

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Denis KUTNJAK

**FILOGEOGRAFIJA IN VARSTVENA GENETIKA DINARSKE
SMILJKE (*Cerastium dinaricum*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PHYLOGEOGRAPHY AND CONSERVATION GENETICS OF
*Cerastium dinaricum***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Laboratorijski del diplomskega dela je bil opravljen na Inštitutu za botaniko Univerze v Innsbrucku.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Boža Frajmana.

Mentor: doc. dr. Božo Frajman
Univerza v Innsbrucku, Inštitut za botaniko

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Martina Bačič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Simona Strgulc Krajšek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Božo Frajman
Univerza v Innsbrucku, Inštitut za botaniko

Datum zagovora: 10. september 2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Denis Kutnjak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 58:502:575(234.422.1 Dinarsko gorstvo) (043.2)=163.6
KG dinarska smiljka/filogeografija/varstvena genetika/Dinarsko gorstvo
AV KUTNJAK, Denis
SA FRAJMAN, Božo (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2012
IN FILOGEOGRAFIJA IN VARSTVENA GENETIKA DINARSKE SMILJKE
(*Cerastium dinaricum*)
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 89 str., 5 pregl., 18 sl., 108 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Dinarska smiljka (*Cerastium dinaricum*) je endemna rastlinska vrsta zahodnega Balkana, ki se disjunktno pojavlja od Slovenije na severozahodu do Črne Gore na jugovzhodu. V Evropi ima poseben varstveni status, saj je uvrščena na prilogo II Direktive o habitatih (NATURA 2000). Z uporabo različnih molekulskih označevalcev – polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP), zaporedij *ndhJ-trnT* plastidne DNA in vmesnika ITS jedrne DNA, kot tudi meritvami relativne velikosti genoma, sem raziskal genetsko diferenciacijo znotraj *C. dinaricum* in preveril monofilijo vrste znotraj rodu. Filogenetske analize podpirajo monofiletski položaj vrste, ob upoštevanju dejstva, da predstavlja populacija iz Albanije (Prokletije, Maja Hekurave) svojo vrsto – *C. hekuravense*, kot je bila tudi prvotno opisana. Analiza zaporedij vmesnika ITS jedrne DNA ne kaže jasne genetske strukture znotraj vrste. Z analizo zaporedij plastidne DNA sem zaznal 5 ozko sorodnih haplotipov; najpogostejši haplotip se pojavlja v petih populacijah na jugovzhodu (Črna Gora in BiH), populaciji iz Vaganskega vrha (Velebit, Hrvaška) in Dinara (Hrvaška) imata isti haplotip, ostale populacije pa so opredeljene vsaka s svojim haplotipom. Analiza profilov AFLP in meritve relativne velikosti genoma razkrivajo močno filogeografsko ločnico, ki sovпада z dolino Neretve. Sinteza rezultatov pridobljenih z različnimi molekulskimi označevalci nakazuje, da je disjunktna razporeditev vrste znotraj severozahodne skupine najverjetneje rezultat preživetja v dveh glacialnih refugijih (Snežnik, Velebit-Dinara) in kasnejše širitve areala iz Velebitsko-Dinarskega refugija, ki pa mu je sledila fragmentacija areala. Disjunktna razporeditev znotraj jugovzhodne skupine je najverjetneje rezultat preživetja v več glacialnih refugijih. Znotrajvrstna variabilnost velikosti genoma lahko nakazuje, da skupini v resnici predstavljata ločeni biološki vrsti, a bi bile za potrditev te hipoteze potrebne dodatne raziskave. V vsakem primeru pa divergentni liniji predstavljata evolucijsko pomembni enoti, pomembni za nadaljnje naravovarstvene ukrepe, ki zadevajo dinarsko smiljko.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 58:502:575(234.422.1 Dinarsko gorstvo) (043.2)=163.6
- CX *Cerastium dinaricum*/phylogeography/conservation genetics/Dinaric mountains
- AU KUTNJAK, Denis
- AA FRAJMAN, Božo (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2012
- TI PHYLOGEOGRAPHY AND CONSERVATION GENETICS OF *Cerastium dinaricum*
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO X, 89 s., 5 tab., 18 fig., 108 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB *Cerastium dinaricum* is an endemic western Balkan mountain plant species. Its distribution range consists of several disjunct populations, ranging from Slovenia in the north-west to Montenegro in the south-east. It is a species of a high conservation concern in Europe, listed in Annex II of the Habitats Directive (Natura 2000). We tested for monophyly of *C. dinaricum* and investigated its genetic differentiation, using amplified fragment length polymorphisms (AFLPs), sequences of plastid *ndhJ-trnT* and nuclear ITS regions, as well as relative genome size estimations. Phylogenetic analyses support monophyly of *C. dinaricum*, if *C. hekuravense* from Albania (Prokletije, Maja Hekurave) is treated as a separate species. Within *C. dinaricum* no clear genetic structure was indicated by the nuclear ITS sequence data. Five closely related plastid DNA haplotypes were found, one of them occurring in all south-eastern populations from Montenegro, one being in common to populations from Dinara (Croatia) and Vaganski vrh (Velebit, Croatia), whereas all other populations were characterized by own haplotypes. A deep phylogeographic split, coinciding with the lowermost Neretva valley, was indicated by AFLPs and relative genome size measurements. Results of different marker systems indicate that the disjunct distribution within the north-western group could be a result of survival in two glacial refugia (Snežnik, Velebit-Dinara) and subsequent range expansion from a refugium in Velebit and Dinara mountain ranges, later followed by range fragmentation. The disjunct distribution within the south-eastern group likely results from survival in multiple refugia, however, the observed genetic pattern could also be of postglacial origin. Intraspecific variation of genome size indicates that both groups possibly represent distinct biological species, but further studies are needed to confirm this. In any case, the two distinct lineages represent evolutionarily significant units important for conservation management purposes.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i> ; polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov
AMOVA	<i>analysis of molecular variance</i> ; analiza molekularne variance
ARSO	Agencija republike Slovenije za okolje
cpDNA	plastidna deoksiribonukleinska kislina
DAPI	<i>2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboksamidin</i> ; fluorescentno barvilo, ki se močno veže na določene regije DNA
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
<i>EcoRI</i>	restriksijska endonukleaza izolirana iz seva bakterije <i>Escherichia coli</i>
ESU	<i>evolutionary significant unit</i> ; evolucijsko pomembna enota
FCM	<i>flow cytometry</i> ; pretočna citometrija
F_{ST}	indeks fiksacije
GPS	globalni pozicijski sistem
ITS	<i>internal transcribed spacer</i> ; medgenska regija, ki ločuje gene za ribosomsko RNA
MCMC	<i>Monte Carlo Markov chain</i> ; Monte Carlo Markovska veriga
<i>MseI</i>	restriksijska endonukleaza, ki izvira iz rodu bakterij <i>Micrococcus</i>
mtDNA	mitohondrijska deoksiribonukleinska kislina
<i>ndhJ</i>	gen, ki kodira podenoto J nikotinamid adenin dinukleotid hidrata (NADH)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , verižna reakcija s polimerazo
Presel	<i>preselective amplification</i> ; preselektivna pomnožitev
Res/Lig	<i>restriction/ligation</i> ; restrikcija/ligacija
Sel	<i>selective amplification</i> ; selektivna pomnožitev
<i>trnT</i>	gen, ki kodira aminoacil-tRNA (prenašalno ribonukleinsko kislino)

