

Genetisk bakgrunn hos ulv (*Canis lupus*) i Norge og Skandinavia

Morten Skage¹, Julia MI Barth¹, Sissel Jentoft¹, Øyvind Øverli² og Kjetill S Jakobsen¹

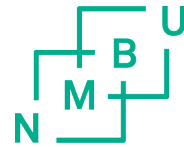
¹Senter for økologisk og evolusjonær syntese, Institutt for biovitenskap, Universitetet i Oslo, Oslo

²Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi, Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Ås



UiO : Universitetet i Oslo

CEES
Centre for Ecological and
Evolutionary Synthesis



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Forord

Utseende og atferd hos enkeltindivider av frittlevende ulv (underart *Canis lupus lupus*) i Norge har ført til mistanke om hybridisering med hund (underart *Canis lupus familiaris*). Dette er basert på hendelser og erfaringer fra fastboende i forvaltningsområdet for ulv, brukere av skogen, og ikke minst tilgjengelig fotografisk dokumentasjon av utseende av felte skadedyr.

Utseendemessige trekk som gul farge, runde øyne, smal hodeform etc. kan gi mistanke om innslag av gener fra tamme hunderaser, eller, hva gjelder farge, ulv fra geografisk fjerntliggende områder. Fra andre europeiske land er hybridisering med hund veldokumenterte (se Andersone mfl 2002, Randi mfl 2000, Hindrikson mfl 2012), men fra Skandinavia kjenner man kun til en førstegenerasjon krysning fra Østfold (Vila mfl. 2003b).

For å avklare i hvor stor grad hund er krysset inn i skandinavisk ulv ble sekvenserings-senteret ved Universitetet i Oslo (UiO) kontaktet for å utføre hel-genomsekvensering av et antall frittlevende individer, samt analysere materialet opp imot referanse hund og antatt ren-raset ulv. Kjente hybrider fra Skandinavia var også tenkt inkludert, men materialet fra disse var dessverre ikke mulig å skaffe tilveie i løpet av prosjektperioden.

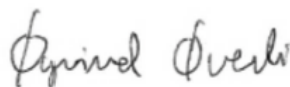
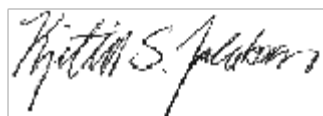
Dette prosjektet var kun mulig å gjennomføre om Rovdata/NINA/Skandulv stilte aktuelt prøvemateriale tilgjengelig for analyse. Det har blitt gjort uten føringer. På samme måte har prosjektet fått tilgang til historisk materiale fra ulv fra Naturhistorisk Museum, Oslo. Dette innbefatter de siste registrerte ulver fra den opprinnelige populasjonen i Norge. Vi takker Dr. Øystein Flagstad (NINA/Rovdata) og Prof. Øystein Wiig (NMH) for samarbeidet. Det russiske referansematerialet ble fremskaffet gjennom samarbeid med Russland som gav mulighet for prøvetaking av viltlevende ulv fra Sibir. Dette referansemateriale ble også verifisert gjennom morfologisk (utseendemessig) analyse, i regi av samarbeidspartnere. Vi takker Dr. Dmitry V. Politov (Russian Academy of Sciences) mfl. for samarbeidet. Vi takker også Dr. Barbora C. Bolfíková for prøver av ulvehund og karpatisk ulv. Til slutt vil vi takke Nordskog med samarbeidspartnere for økonomisk støtte til prosjektet.

Undersøkelsen er et samarbeidsprosjekt mellom UiO og NMBU, og finansiert ved hjelp av en gave til UiO, gitt av Nordskog, og egne midler. Norsk sekvenseringssenter (NSC) v/Morten Skage har vært ansvarlig for prøveopparbeidelse og DNA sekvensering. Dr. Julia M. I. Barth, ved Senter for økologisk og evolusjonær syntese (CEES), UiO har vært ansvarlig for de bioinformatiske genomanalysene. Rapporten er organisert i en kortversjon med konklusjoner og anbefalinger, og en mer detaljert rapport med utførlig beskrivelse av metoder og analyseparametre summert i to bilag samt en litteraturgjennomgang av Øyvind Øverli (NMBU) om geografisk opprinnelse.

Oslo, 08/12-16

Prof. Kjetill S. Jakobsen
CEES, Inst for Biovitenskap,UiO

Dr. Øyvind Øverli
Inst. for mattrygghet og infeksjonsbiologi, NMBU



Innholdsfortegnelse

Kort rapport	s. 3
Lang rapport	s. 5
Bilag 1: Utførlig beskrivelse av materiale, metoder og resultater (engelsk)	s. 12
Bilag 2: Tabell over individer	s. 18
Bilag 3. Fotografisk dokumentasjon	s. 19
Bilag 4. Litteraturgjennomgang geografisk opphav	s. 20

Kort rapport:

Sammendrag, resultater og anbefaling om fremtidige undersøkelser

Formålet med denne undersøkelsen var å identifisere mulige kryssninger mellom hund og ulv i dagens skandinaviske ulvebestand. I tillegg ønsket vi å finne ut i hvor stor grad det er mulig å gjenkjenne innblanding av hund i ulvens arvemateriale (hybridisering og tilbake-kryssninger). Metodene som vi har anvendt i undersøkelsen er dyrere og mer tidkrevende enn det dagens forvaltningsmetodikk legger opp til (mikrosatelittanalyse), men gir bedre oppløsning over hele arvemassen og muliggjør deteksjon av svake hybrid signaler.

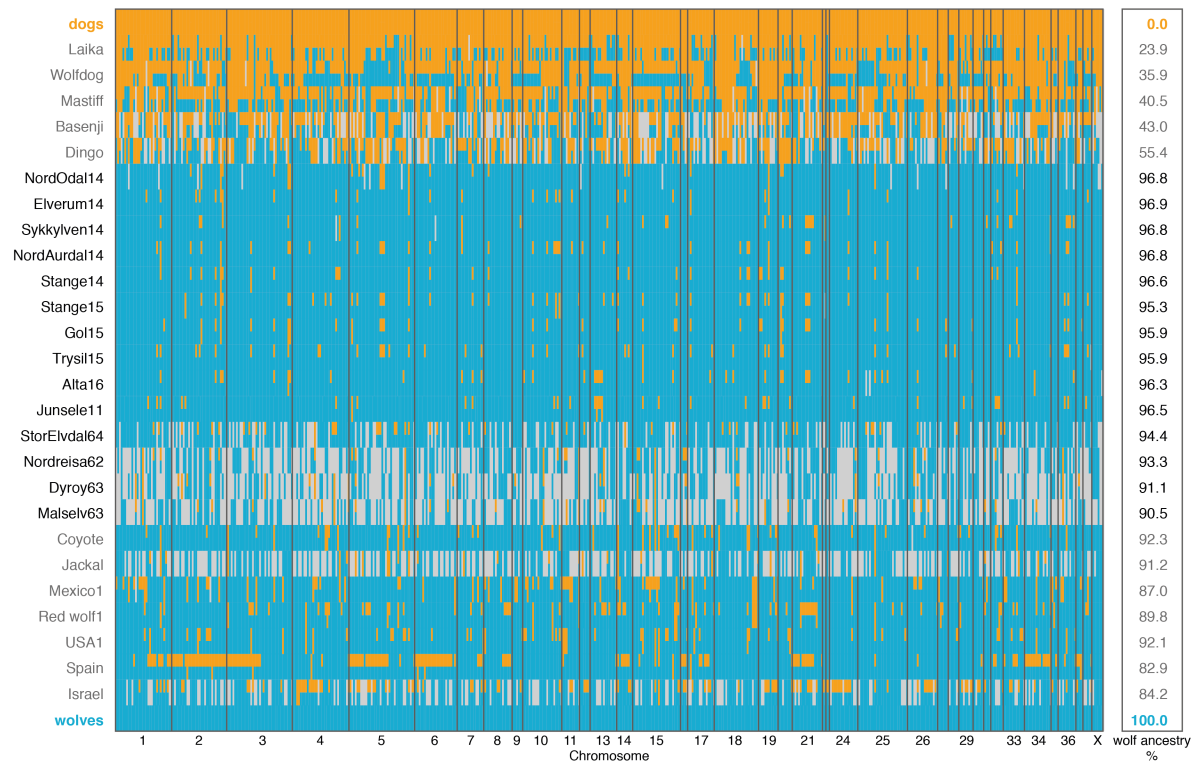
Analysene er basert på data fra hel-genomsekvensering av ulv (dagens skandinaviske bestand og andre ulv), historisk ulv (Nordreisa 1962, Dyrøy 1963, Målselv 1963, og Stor Elvdal 1964), ulvehund (tsjekkisk ulvehund), primitive hunderaser (dingo, basenji, tibetansk mastiff) og moderne hunderaser (boxer etc), alle med ulik geografisk opprinnelse. De norske individene som er sekvensert i denne undersøkelsen kommer alle fra svenske føderer, men har lagt ut på vandring og blitt avlivet i Norge (Stange, Nord-Odal, Sykkylven, Elverum og Trysil), og inngikk i det som betraktes som en felles skandinavisk bestand. Våre analyser viser:

- Den skandinaviske bestanden grupperer sammen med andre europeiske ulver, og ulver fra Asia, kalt «old world gruppen» i PCA (bilag1)
- Nylig hybridisering mellom ulv og hund ble ikke påvist.
- Genetiske analyser indikerer historisk innblanding av hund i alle analyserte ulver, også i skandinavisk bestand, men det er ikke mer innslag av hund i skandinavisk bestand enn hva som er funnet i andre populasjoner.

