens på en 25 procents sannolikhet att vara en återkorsning mellan varg och hund.

Mitokondriellt DNA avslöjar moderslinjens ursprung och sekvensen från 486 baspar från mitokondrien visade alla utom Laika på förekomsten av en haplotyp som endast påträffats hos varg och är vanligt förekommande i norra Europa. Även Laika visa på en haplotyp som på de 486 basparen är vanligt förekommande bland vargar i Europa, men den erhållna sekvensen har även observerats bland hundar. Längre sekvenser behöver analyseras för att säkert bestämma om mtDNA-haplotypen från Laika är vargspecifik.

Slutsatsen är därmed att tre av djurparksvargarna (Tyra, Gaisma och Tarja) inte visar några indikationer på av vara förstagenerationshybrider (F1) eller andragenerationshybrider (F2 eller F1 x varg). Det är dock svårare att dra några slutsatser om den fjärde djurparksvargen Laika. Det finns inga direkta indikationer på att Laika är hybrid samtidigt som hon visar otydlig gruppering med vargarna i referensmaterialet. Det är svårt att säga om detta är en indikation på om Laika bär på genetiskt material från hund längre bak i generationerna eller om hon kommer från en vargpopulation mer kraftigt differentierad från karelska och litauiska vargar än de andra tre vargarna. Visst stöd för det senare är det faktum att Laika är den enda vargen som inte kommer från de baltiska länderna utan avsevärt längre in österut. Detta skulle kunna innebära att de två använda referenspopulationerna är olämpliga för hybridanalys av Laika. Bättre kunskap om den genetiska populationsstrukturen bland vargar i Ryssland är alltså nödvändig för att ge bättre svar på Laikas genetiska härkomst.

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

Drummond AJ, Ashton B, m.fl. 2011. Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com>

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).

- Excoffier, L och Lischer HEL. 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
- 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.
- Goudet J. 1995. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- 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.
- Michalakis, Y and Excoffier, L. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics* 142:1061-1064.
- Neff et al. 1999 A Second-Generation Genetic Linkage Map of the Domestic Dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 151:803-820
- 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.
- Pilot, M, Branicki, W, m.fl. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology* 10:104
- 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.
- 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
- Vilá C, Savolainen P, Maldonado JE, m.fl. 1997 Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* 276, 1687-1689.

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