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
1 UVOD	1
1.1 Dinarska smiljka	1
1.1.1 Variabilnost vrste	2
1.1.2 Razširjenost dinarske smiljke	3
1.1.3 Zgodovinski pregled proučevanja razširjenosti vrste	3
1.1.4 Znana nahajališča vrste	4
1.1.5 Ekologija in fitocenološki položaj vrste	5
1.1.6 Taksonomski položaj dinarske smiljke	6
1.1.7 Varstvo dinarske smiljke v Sloveniji	7
1.2 Balkanski polotok in Dinarsko gorstvo	8
1.3 Natura 2000	10
1.4 Filogeografija in varstvena genetika	11
1.4.1 Varstvena genetika rastlin	14
1.5 Velikost genoma	16
1.6 Namen diplomskega dela	17
1.7 Delovne hipoteze	18
2 MATERIAL IN METODE	19
2.1 Nabiranje vzorcev in mesta vzorčenja	19
2.2 Določanje relativne velikosti genoma s pretočno citometrijo	25
2.2.1 Statistična analiza podatkov o velikosti genoma pri vrsti <i>C. dinaricum</i> in eksperimentalno testiranje znotrajvrstnih razlik	28
2.3 Ekstrakcija celokupne DNA	29
2.4 Pomnoževanje, določanje in analiza izbranih zaporedij DNA	30
2.4.1 Pomnoževanje <i>ndhJ-trnT</i> regije plastidne DNA	30
2.4.2 Pomnoževanje vmesnika ITS jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S	31
2.4.3 Preverjanje uspešnosti pomnoževanja	31
2.4.4 Čiščenje produktov pomnoževanja	32
2.4.5 Reakcije za določanje zaporedja	32
2.4.6 Čiščenje produktov reakcij za določanje zaporedja	33
2.4.7 Sestavljanje sosesk, pregledovanje in urejanje zaporedij, poravnava zaporedij	33
2.4.8 Filogenetske analize z metodo največje varčnosti	34
2.4.9 Diagram NeighborNet na podlagi regije ITS 18S-5.8S-26S jedrnega ribosomalnega cistrona	35
2.4.10 Statistično omrežje največje varčnosti haplotipov plastidne DNA (<i>ndhJ-trnT</i>) za osebke dinarske smiljke	35