Det er ikke kontroversielt at man finner noe innslag av hund i ulvens arvemasse. Det ligner resultater man har funnet i andre studier (se figur 1 og lang rapport). Denne innblandingen av hund i ulv er av eldre karakter og reflekterer trolig ulvens og hundens særegne historiske og evolusjonære utvikling. Per dags dato foreligger det ikke tallmateriale på antallet ulver som har eller har hatt et avvikende utseende i den nye bestanden, men det synes klart at noen dyr har påfallende fenotypiske trekk (for eksempel gul farge). Bedre forståelse av fenotypiske karaktertrekk kan man kun få med inngående genetiske studier, hvor også geografisk opprinnelse blir tatt hensyn til.

Det geografiske opphavet til nåværende ulvestamme er angitt å være finsk/russisk (Vila mfl 2003a, Flagstad mfl 2003). Y-kromosom studier har vist at det er relativt liten sannsynlighet for en østlig opprinnelse da ingen av haplotypene funnet i dagens bestand gjenfinnes i mulige opprinnelsespopulasjoner (Sundquist et al 2001). Til tross for at de fleste dyr i skandinavisk bestand deler mange alleler med finske og russiske dyr, har inngående analyser av mikrosatellitter heller ikke klart å fastslå med sikkerhet opprinnelsen til hanndyrene som gav opphavet til de nye Kynna og Galven revirene i 2007/08 (Åkesson & Bensch 2010). På grunn av manglende geografisk dekning på prøvematerialet vi hadde til disposisjon var denne problemstillingen ikke mulig å undersøke i vår studie. Denne studien (i tråd med andre

studier) viser at det er mulig å påvise innblanding av hund i ulv. I de prøvene av ulv vi har hatt tilgang til her, er dette imidlertid gamle evolusjonære hendelser som er felles for de fleste ulvepopulasjonene vi kjenner i dag. På en annen side viser en helt ny studie fra Kina at hybridisering mellom tibetansk ulv og mastiff er årsaken til denne mastiff-rasens tilpasning til ekstrem høyde (Miao mfl 2016). I et slikt lys er det uavklarte spørsmålet rundt hva som forklarer det særegne utseendet som er observert i noen av dyrene i dagens skandinavisk bestand, sammenlignet med den opprinnelige stammen og den antatt upåvirkede populasjonen i Jakutsk-området.



Figur 1 viser fikserte (ikke variable) forskjeller mellom hund (oransje) og ulv (blå) og prosentdel av fikserte forskjeller. Det er ingen indikasjon på nylig hybridisering i de skandinaviske ulvene basert på dette materialet. Se lang rapport og bilag for detaljer.

På basis av vår undersøkelse anbefaler vi derfor følgende mulige framtidige undersøkelser:

- Innsamling og sammenligning av prøver for å fastslå eksakt geografisk opphav til dagens bestand.
- Genetiske analyser for å finne årsak til avvikende fenotyper og atferd.
- Identifisering og datering av tidlig introgresjon av hund i skandinaviske ulver.
- Gjenta analysene foretatt i denne pilotundersøkelsen, og utvide med tilleggs-analyser for å finne markører og gener under seleksjon.
- Populasjonsgenomisk undersøkelse av en antatt vill bestand (Jakutsk) for å etablere genetiske referanseverdier (heterozygoti, fikserings indeks (F_{ST}) og evt. linkage disequilibrium).
- Utvikle et forbedret DNA markør sett for bestandsovervåkning basert på ny genetisk kunnskap.

Lang rapport:

Detaljert beskrivelse av resultatene og diskusjon av uløste spørsmål

Introduksjon

Bilder av ulv som har gitt opphav til spekulasjoner om hybridisering med tamme hunderaser er lett tilgjengelige på Internett. Den såkalte "Junseletiken", en svensk ulv som ble merket, fotografert, og flyttet flere ganger er et eksempel (figur 2). Utseende avviker fra det som er forventet hvis en sammenligner med vanlige oppslagsverk for nordisk fauna, der fremheves grått innslag i pels (dyret heter grey wolf på engelsk), distinkt svart skjold over ryggen og svart stripe på forbena, gule skrått stilte øyne, og et bredt kraftig hode.



Figur 2. Bildet viser den noe avvikende pelsfargen på den mye omtalte «Junseletiken» fra Sverige. Ulven forsvant sporløst i 2014. DNA fra denne ulven er inkludert i våre analyser (Junsele11). Foto: Naturvårdverket.

Hybridisering eller kryssing av arter er mere vanlig i naturen enn man skulle tro, spesielt mellom arter som har kommet relativt kort i sin artsdannelse eller som følge av sekundær kontakt mellom arter som tidligere har vært geografisk isolerte (se Mallet 2007 med referanser). Dette gjelder også for hund og ulv, som jo opprinnelig er samme art. I tillegg må det tas hensyn til at hunden har vært avlet i flere tusen år for ulike egenskaper og utseende, og at man derfor har isolert populasjonene ytterligere. Likevel er ulvens og hundens arvemateriale temmelig like (Lindblad-Toh mfl 2005). Gitt de store forskjellene i utseende og atferd innen og mellom hund/ulv (kalles for fenotyper) virker dette kanskje noe rart, men man vet at relativt store fenotypiske endringer kan oppnås med veldig små endringer i arvematerialet (dvs endringer helt ned i et basepar i DNAet). Vanligst er det imidlertid at flere

gener samvirker på uttrykning av fenotypen. I tillegg kan et sett av regulatoriske gener komme på toppen av dette. Det kompliserer bildet ytterligere at ulike egenskaper ofte nedarves sammen, for eksempel påvises ofte sammenhenger mellom fargemønster, atferd, og motstandsdyktighet mot stress, sykdom og parasitter (Kittilsen mfl., 2012).

Tradisjonelt metodikk for genetisk overvåkingen av ulv og andre bestander (bjørn, fisk etc) gjøres ved hjelp av mikrosatellitt-analyser. Dette er kartlegging av ulike repeterte DNA-sekvenser, for eksempel GTG-GTG-GTG-GTG, hvor individene har en utgave arvet fra mor og en fra far, med enten like eller ulike antall av disse repeterte områdene (genotype), for eksempel (GTG)² eller (GTG)⁴. Totalt bruker man omtrent 19-30 forskjellige slike DNA markører (mikrosatellitter) til å fastslå slektskapet helt ned på familie- og individnivå (Åkesson mfl 2015). Metoden fungerer godt, er billig og rask, men har sin begrensning da man bare undersøker små fragmenter av arvemassen, og ikke større sammenhengende biter. Man får derfor ingen tilleggsinformasjon som man får ved helgenomsekvensering (Luikart mfl 2003). I tillegg til mikrosatellitter brukes DNA-sekvensering av deler av mitokondriegenomet som en markør. Mitokondriene nedarves via moren, og man kan derfor følge mor-linjens ulike typer innen og mellom populasjoner.

En mer helhetlig og grundig kartlegging av alle basepar i hele arvemassen kan gjøres med såkalt hel-genomsekvensering. Her sekvenseres korte deler av DNAet i stort antall og hver enkelt base sekvenseres minst 30 ganger for å være sikker på resultatet. Alle disse enkeltbitene settes deretter sammen ved hjelp av bioinformatiske metoder til større sammenhengende områder (f.eks kromosomer). På denne måten får man kartlagt hele arvemassen innen relativt kort tid. Da vil man også få informasjon om ulike gener og dens varianter på en effektiv måte. Fordelen er at alle individer er representert på samme måte, uavhengig om individene er fra ulike regioner av verden, eller er nært eller fjernt beslektet. Ulempen er selvsagt at dette er relativt dyrt og tidkrevende å gjennomføre sammenlignet med standard overvåkningsmetodikk, men er trolig den eneste metoden egnet for å kartlegge nært beslektede arter, dens varianter og geografisk opprinnelse på en måte som kreves i dette tilfellet.

Ulven i Skandinavia var antatt utdødd på 60/70 tallet, men en reetablering fra ikke-stedegen stamme skjedde på tidlig 80 tallet (Wabakken mfl. 2001). Etter vellykkede ynglinger på midten av 80 tallet, ble det ny kryssing med en nyankommet hanulv i 1991, og deretter ikke før i 2008 med to nye hanulver. Totalt sett angis at den nålevende populasjonen bidrag fra kun 6 dyr, hvor de opprinnelige grunnleggerne fra -80 og -90 tallet fortsatt bidrar med til sammen 95% av den genetiske variasjonen (Jansson et al., 2015). Også andre studier konkluderer med at det meste av ulvestammen i Skandinavia kan føres tilbake til disse hovedaktørene (Liberg 2005). I tillegg har det vært observert andre enkeltindivider på ulike tidspunkt, som ikke har ynglet. Som en følge av dette er dagens ulvestamme relativt innavlet, og dermed genetisk homogen (Sundqvist mfl 2001, Vila mfl 2003a, Liberg 2005, Åkeson 2015). Se ytterligere detaljer i avsnitt om geografisk opprinnelse (bilag 4).

De norsk-svenske forskningsmiljøene har felles tilbakevist muligheten for innblanding av hund i dagens frittlevende skandinavisk stamme. I dokumentet «*De skandinaviske vargarnas ursprung*» av Åkesson mfl. (2014) er mye av det genetiske arbeidet på den skandinaviske stammen gjennomgått i relasjon til andre tilfeller av hybridisering. Alle arbeidene er basert på mikrosatellitter og/eller mtDNA sekvensering.

Formålet med denne undersøkelsen er å teste ut om alternative genetiske metoder er velegnet til å fremskaffe informasjon om grad av hybridisering, og om disse er nødvendige for å kunne forklare avvikende utseende og atferd i den Skandinaviske ulvestammen.

Resultater og diskusjon

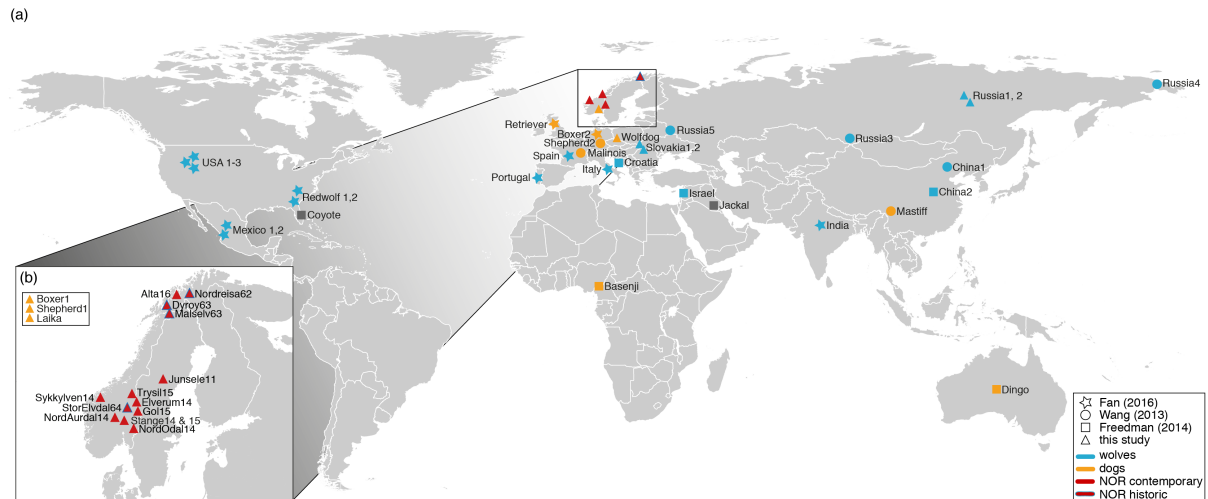
Opprinnelig var studien begrenset til sekvensering av ni dyr til 30 ganger sekvenseringsdybde. I alt er det sekvensert tre hunder, en tsjekkisk ulvehund og 18 ulver (tabell 1). I tillegg har vi hentet inn data publisert i andre studier fra Genbank. I alt fire historiske prøver fra opprinnelig ulvestamme er sekvensert. Totalt analysemateriale utgjør derfor 45 individer (se figurer i bilag 1 og komplett tabell i bilag 2). Utførlig beskrivelse av metode og analyser er tilgjengelig i bilag 1.

Tabell 1. Oversikt over sekvenserte hunder og ulver i denne undersøkelsen.

Name	ID	Føderevir	Tilleggsinfo
Elverum14	M492332 (rovbase)	Tansen 2	Skutt på reveåte, Elverum, 2014.
NordOdal14	M406740 (rovbase)	Kläggen	Felt under jakt, Nord-Odal, jan 2014.
Sykkylven14	M407048 (rovbase)	Tiveden	Skadefelling, Sykkylven, jun 2014.
NordAurdal14	M407468 (rovbase)	Skugghöjden	Skadefelling, Nord-Aurdal, des 2014.
Stange14	M407452 (rovbase)	Olsjöen 1	Felt under jakt, Stange, des 2014.
Stange15	M407842 (rovbase)	Djurskog 3	Skadefelling, Stange, mai 2014.
Gol15	M408263 (rovbase)	Gimmen 3	Felt under jakt, Gol, okt 2015.
Trysil15	M491983 (rovbase)	Immigrant	Illegalt avlivet, Trysil, des 2015.
Alta16	M492204 (rovbase)	Immigrant	Døde av ukjente årsaker, Alta, apr 2016.
Junsele11	M-11-14 (merke)	Immigrant	Junsele tiken, forsvant 2014.
Nordreisa62	175-64 (museum)	ikke kjent	Ulv fra museum, Nordreisa, 1962.
Dyroy63	176-64 (museum)	ikke kjent	Ulv fra museum, Dyrøy, 1963.
Malselv63	177-64 (museum)	ikke kjent	Ulv fra museum, Målselv, 1963.
StorElvdal64	19-64 (museum)	ikke kjent	Ulv fra museum, Stor-Elvdal, 1964.
Russia1	ikke listet	Jakotsk sør	Lovlig jakt, Jakotsk, 2016.
Russia2	ikke listet	Jakotsk nord	Lovlig jakt, Jakotsk, 2016.
Slovakia1	ikke listet	ikke kjent	Ulv fra Slovakia.
Slovakia2	ikke listet	ikke kjent	Ulv fra Slovakia.
Boxer1	NO54977/14 (NKK)	Norge	Hund fra Norge, Boxer.
Shepherd1	NO34013/09 (NKK)	Norge	Hund fra Norge, Schäfer.
Laika	NO43990/10 (NKK)	Norge	Hund fra Norge, Vestsibirsk laika.
Wolfdog	ikke listet	Tsjekkia	Ulvhund fra Tsjekkia.

Individene er spredt jevnt geografisk, med hovedfokus på Skandinavia (figur 3). Da vi ikke har vært i stand til å skaffe tilstrekkelig materiale fra finsk/russisk område er geografisk opphav som egen analyse utelatt fra undersøkelsen.

Gjennomsnittlig dekning på hele arvemassen for hele datasettet er 21,1. Prøver sekvensert fra nålevende populasjon er dekket 30 ganger. Som forventet har de historiske prøvene noe manglende data (10-16x), men genomet er likevel dekket i tilstrekkelig grad til at disse kan inkluderes i våre analyser.



Figur 3. Kart med omtrentlig stedsangivelse på ulvene som er inkludert i denne undersøkelsen (a) verden, (b) Skandinavia.

Fra PCA analysen (forklart i bilag 1) ser vi at hund og ulv er klart separert basert på genetisk variasjon langs første akse (PC1), og at ulv fra Europa/Asia (old world) og Amerika (new world) er skilt fra hverandre langs den andre aksene (PCA2). Skandinavisk ulv grupper som forventet i lag med de andre europeiske ulvene. Alle primitive hunder og ulvehund, til tross for kjent innblanding av ulv, grupperer i lag med de moderne hunderasene, men det er større genetisk variasjon innen denne gruppen (se bilag 1).

Vi har ikke funnet indikasjoner på at historisk materiale er kontaminert med nålevende ulv da typiske skademønstre for DNA i slike prøver gir en spesifikk signatur (ikke vist men, tilgjengelig hvis ønskelig) Historisk ulv er forskjellig fra nåværende stamme. Et individ (StorElvdal64) fra Stor-Elvdal har en avvikende mtDNA haplotype og grupperer med tre andre nye immigranter. Vi anbefaler at alt historisk materiale samles inn på nytt (hvis mulig), og at spesifikke rutiner og laboratorier egnet for historisk DNA benyttes for å verifisere resultatet. UiO har et nytt «state of the art» laboratorium egnet for dette.

Når vi ser på fikserte forskjeller mellom hund og ulv er det tydelig at hund har større andel mutasjoner fra ulv enn omvendt (Figur 1). Dette reflekterer trolig deres historie med felles forfar og at ulv trolig er krysset inn i hund oftere enn omvendt. Admixture-analysen, og de andre analysene, kan ikke påvise nylig hybridisering (første-, annengenerasjon eller tilbakekryssing (F1+ulv eller hund)) mellom hund og ulv i Skandinavia. Man kan imidlertid påvise innblanding av hund i ulv, men dette er eldre hendelser som er felles for de fleste ulvepopulasjonene vi kjenner i dag. Se bilag 1 for detaljer. Hva som forklarer det særegne utseendet til enkelte individer av dagens skandinavisk ulv, jfr den opprinnelige stammen og den antatt upåvirkede populasjonen i Jakutsk-området, er derfor fortsatt uklart.