2.5	Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP).....	36
2.5.1	Restrikcija izolirane celokupne DNA vzorcev in ligacija adapterjev (Res/Lig)	36
2.5.2	Preselektivna pomnožitev fragmentov (Presel)	37
2.5.3	Selektivna pomnožitev fragmentov (Sel).....	38
2.5.4	Čiščenje produktov selektivne pomnožitve fragmentov	39
2.5.5	Analiza pomnoženih fragmentov na gelu.....	40
2.5.6	AFLP – izračun indeksa napake (error rate).....	40
2.5.7	AFLP – statistična analiza podatkov.....	41
2.5.7.1	Nei-jev koeficient genetske raznolikosti - D.....	42
2.5.7.2	Indeks redkosti alelov - R	42
2.5.7.3	Analiza molekularne variance (AMOVA).....	43
2.5.7.4	Diagram NeighborNet	43
2.5.7.5	Bayesovo združevanje profilov AFLP s programom STRUCTURE.....	44
2.5.7.6	Populacijski grafi	45
2.5.7.7	Genetski test dodelitve s programom AFLPOP	46
3	REZULTATI.....	47
3.1	Relativna velikost genoma.....	47
3.2	Filogenetska analiza regije <i>ndhJ-trnT</i> plastidne DNA	49
3.3	Filogenetska analiza regije ITS jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S	52
3.4	Statistično omrežje največje varčnosti za haplotipe regije <i>ndhJ-trnT</i> plastidne DNA dinarske smiljke.....	53
3.5	Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP).....	54
3.5.1	Nei-jev koeficient genetske raznolikosti (D) in indeks redkosti alelov (R).....	55
3.5.2	Analiza molekularne variance (AMOVA)	56
3.5.3	Diagram NeighborNet.....	56
3.5.4	Bayesovo združevanje profilov AFLP s programom STRUCTURE	57
3.5.5	Populacijski grafi.....	58
3.5.6	Genetski test dodelitve s programom AFLPOP.....	58
4	RAZPRAVA.....	60
4.1	<i>Cerastium dinaricum</i> in <i>C. hekuravense</i> ter tradicionalna znotrajvrstna delitev dinarske smiljke	60
4.2	Filogeografska struktura dinarske smiljke na podlagi analize profilov AFLP	63
4.3	Sinteza rezultatov vseh uporabljenih molekularnih označevalcev in interpretacija opažene genetske strukture dinarske smiljke.....	66
4.4	Izhodišča za varstvo dinarske smiljke	69
5	SKLEPI.....	72
6	POVZETEK.....	73
7	VIRI.....	76

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vzorčene populacije dinarske smiljke	21
Preglednica 2: Druge vrste rodu <i>Cerastium</i> vključene v filogenetsko analizo	20
Preglednica 3: Relativne velikosti genoma dinarske smiljke in nekaterih drugih vrst rodu <i>Cerastium</i> , vključenih tudi v filogenetsko analizo	48
Preglednica 4: Haplotipi cpDNA in indeksa za oceno genetske pestrosti na podlagi AFLP	55
Preglednica 5: Rezultati analize molekularne variance (AMOVA).....	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Skica dinarske smiljke priložena originalnemu opisu vrste.....	2
Slika 2: Zemljevid razširjenosti <i>Cerastium dinaricum</i>	5
Slika 3: Rastišče dinarske smiljke	6
Slika 4: Zemljevid z označenimi vzorčenimi populacijami dinarske smiljke	20
Slika 5: Primer histograma FCM z izbranimi odseki.....	27
Slika 6: Shema regije <i>ndhJ-trnT</i> plastidne DNA.	30
Slika 7: Shema regije ITS jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S.....	31
Slika 8: Znotrajvrstna variabilnost relativne velikosti genoma pri dinarski smiljki	47
Slika 9: Filogram enega izmed dreves za regijo <i>ndhJ-trnT</i> plastidne DNA.....	50
Slika 10: Filogram enega izmed dreves za regijo ITS	51
Slika 11: Diagram NeighborNet za regijo ITS.	52
Slika 12: Geografska razporeditev haplotipov plastidne DNA.....	53
Slika 13: Diagram NeighborNet profilov AFLP osebkov <i>C. dinaricum</i> , <i>C. hekuravense</i> in <i>C. carinthiacum</i>	54
Slika 14: Genetska struktura dinarske smiljke na podlagi analize profilov AFLP.	59
Slika 15: Fotografiji <i>C. dinaricum</i> in <i>C. hekuravense</i> s klasičnih nahajališč.	61
Slika 16: Diagram NeighbourNet profilov AFLP dinarske smiljke.....	62
Slika 17: Genetska struktura dinarske smiljke na osnovi Bayesovega združevanja profilov AFLP in na geografsko ozadje naneseo koreninjeno statistično omrežje največje varčnosti haplotipov plastidne DNA dinarske smiljke	68
Slika 18: Evolucijsko pomembni enoti dinarske smiljke	70