Å skille ulv og hund genetisk er vanskelig gitt hundens historie med flere tilfeller av innblanding av ulv fra ulike populasjoner (og vice versa), fulgt av episoder hvor populasjonene har gått gjennom ulike «flaskehals hendelser», i tillegg til senere og pågående hybridisering mellom disse to underartene (vonHoldt mfl 2010, 2011, Freedman mfl 2014, Fan mfl 2016). Å lage en metode for skille nylige hybrider og tilbakekryssinger kan derfor være vanskelig basert på et begrenset antall DNA markører. For hund/ulv kompliseres dette

ytterligere av at artene er nært beslektet. Basert på resultatene fra PCA og admixture-analysen av komplette genomer er det rimelig å konkludere at dagens ulvestamme ikke er et resultat av nylig hybridisering mellom hund og ulv. Som for de fleste andre ulvepopulasjoner i verden er det indikasjoner på mindre innblanding av hund, men som nevnt over har dette trolig skjedd en eller flere ganger gjennom disse to artenes historie (Freedman mfl 2014, Fan mfl 2016). Det faktum at dagens populasjon er innavlet gjør det også veldig enkelt å oppdage nye alleler og allel kombinasjoner (innvandring eller hybridisering) v.h.a. av tradisjonell metodikk, men å avdekke hybrider ut over første og andre generasjon er derimot krevende (Vila mfl 2003b, Verardi mfl 2006, Godinho mfl 2011). Troverdige resultater kan kun oppnås ved bruk av mange loci med tilstrekkelig variasjon i allelfrekvens mellom ulv/hund populasjonen (Godinho mfl 2011, Randi mfl 2014). Basert på mikrosatellitter har ulv relativt få fikserte/private alleler, og mindre enn hund (Godinho mfl 2011, Randi mfl 2014). Av samme grunn er tilbakekrysninger med hund noe vanskeligere å detektere en tilbakekrysning med ulv. En alternativ metode til mikrosatellitter er å bruke enten et fullt eller redusert SNP chip sett utviklet for hund. Et redusert sett med 24 -100 SNPs ble brukt til å identifisere hybrider ned til 3 og 4 generasjoners tilbakekrysning, men siden ingen av mutasjonene var fikserte var det overlappende allelfrekvenser mellom de rene artene og sterkt tilbakekryssede individer (vonHoldt mfl 2013).

I vår analyse har vi imidlertid identifisert et større antall fikserte posisjoner basert på helgenom-analysen, dvs loci der ulv og hund ikke varierer men samtidig er ulike artene i mellom. Dette er en effektiv måte å spore rekombinasjon i potensielle hybrider (vonHoldt mfl 2013). Vi ser for eksempel at Tsjekisk ulvehund består av mix av hund og ulv, men at dette ikke er tilfelle for de skandinaviske ulvene. De «primitive» hundene (Dingo, Basenji, Tibetansk mastiff) har også noe høyere innslag av ulv enn de andre hundene. Spansk og israelsk ulv har høyere innslag av hund i seg (se bilag 1 for tallmateriale), hvilket også bekreftes av en annen studie på de samme individene. Her fant man at spansk og israelsk ulv hadde med hhv 25% og 23% hund iblandet genomet (Fan mfl 2016). Dette tilsvarer trolig en F1 generasjon tilbakekrysset med ren hund eller ulv. Vi kan ikke se tilsvarende tall og mønstre for skandinavisk ulv. Skandinavia skiller seg merkbart fra Øst og Sør-Europa ved at det er langt mellom individene, samtidig som det er lite løse hunder å pare seg med. Følgelig er det vanskelig å opprettholde en stor tilstedeværelse av hybrider, hvilket støttes av at nåværende populasjonen over lang tid har vært innavlet. Vi har dessverre ikke klart å fremskaffe materiale for den kjente hybriden fra Norge for verifikasjon av nylig hybridisering (Vila mfl 2003b), men vi er i gang med å sjekke om forskere ved Uppsala kan ha noe materiale liggende.

Tilgangen til DNA-data fra helgenomsekvensering gir uante muligheter til å studere ulike seleksjonsprosesser i naturlige populasjoner (Luicart mfl 2003, Hagenblad mfl 2009). Det gir mulighet for å identifisere genvarianter med additive egenskaper som kan drive seleksjonen, for eksempel i en bestemt retning slik at visse fenotyper blir vanligere enn andre. Hvorvidt genetisk bidrag av hund i nålevende ulv er en form for retningsbestemt tilpasning som kan øke overlevelsen i et menneskepåvirket miljø er et interessant spørsmål som burde stå sentralt i ulveforvaltningen. Slike individer kan ha en selektiv fordel, for eksempel ved at de er mindre

sky, og derfor heller ikke blir like forstyrret av menneskelig nærvær som helt ville ulver. Det forutsetter imidlertid at avkom av parring mellom ulv og hund er i stand til å overleve i naturen og selv produsere avkom, enten med andre hybrider eller med ren-rasede individer. Slik hybridisering forekommer i mange europeiske land, og er nevnt som en relevant trussel mot bevaring av naturlig genetisk mangfold. I Italia og på den iberiske halvøya ligger hybridiseringsraten mellom 4-5% for første og annen generasjon hybrider (Verardi mfl 2006, Godinho mfl 2011), men nylig ble det kjent at hele 87% av ulvene i to mistenkte hybridpopulasjoner i Italia trolig er tilbakekrysset, mens andelen F1/F2 i samme flokkene var er omlag dobbelt så høy (12,5%) som tidligere rapportert for tilsvarende områder (Randi mfl 2014). Hvordan overlevelsen på slike tilbakekryssede individer ville vært i Skandinavia er usikkert, men det ville i hvert fall ha klare forvaltningsmessige konsekvenser. Følger av hybridisering på ulikt nivå er lite diskutert i Norge, men det foreligger sterke anbefalinger fra vitenskapelig hold om at eventuelle frittlevende hybrider ikke tillates å reproducere. En sikker bekreftelse og avklaring på hybridstatus er helt nødvendig for å kunne ta stilling til eventuelle forvaltningsmessige konsekvenser en slik utvikling vil ha.

En ytterligere avklaring på avvikende fenotyper (utseende og atferd), og den genetiske forklaring på dem bør ses i sammenheng med innblanding av hund (f.eks Anderson mfl 2009), selv om det strengt tatt ikke trenger å være en slik kobling på alle fenotyper. Det som imidlertid er sikkert er at denne undersøkelsen med sin nye tilnæringsmåte er et første steg i en prosess for å teste ulike forklaringsmodeller på sammenhengen mellom genotyper og fenotyper i den skandinaviske ulvestammen. For eksempel har preliminære undersøkelser av gener som bestemmer pelsfarge gitt indikasjoner på at den omtalte gule fargen på Julesele 11 kan skyldes en genvariant som også gir beige farge hos hunder. Inngående undersøkelser er nødvendig for å verifisere dette funnet, men det viser viktigheten av å bruke egnet metodikk til rett problemstilling. En egen rapport om geografisk opphav for nålevende skandinavisk stamme (litteraturgjennomgang, bilag 4) viser at det er ubesvarte spørsmål vedrørende dette, og vi anbefaler at fremtidige undersøkelser har som mål å undersøke dette nærmere.

Referanser

- Anderson TM, vonHoldt BM, Candille SI mfl, 2009. Molecular and evolutionary history of melanism in North American gray wolves. *Science* 323: 1339–1343.
- Andersone Z, Lucchini V, Randi E, Ozolins J, 2002. Hybridisation between wolves and dogs in Latvia as documented using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Mammal Biology* 67: 79–90.
- Ellegren H, Savolainen P, Rosen B, 1996. The genetical history of an isolated population of the endangered grey wolf *Canis lupus*: A study of nuclear and mitochondrial polymorphisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series Biological Sciences* 351: 1661-1669.
- Fan Z, Silva P, Gronau I mfl, 2016. Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves. *Genome Research* 26: 163–173.
- Flagstad Ø, Walker CW, Vilà C mfl, 2003. Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular Ecology* 12: 869-880.
- Freedman AH, Gronau I, Schweizer RM mfl, 2014. Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genetics* 10: e1004016.

- Godinho R, Llaneza L, Blanco JC mfl, 2011. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 20: 5154-5166.
- Hagenblad J, Olsson M, Heidi G, Parker HG, 2009. Population genomics of the inbred Scandinavian wolf. *Molecular Ecology* 18: 1341-1351.
- Hindrikson M, Peep M, Ozolins J, Krzywinski A, Saarma U, 2012. Bucking the trend in wolf-dog hybridization: First evidence from Europe of hybridization between female dogs and male wolves. *PLoS One* 7: e46465.
- Kittilsen S, Johansen IB, Braastad BO, Øverli Ø, 2012. Pigments, parasites and personality: towards a unifying role for steroid hormones. *PLoS One* 7: e34281.
- Liberg O, Andrén H, Pedersen H-C mfl, 2005. Severe inbreeding depression in a wild wolf (*Canis lupus*) population. *Biology Letters* 1: 17-20.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS mfl, 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438: 803-819.
- Luikart G, England PR, Tallmon D mfl, 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* 4: 981-994.
- Mallet J, 2007. Hybrid speciation. *Nature* 446: 279-283.
- Miao B, Wang Z, Li Y, 2016. Genomic analysis reveals hypoxia adaptation in the tibetan mastiff by introgression of the grey wolf from the Tibetan Plateau. *Molecular Biology and Evolution* doi: 10.1093/molbev/msw274.
- Randi E, Hulva P, Fabbri E mfl, 2014. Multilocus detection of wolf x dog hybridization in Italy, and guidelines for marker selection. *PLoS One* 9: 1-13.
- Randi E, Lucchini V, Christensen MF mfl, 2000. Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: Detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology* 14: 464-473.
- Sundqvist AK, Ellegren H, Olivier M, Vila C, 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology* 10: 1959-1966.
- Verardi A, Lucchini V, Randi E, 2006. Detecting introgressive hybridisation between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology* 15: 2845-2855.
- Vilà C, Sundqvist AK, Flagstad Ø, mfl 2003a. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society London Series Biological Sciences* 270: 91-97.
- Vilà C, Walker C, Sundqvist AK, Flagstad Ø, 2003b. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* 90: 17-24.
- vonHoldt BM, Pollinger JP, Lohmueller KE mfl, 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* 464: 898-903.
- vonHoldt BM, Pollinger JP, Earl DA mfl, 2011. A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids. *Genome Research* 21: 1294-1305.
- vonHoldt BM, Pollinger JP, Earl DA mfl, 2013. Identification of recent hybridization between gray wolves and domesticated dogs by SNP genotyping. *Mammalian Genome* 24: 80-88.
- Wang GD, Zhai W, He-chuan Yang He-C mfl, 2013. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nature Communications* 4: 1860.
- Åkesson M, Bensch S, 2010. Undersökning rörande flytt och jakt på varg; delredovisning från leverandör 4 på uppdrag av Naturvårdverket. Dnr 235-3697-10.
- Åkesson M, Flagstad Ø, Sand H mfl, 2014. De skandinaviska vargarnas ursprung. SLU rapport, 2014-04-03.
- Åkesson M, 2015. Teknisk rapport över genetiska analyser på varg i Sverige 2014. SLU rapport.

Bilag 1: Utførlig beskrivelse av materiale, metoder og resultater (engelsk)

Materials and Methods

Sample collection

Blood samples from dogs (*Canis lupus familiaris*) were taken at a veterinary and provided in tubes for DNA extraction at the Norwegian Sequencing Centre. All dogs have ID chips and registered in the Norwegian Kennel Association. About 200 µl blood was used for DNA isolation with a Qiagen Mag attract kit (Qiagen Inc.) followed by an additional purification using a Zymo Clean and Concentrator column (Zymo Research). DNA and tissue samples from wolf specimens (*Canis lupus lupus*), as well as DNA from present and historic Norwegian specimens was provided by Nina/Rovdata, except Slovakian wolves and Czechoslovakian Wolfdog that was kindly provided by Barbora C. Bolfikova. DNA isolation was performed using DNeasy Tissue kit (Qiagen Inc). DNA quality quantities of all specimens were checked using UV-absorbance readings (Nanodrop) and fluorometric measurements (Qubit). To complete our data set for comprehensive analyses we retrieved further genomic sequences from the Sequence Read Archive (SRA) (Leinonen et al. 2011). For a complete list of specimens see bilag 2.

Sequencing

Most DNA library preparations were made using a Kapa Hyper Prep PCR-free kit (Kapa Biosciences) to avoid possible bias introduced during amplification of libraries. Due to limited starting material, historic and Junsele11 libraries, were generated using ThruPLEX DNA Kits (Rubicon Genomics) following manufacturer's recommendations. All libraries were visually inspected using Agilent Bioanalyzer, followed by qPCR for quantitative purposes (Kapa Biosciences) before being sequenced using an Illumina HiSeq4000 instrument with 150 bp paired-end sequencing. For all runs, sequences were demultiplexed and quality as well as key information such as GC content, overrepresentation of adaptors and average length were checked with the software FASTQC v0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). For reads from historic specimens, DNA damage patterns were quantified using MAPDAMAGE v2.0.6 (Jónsson et al. 2013) and adaptors were removed as well as reads collapsed using ADAPTERREMOVAL v2.1.7 (Schubert et al. 2016).

Mapping and variant calling

All reads were mapped using the algorithm BWA-MEM in BWA v0.7.8 (Li & Durbin 2009) against the CanFam3.1 genome assembly (Hoepfner et al. 2014), which was indexed with BWA, SAMTOOLS v1.1 (Li & Durbin 2009; Li 2011), and PICARD-TOOLS v1.107 (<http://broadinstitute.github.io/picard>). Mapped files were converted to BAM format, sorted, and indexed using SAMTOOLS. Duplicates were marked using PICARD-TOOLS, and indels were realigned using GATK v3.2.2 (McKenna et al. 2010). In cases with more than one library per individual, mapped reads were merged using PICARD-TOOLS followed by SAMTOOLS' sorting, PICARD-TOOLS' deduplication, and GATK's indel realignment. Mean and median read coverages of specimens sequenced in this study calculated with BEDTOOLS v2.25.0 (Quinlan & Hall 2010) were 27.31 ± 8.27 x and 24.77 ± 10.64 x,

respectively (averaged across samples, \pm standard deviation; for individual coverages see bilag 2).

Variants were called using FREEBAYES v0.9.14 (Garrison & Marth 2012) and GATK v3.3.2 (DePristo et al. 2011). GATK detects variants in a two-step process, first within single samples, followed by a joint genotyping analysis, whereas FREEBAYES does not include a per-individual analysis step. The resulting variant calls were further filtered to include only biallelic single nucleotide polymorphisms (SNPs), and to remove SNPs within 10 bp of an indel. The GATK file was hard filtered according to GATK's recommendations: FS > 60.0, MQRankSum < -12.5, ReadPosRankSum < -8.0, QD < 2.0, MQ < 40.0. The intersection of the two different filtered SNP sets was identified using the `isec` command in BCFTOOLS' v1.2 (Li 2011), and all other SNPs were excluded from further analysis. In the resulting SNP set, all sites with a genotype quality score < 20, and read depth (DP) < 5, or DP > 100 were replaced with missing data for the respective individual. The resulting 24,829,562 high quality SNPs were further filtered using PLINK v1.90 beta (URL <https://www.cog-genomics.org/plink2>) (Purcell et al. 2007): We excluded SNPs displaying a minor-allele frequency < 0.05 across all populations, and SNPs showing significant heterozygote excess ($p < 0.001$). Additional filtering was performed for population genetic analyses: SNPs in linkage disequilibrium by an squared correlation coefficient (r^2) > 0.8 within 10kb from each other, and sites showing more than 10% missing data were excluded, resulting in 45,893 SNPs. For introgression analyses we allowed a maximum of 20% missing data and filtering for linkage disequilibrium was not performed.

Genetic differentiation

Genetic differentiation was assessed with principal component analysis (PCA) using the software EIGENSOFT v6.0.1 (Price et al. 2006; Patterson et al. 2006) by using the least-squares projection method (`lsqproject`) to account for missing data, and the parameter 'poplistname' to position the present and historic Norwegian specimens within a subset of samples (all new- and old-world wolves) which was used to infer the eigenvectors. All plots were generated using R V3.1.0 (R CORE TEAM, 2015). Individual ancestry and the most appropriate number of genetic clusters (K) was assessed using the Bayesian clustering method implemented in FASTSTRUCTURE v1.0 (Raj et al. 2014) using a beta-prior over population-specific allele frequencies at each locus and the default convergence criterion of 1×10^{-6} . To generate a mitochondrial haplotype genealogy graph, the mitochondrial genomes were aligned using the '--auto' option in MAFFT v7.158b (Katoh et al. 2002) and alignments were visually checked and corrected using ALIVIEW v1.16 (Larsson 2014). A parsimony tree was obtained using RAXML v8.0.26 (Stamatakis 2014) and used to visualize haplotype relationships with FITCHI v1.1.4 (Matschiner 2016). To reduce graph complexity, transitions were ignored in the calculation of edge lengths by applying the '-x' flag.

Genetic admixture

The degree and location of genetic introgression between *C. l. familiaris* and *C. l. lupus* was determined by assessing the allelic states of potentially admixed contemporary and historic specimens at loci that are fixed between presumably non-admixed specimens of *C. l. familiaris* (Boxer1 and 2, Retriever, Malinois, Shepherd1 and 2) and *C. l. lupus* (Russia

1-5, China1 and 2, Croatia, India, Italy, Portugal, Slovakia1 and 2). Loci with over 50% missing data in the presumably non-admixed specimens were excluded from this comparison. Fixed sites closer than 10,000 bp to other fixed sites were also omitted. For comparison, the analysis was repeated in a resampling approach with each presumably non-admixed specimen iteratively included in the sample of potentially admixed specimens to obtain a baseline of the degree to which non-admixed specimens might appear admixed due to stochastic variation.

Results

Genetic differentiation

We used Principal Component Analysis (PCA) to display the largest variance between dogs and wolves by transforming correlated observations (here genotypes) onto a set of orthogonal, uncorrelated axes (principal components). The first principal component axis (PC1) explains 12.8% of the total genomic variation, and 7.2% are explained by PC2 (Fig. 1a). Significant separation was identified on PC1 between dogs and new world wolves (ANOVA, $p < 0.001$), as well as between dogs and old world wolves (ANOVA, $p < 0.001$), and on PC2 between all groups (old world wolves, new world wolves, and dogs). The projected present and historic Norwegian specimens were retrieved within the group of old world wolves.

Multivariate analyses like PCA describe the largest variance of the data, but do not take advantage of population genetic models (Patterson et al. 2006; Raj et al. 2014). Thus, we also applied a Bayesian model-based clustering algorithm to investigate genetic differentiation and ancestry (Fig. 1b). All samples were tested for their cluster membership in up to six clusters ($K=1$ to $K=6$), where $K=3$ was identified as the model that maximizes the marginal likelihood. In a two-cluster model ($K=2$), all dogs showed high ancestry proportions belonging to a first cluster (Fig. 1b, orange), while all wolves showed higher ancestry belonging to the second cluster (Fig. 1b, blue). Mixed ancestry was found for the most basal dogs (Tibetan Mastiff (78.8% first cluster), Basenji (77.7% first cluster), and Dingo (65.4% first cluster)), as well as the Czechoslovakian Wolfdog (89.3% first cluster), but also some of the wolves (e.g., Spain (85.8% second cluster), Israel (85.2% second cluster)) show mixed ancestry, while all Norwegian specimens were 100% assigned to the second cluster. In a three-cluster model ($K=3$) the wolves were split into two separate clusters, correlating with old and new world wolves similar to the PCA results. In a model with five or six clusters ($K=5$, $K=6$), some of the Norwegian specimens showed a high proportion of shared ancestry components. In addition to nuclear SNPs, we also investigated the genetic relationships based on haplotypes derived from full mitochondrial genomes (Fig. 1c). The mitochondrial alignment resulted in a total of 1,296 variable sites (7.88%), of which a maximum-parsimony tree with 1,419 substitutions was constructed. Mitochondrial genetic variation was illustrated as a haplotype genealogy graph based on the maximum-parsimony tree, with graph edge lengths calculated from the number of transversions only. The haplotype genealogy graph includes 23 nodes, each representing one or more sampled mitochondrial sequences that are identical or separated only by transitions. To connect these 23 sampled nodes, a total of 81 transversions were required. The Norwegian specimens are represented in two distinct nodes (9 and 15) separated by four transversions.