1 UVOD

1.1 Dinarska smiljka

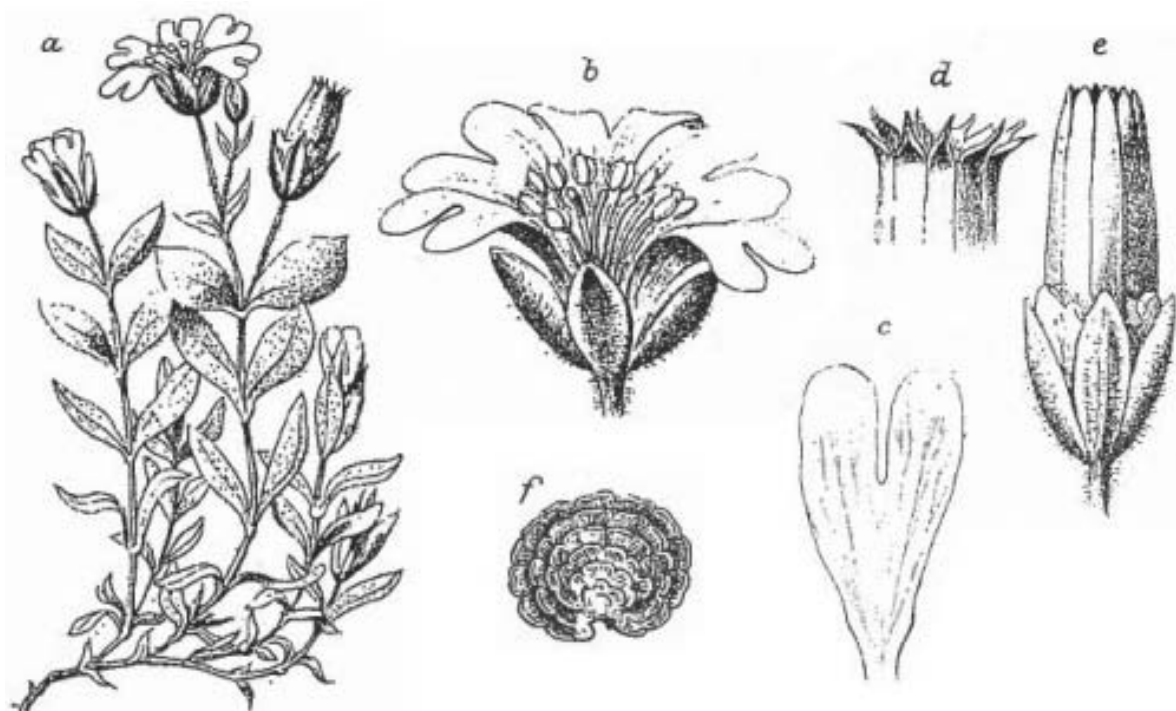
Dinarska smiljka je trajnica s šopasto do blazinasto razrastjo, z močno razvejanim koreninskim sistemom. Spodnji del stebela je večleten, enoletni poganjki s cvetovi so visoki do 15 cm (Trinajstić, 1967). Kipeča stebela so gosto porasla z drobnimi, nekajceličnimi togimi dlačicami (0,1-0,2 mm), ki na stebelu štrlijo poševno navzdol, na listih in cvetnih pecljih pa so nameščene bolj ali manj pravokotno (Bačič in Jogan, 2004). Stebla so v zgornjem delu včasih žlezastodlakava. Nosijo več nasprotno nameščenih listov ter 1-5 (-7) cvetov v rahlem dvovejnatem pakobulu (Trinajstić, 1967).