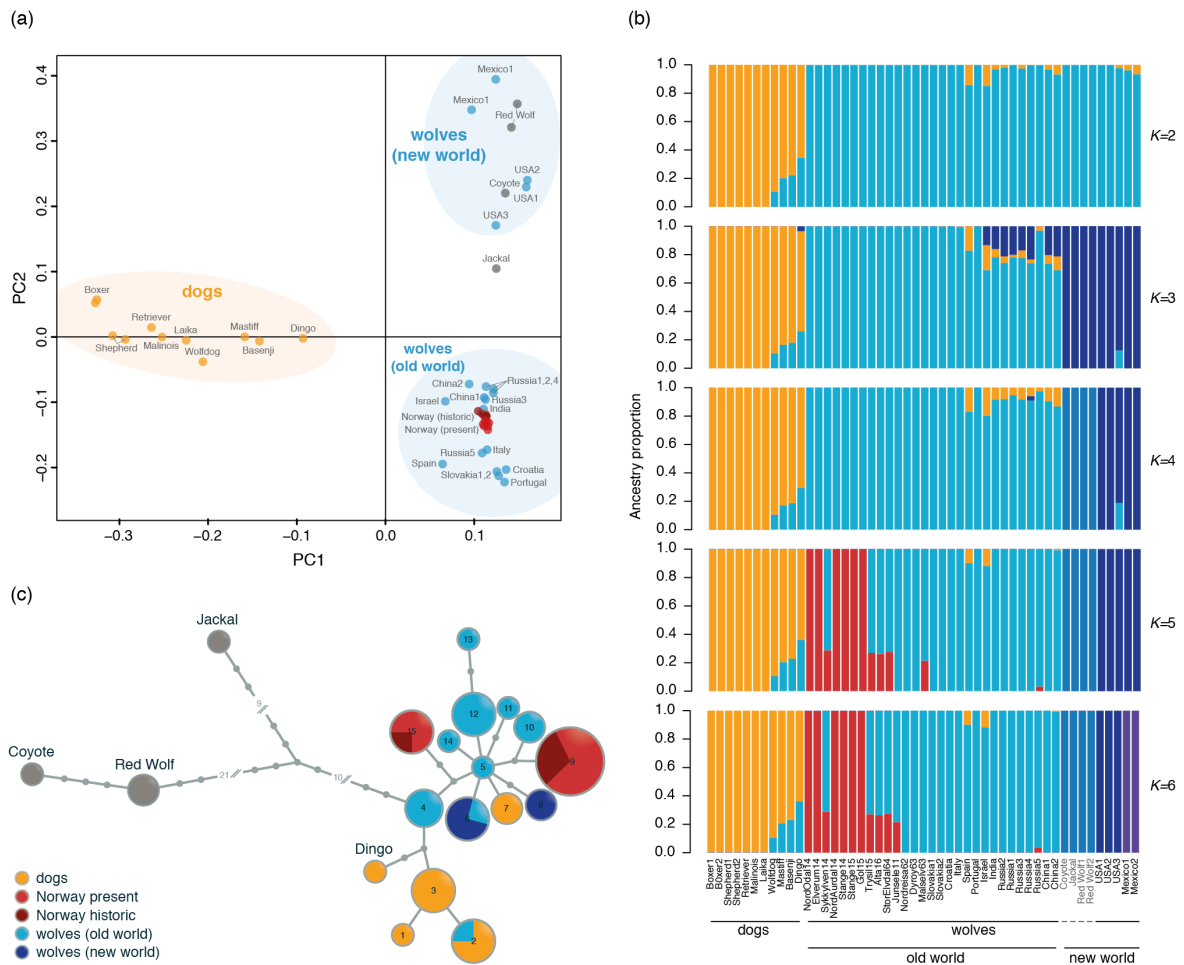


Figure 1 Genetic differentiation. (a) Principal component analysis (PCA) showing the separation of all specimens in three main cluster (dogs, new world wolves, old world wolves). (b) Ancestry analyses testing $K=1$ to $K=6$. Individual ancestry proportions are shown by colored columns for each K . (c) Haplotype genealogy graph of mitochondrial genomes. Edge lengths correspond to the number of transversions (total 81) except for Coyote, Red Wolf and Jackal where connections are shortened by the indicated numbers. Node sizes are proportional to haplotype frequencies. Sampling origin for haplotypes are indicated by node fragment colors. Individual sequences in nodes 1 to 15: 1 Shepherd1; 2 Boxer1, Boxer2, Retriever, Russia5; 3 Wolfdog, Laika, Mastiff; 4 Italy, Slovakia1, Slovakia2; 5 Spain; 6 USA1, USA2, USA3, Russia4; 7 Malinois, Shepherd2; 8 Mexico1, Mexico2; 9 Norwegian present and historic; 10 Russia1, Russia2; 11 Portugal; 12 China2, Croatia, Israel, Russia3; 13 India; 14 China1; 15 Sykkylven14, Alta16, StorElvdal64, Junsele11.

Genetic admixture

By comparing a population sample of dogs and wolves, we found a total of 2,342 bi-allelic sites (0.094%) to be fixed between the samples, i.e. all dogs were homozygous for one of the alleles, while all wolves were homozygous for the other. Exclusion of sites within 10,000 bp of other fixed sites reduced the total number to 557 fixed sites, which were analyzed for all presumably admixed specimens (Fig. 2a). Despite this omission of very close sites, long

stretches of heterozygote haplotype blocks revealed recent admixture between dogs and wolves in the Czechoslovakian Wolfdog, a dog breed that originated from hybridization between German Shepherds and wolves (Smetanová et al. 2015), as well as the Spanish and Israeli wolves. In contrast, none of the Norwegian specimens displayed long heterozygote haplotype blocks. The amount of dog and wolf ancestry in all specimens based on fixed sites was quantified using a resampling approach, showing $14.3\% \pm 8.1\%$ wolf ancestry in the dog population sample, and $5.9\% \pm 1.3\%$ dog introgression in the wolf sample (Fig. 2b). The Czechoslovakian Wolfdog showed as much as 35.9% wolf ancestry, and up to 17.1% dog ancestry were found in the Spanish and Israeli wolves, indicating admixture between dogs and wolves in those specimens. In contrast, the sample of Norwegian specimens showed $95.1\% \pm 2.1\%$ wolf ancestry, even more than the presumably pure wolf population sample. The slightly lower percentage of wolf ancestry in historic Norwegian specimens ($92.3\% \pm 1.8\%$) compared with present specimens ($96.3\% \pm 0.5\%$) may be due to the high amount of missing data in the historic data.

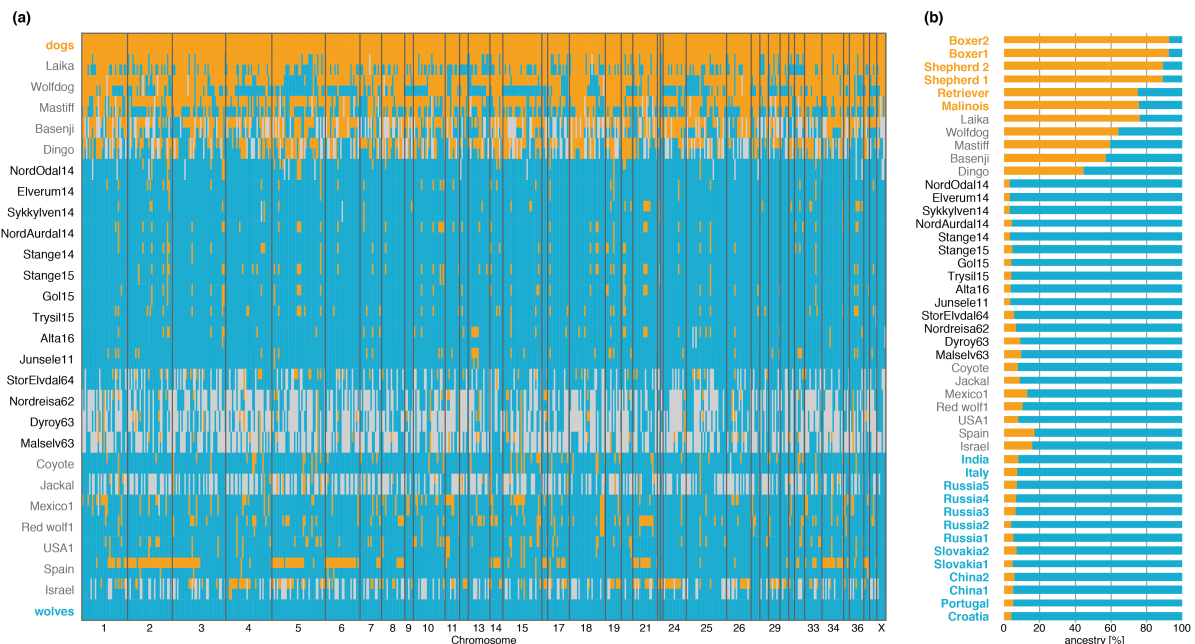


Figure 2 Genetic admixture based on fixed sites. (a) Comparison of 557 sites fixed between dogs (orange, top row; Boxer (2), Shepherd (2), Retriever, Malinois) and wolves (blue, bottom row; Europe (5), Russia (5), China (2), India). Both alleles are presented per site as colored bars (orange indicates dog ancestry, blue wolf ancestry). Missing data are indicated in gray, black bars separate chromosomes (1-38, X). (b) Ancestry proportions as the percentage of fixed alleles for all specimens obtained by resampling of the presumably non-admixed specimens. Orange indicates dog ancestry, blue wolf ancestry.

References

- DePristo MA, Banks E, Poplin R et al, 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics* 43: 491–498.
- Garrison E, Marth G, 2012. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. [arXiv:1207.3907](https://arxiv.org/abs/1207.3907).
- Hoepfner MP, Lundquist A, Pirun M et al, 2014. An improved canine genome and a comprehensive catalogue of coding genes and non-coding transcripts. *PLoS ONE* 9: e91172.
- Jónsson H, Ginolhac A, Schubert M, Johnson PLF, Orlando L, 2013. mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics* 29: 1682–1684.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K-I, Miyata T, 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–3066.
- Larsson A, 2014 AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30: 3276–3278.
- Leinonen R, Sugawara H, Shumway M, International Nucleotide Sequence Database Collaboration, 2011. The sequence read archive. *Nucleic Acids Research* 39:D19–21.
- Li H, 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27: 2987–2993.
- Li H, Durbin R, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754–1760.
- Matschiner M, 2016. Fitchi: haplotype genealogy graphs based on the Fitch algorithm. *Bioinformatics* 32: 1250–1252.
- McKenna A, Hanna M, Banks E et al, 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 20: 1297–1303.
- Patterson N, Price AL, Reich D, 2006. Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genetics* 2: e190.
- Price AL, Patterson NJ, Plenge RM et al, 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics* 38: 904–909.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K et al, 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics* 81: 559–575.
- Quinlan AR, Hall IM, 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26: 841–842.
- Raj A, Stephens M, Pritchard JK, 2014. fastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics* 197: 573–589.
- Schubert M, Lindgreen S, Orlando L, 2016. AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging. *BMC Research Notes* 9: 88.
- Smetanová M, Černá Bolfíková B, Randi E et al, 2015. From wolves to dogs, and back: genetic composition of the Czechoslovakian Wolfdog. *PLoS ONE*, 10:e0143807.
- Stamatakis A, 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.

Bilag 2: Tabell over individer

Name	ID	Species (dog breed)	Reference*	District	Coverage		Percentage not covered
					mean	median	
Elverum14	M492332 (rovbase)	to be determined	this study	Tansen 2	32.2	31	1.2
NordOdal14	M406740 (rovbase)	to be determined	this study	Kläggen	14.8	14	1.3
Sykkylven14	M407048 (rovbase)	to be determined	this study	Tiveden	29.0	28	1.2
NordAurdal14	M407468 (rovbase)	to be determined	this study	Skuggghøyden	29.4	28	1.1
Stange14	M407452 (rovbase)	to be determined	this study	Olsjøen 1	32.1	31	1.1
Stange15	M407842 (rovbase)	to be determined	this study	Djurskog 3	29.1	28	1.1
Goll15	M408263 (rovbase)	to be determined	this study	Gimmen 3	30.1	29	1.1
Trysil15	M491983 (rovbase)	to be determined	this study	Immigrant	30.8	29	1.1
Alta16	M492204 (rovbase)	to be determined	this study	Immigrant	30.8	30	1.1
Junsele11	M-11-14 (merke)	to be determined	this study	Immigrant	45.1	43	1.2
Nordreisa62	175-64 (museum)	<i>Canis l. lupus</i>	this study	ikke kjent	16.3	5	5.3
Dyroy63	176-64 (museum)	<i>Canis l. lupus</i>	this study	ikke kjent	13.5	4	10.1
Malselv63	177-64 (museum)	<i>Canis l. lupus</i>	this study	ikke kjent	10.5	4	8.2
StorElvdal64	19-64 (museum)	<i>Canis l. lupus</i>	this study	ikke kjent	14.0	7	2.6
Russia1	not listed	<i>Canis l. lupus</i>	this study	Jakotsk sør	30.4	29	1.1
Russia2	not listed	<i>Canis l. lupus</i>	this study	Jakotsk nord	30.3	29	1.1
Slovakia1	not listed	<i>Canis l. lupus</i>	this study	ikke kjent	32.2	31	1.1
Slovakia2	not listed	<i>Canis l. lupus</i>	this study	ikke kjent	31.0	30	1.1
Boxer1	NO54977/14 (NKK)	<i>C. l. familiaris</i> (Boxer)	this study	Norge	28.2	27	1.0
Shepherd1	NO34013/09 (NKK)	<i>C. l. familiaris</i> (German Shepherd)	this study	Norge	31.5	31	1.1
Laika	NO43990/10 (NKK)	<i>C. l. familiaris</i> (Laika)	this study	Norge	32.3	31	1.1
Wolfdog	not listed	<i>C. l. familiaris</i> (Czechoslovakian Wolfdog)	this study	Tsjekkia	27.3	26	1.1
Russia3	SAMN01974486 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Wang, 2013	Russia, Altai	13.5	11	1.8
Russia4	SAMN01974487 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Wang, 2013	Russia, Chukotka	10.4	8	2.1
Russia5	SAMN01974488 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Wang, 2013	Russia, Bryansk	14.1	13	1.3
China1	SAMN01974489 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Wang, 2013	China, Haerbin	10.8	10	1.4
China2	SAMN03366711 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Freedman, 2014	China (collected: San Diego Zoo, USA)	28.6	27	1.4
Spain	SAMN02921319 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Fan, 2016	Spain	28.6	28	2.1
Italy	SAMN02921313 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Fan, 2016	Italy	7.2	7	2.3
Portugal	SAMN02921316 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Fan, 2016	Portugal, north of Douro	34.6	34	1.4
India	SAMN02921311 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Fan, 2016	India	8.7	8	2.0
Croatia	SAMN03366712 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Freedman, 2014	Croatia, Perković	8.9	8	2.1
Israel	SAMN03366710 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Freedman, 2014	Israel, Neve Ativ, Golan Heights	7.0	7	2.3
USA1	SAMN02921320 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Fan, 2016	USA, Yellowstone NP	28.1	27	1.5
USA2	SAMN02921321 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Fan, 2016	USA, Yellowstone NP	26.0	25	1.5
USA3	SAMN02921322 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Fan, 2016	USA, Yellowstone NP	6.9	6	2.3
Mexico1	SAMN02921314 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Fan, 2016	Mexico	25.5	25	1.5
Mexico2	SAMN02921315 (biosample)	<i>Canis l. lupus</i>	Fan, 2016	Mexico	6.6	6	2.5
Redwolf1	SAMN02921317 (biosample)	<i>Canis rufus</i>	Fan, 2016	USA	30.1	30	1.9
Redwolf2	SAMN02921318 (biosample)	<i>Canis rufus</i>	Fan, 2016	USA	7.3	7	2.1
Jackal	SAMN03366713 (biosample)	<i>Canis aureus</i>	Freedman, 2014	Israel, Tel Aviv	5.7	5	3.6
Coyote	SAMN02921301 (biosample)	<i>Canis latrans</i>	Fan, 2016	USA, California	33.3	32	1.4
Dingo	SAMN03366709 (biosample)	<i>Canis l. dingo</i>	Freedman, 2014	Australia, Bargo Dingo Sanctuary	6.8	6	2.6
Basenji	SAMN03366708 (biosample)	<i>C. l. familiaris</i> (Basenji)	Freedman, 2014	USA, Bethesda, MD (African origin)	6.3	6	2.9
Boxer2	SAMN02921305 (biosample)	<i>C. l. familiaris</i> (Boxer)	Fan, 2016	Europe	30.8	30	0.9
Retriever	SAMN02921307 (biosample)	<i>C. l. familiaris</i> (Labrador Retriever)	Fan, 2016	England	12.2	11	1.2
Malinois	SAMN01974495 (biosample)	<i>C. l. familiaris</i> (Belgium Malinois)	Wang, 2013	France	11.5	11	1.8
Mastiff	SAMN01974493 (biosample)	<i>C. l. familiaris</i> (Tibetan Mastiff)	Wang, 2013	China	13.4	13	1.5
Shepherd2	SAMN01974494 (biosample)	<i>C. l. familiaris</i> (German Shepherd)	Wang, 2013	Germany	10.9	10	1.4

*References

Fan Z, Silva P, Gronau I et al, 2016. Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves. *Genome Research* 26: 163–173.

Freedman AH, Gronau I, Schweizer RM et al, 2014. Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genetics* 10: e1004016.

Wang G-D, Zhai W, Yang H-C et al, 2013. The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nature Communications* 4: 1860.

Bilag 3: Fotografisk dokumentasjon



Figur 1 To av i alt 15 prøvetatte dyr fra Jakutsk, Russland, 2016. Alle var av likt utseende.



Figur 2 Variabelt utseende hos fire dyr fra nåværende skandinavisk populasjon: A) Sykkylven14, skutt 06.06.2014, B) NordOdal14, skutt 27.01.2014, C) Ringebu, skutt 17.05.2015 (ikke analysert i denne studien, D) Junsele11, flyttet Överhogdal-Kilsbergen mars 2011, Idre-Tiveden desember 2011, Brunflo-Heby februar 2012, Junsele-Rimbo mars 2013. Ingen observasjoner etter februar 2014.

Bilag 4: Litteraturgjennomgang geografisk opphav – behov for ytterligere genetiske studier

Bakgrunn: Som det fremgår av vår hovedrapport kan de genetiske studier som er gjort til nå ikke forklare hva som ligger bak variasjoner i utseende og atferd hos frittlevende skandinavisk ulv av i dag. Studiene tyder på at innslaget av hund er lite, det er derfor av største viktighet at andre kilder til variasjon som f.eks. geografisk opphav nå studeres mer nøye.

1. Historikk: Genetiske bidragsyttere til dagens stamme

Det har vært antatt at den opprinnelige stedegne skandinaviske ulvestammen er utdødd og erstattet med dyr av en annen geografisk og genetisk opprinnelse (Vilà et al. 2003). Den nyetablerte bestanden oppstår med en pardannelse i Nyskoga-reviret (Värmland, litt nord for Torsby) tidlig -80 tall, med bekreftet yngling i **1983**. Av en flokk som ynglet i traktene rundt Kiruna / Vittangi 1978 overlevde ingen, og disse dyrene har således ikke bidratt til reetableringen. Frem til **1991** bidrar kun ett hann- og ett hunndyr til stammen. Et nyankommet hanndyr parer seg så med avkom av disse (Gillhov, sørlige Jämtland), og stammen begynner å vokse. Etter dette observeres reproduksjon med nye dyr i **2008** (Kynna, på Finnskogen, og Galven, Gävleborgs län). I **2013** flyttes et ulvepar fra Tornedalen til Tiveden nasjonalpark (Örebro län) som også får valper. Andre flyttinger av ulv sørover fra reinbeiteområdene i Nord-Sverige har ikke gitt noe observerbart resultat. Totalt sett angis at den nålevende populasjonen bidrag fra kun 6 dyr, hvor de opprinnelige grunnleggerne fra -80 og -90 tallet fortsatt bidrar med over 95% av den genetiske variasjonen (Jansson et al. 2015). Det er derfor spesielt interessant å undersøke hvor disse tre dyrene kommer fra.

Founder id	Region of origin	Alive during	Sex	Currently alive	Genetic contribution p_i (%)	Retention (r_i)	Living descendants
G1-83/T965	Finland/Russia	1980s	Male	No	34.3	0.81	374
D-85-01/T968	Finland/Russia	1980s	Female	No	34.3	0.81	374
G1-91/T991	Finland/Russia	1990s	Male	No	27.4	0.96	374
M-09-03	Finland/Russia	2000s	Male	Yes	1.6	1.00	17
M-10-10	Finland/Russia	2000s	Male	Yes	2.1	1.00	18
M-11-14	Finland/Russia	2010s	Female	Yes	0.3	1.00	0

Tabell 1 Prosentvis genetisk bidrag fra alle grunnleggere av nålevende stamme (utsnitt fra Jansson et al. (2015)).

2. Geografisk opphav

Om de opprinnelige dyrene som danner stammen på -80 og -90 tallet fins følgende informasjon. Hva gjelder de to hanndyrene publiserer Uppsala Universitet i 2001 at de bærer på genetiske signaturer (Y-kromosom haplotyper) som ikke fins i hverken Finland eller Russland (Sundqvist et al. 2001). Slike unike haplotyper som ikke dukker opp i noe naboland observeres i denne studien også i Russland (dog ikke i Finland), men frekvensen er lav. Interessant nok finnes det en haplotype i Baltikum som også finnes i et enkeltindivid fra Nord-Sverige skutt i 1977, som aldri etterlot seg noe avkom. Om morddyret (D-85-01) finnes mindre informasjon, og ingen statistisk sikker konklusjon kan trekkes.

Statistisk legges følgende sannsynlighetsberegning til grunn ut fra tallmaterialet gjengitt i utklipp fra originalartikkelen, **tabell 2** neste side: 3 av totalt 42 undersøkte hanndyr fra Finland (n=16) og Russland (n=26) bærer på signaturer som er så sjeldne at de ikke gjenfinnes i noe naboland (= 7 %). Hvis de prøvetatte dyrene antas å være representative for populasjonen i sin helhet gjelder ved tilfeldig vandring altså at det er 7 % sjanse for at individet det gjelder har slik unik signatur. Når det imidlertid gjelder to av to hanndyr (**G1-83** og **G1-91** i tabellen over) skal sannsynlighetene multipliseres med hverandre (7% av 7%). Dette gir ca 0.5 % sannsynlighet for opphav i Finland / Russland.

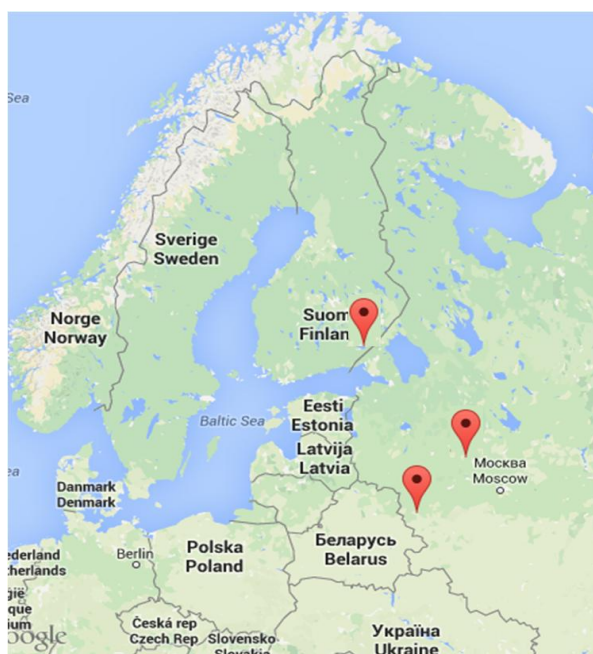
Denne konklusjonen gjelder kun dersom populasjonene referansematerialet kommer fra er representative for regionen, det vil si at ikke populasjonen i Russland for eksempel inneholder underpopulasjoner som ikke prøvetakingen har vært innom. Det bør også påpekes at undersøkelsen som senere konkluderer med østlig opphav (Vila et al. 2003, nevnt over) henter sitt referansemateriale i fjerntliggende sentraleuropeiske deler av Russland (regionene Tver og Smolensk). Hvor den finske komponenten i materialet det sammenlignes med kommer fra fremgår ikke, men nyere undersøkelser tyder på at nylig ankomne dyr (inkludert flyttede individer) kommer fra en karelsk subpopulasjon snarere enn fra midtre og nordlige deler av Finland (Åkesson & Bensch 2009). Områdene det gjelder er markert i figuren på neste side (fra Google maps).

3. Konklusjon

Genetiske undersøkelser som kan belyse problemstillingen geografisk opprinnelse har for lav oppløsning til å sikkert identifisere eksakte regioner. Hva gjelder de to hanndyrene som er bidragsytere til populasjonen frem til 2008 er det grunn til å stille spørsmålstegn ved konklusjonen at geografisk opphav er Finland / Russland. For helt sikre konklusjoner er det behov for mer detaljerte undersøkelser som skiller på regioner i Europa og Russland.

Haplotype	Scand. (14)	Zoo (13)	Finland (16)	Baltic states (31)	Russia (26)
A	3				
B	10				
C	1			3	
D		13			
E			6	5	6
F			5		3
G			2	1	1
H			3	3	2
I				1	
J				4	
K				5	10
L				4	
M				4	1
O					1
P					1
Q					1
R				1	

Tabell 2 Forekomst av Y-kromosom signaturer (haplotyper) hos hanndyrene som grunnlegger dagens skandinaviske stamme (type A og B), dyrehagepopulasjon, og i naboland. Fra Sundqvist et al. (2001).



Figur 1 Markeringer fra nord til syd: Finsk Karelen, Tverskaja oblast, og Smolensk, Russland

Referanser

- Jansson M, Amundin M, Laikre L, 2015. Genetic contribution from a zoo population can increase genetic variation in the highly inbred wild Swedish wolf population. *Conservation Genetics* 16: 1501-1505.
- Sundqvist AK, Ellegren H, Olivier M, Vilà C, 2001. Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology* 10: 1959-1966
- Vilà C, Sundqvist AK, Flagstad Ø, Seddon J, Kojola et al, 2003. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: 91-97.
- Åkesson M, Bensch S, 2009. Den genetiska populationsstrukturen hos vargar i Skandinavien, Finland och Ryssland. Bilaga 2 til Naturvårdsverket rapport: Förslag till åtgärder som kan stärka vargstammens genetiska status. Redovisning av regeringsuppdrag Dnr 429-8585-08 Nv.