Listi so dolgi 1-2 cm in široki okoli 3 (-5) mm (Bačič in Jogan, 2004). Spodnji stebelni listi so podolgasti, na bazi klinasti; ko se posušijo, se njihov rob uviha navzdol. Ostali stebelni listi so širši, eliptični, zoženi proti vrhu in bazi, pogosto na vrhu izrobljeni, celorobi, na obeh straneh gosto kratkodlakavi, bolj ali manj sivozelene, z eno, na spodnji strani izstopajočo žilo. Spodnji podporni listi cvetov so podobni stebelnim listom, samo nekoliko širši, ostali so manjši, zgornji so podobni čašnim listom in imajo suhokožnat rob (Trinajstić, 1967).

Cvetni peclji so toga kratkodlakavi, navadno tako dolgi kot cvet, lahko tudi do dvakrat daljši (Trinajstić, 1967). Cvetovi imajo zvonasto razprostrto cvetno odevalo (Bačič in Jogan, 2004) in merijo okoli 1,5 cm v premeru. Venčni listi so beli, dolgi 7-9 mm, skoraj do polovice dvokrpi, z zaobljenima krpama. Čašni listi so dolgi 3-5 mm, podolgasti, koničasti in imajo širok suhokožnat rob. Zunanji so po vsej površini dlakavi, notranji pa po robu goli. V času dozorevanja plodov so uveli (Trinajstić, 1967). Prašnikov je 10, z do 1 mm dolgimi prašnicami. Pestič je zrasel iz petih plodnih listov in nosi pet vratov (Bačič in Jogan, 2004).

Plod je glavica valjaste oblike. Dolga je 1-1,2 cm, dvakrat toliko kot venčni listi (Trinajstić, 1967). Odpira se z desetimi (približno 1 mm dolgimi) zobci, ki so ob zrelosti bolj ali manj razprostrti (Bačič in Jogan, 2004). Peclji plodov so pokončni, približno tako

dolgi kot plod ali malo daljši (Trinajstić, 1967). Semena so živo rjave barve, dolga približno 1,5 mm in široka okoli 1 mm (Bačič in Jogan, 2004). Prekrita so z majhnimi ploščatimi luskinami kvadratne oblike, razporejenimi v koncentričnih krogih (Trinajstić, 1967).



Slika 1: Skica dinarske smiljke priložena originalnemu opisu vrste (Beck in Szyszłowicz, 1889: Tab. IV)

1.1.1 Variabilnost vrste

V nedavni taksonomski reviziji je Niketić (2004) priznal dve varieteti dinarske smiljke: *C. dinaricum* var. *dinaricum* in *Cerastium dinaricum* var. *hekuravense* (Jáv.) Niketić in Glasn. Pri var. *dinaricum* so listi cvetočih poganjkov po površini brez žleznih dlak, pri var. *hekuravense* pa so cele rastline žlezasto dlakave. Slednjo je Javorka opisal kot samostojno vrsto – *Cerastium hekuravense* Jáv. (Jávorka, 1921), vendar ji Niketić (1999) priznava le status varietete, saj naj bi bila prisotnost oz. odsotnost žlezastih dlak na listih edina znana pomembna razlika med taksonoma. Znotraj var. *dinaricum* sta opisani dve formi; pri *C. dinaricum* var. *dinaricum* f. *dinaricum* socvetja niso žlezastodlakava, pri *C. dinaricum* var. *dinaricum* f. *velebiticum* Degen et Lengyel pa so socvetja žlezastodlakava (Niketić, 2004).

1.1.2 Razširjenost dinarske smiljke

Dinarska smiljka ima zahodnobalkansko razširjenost. Pojavlja se na območju med skrajnima koncema Dinarskega gorstva. V Sloveniji uspeva na Snežniku, kjer ima severozahodno mejo svojega areala, na jugovzhodu mejo njenega pojavljanja predstavlja Prokletije (Bjeshkët e Nemuna). Zračna razdalja med najbolj oddaljenima nahajališčema je 460 km (Wraber, 1995). Znana nahajališča vrste med skrajnima točkama so dokaj redka (Wraber, 1995), populacije pa so druga od druge pogosto zelo oddaljene. Vrsta naj bi bila najbolj pogosta v Črni Gori, Hercegovini, na Dinari ob bosansko-hrvaški meji in Velebitu na Hrvaškem (Wraber, 1995).

1.1.3 Zgodovinski pregled proučevanja razširjenosti vrste

Visiani je konec 19. stoletja (Visiani 1872, cit. po Niketić, 2004) na Velebitu nabral dinarsko smiljko, a je najdbo objavil pod imenom *Cerastium latifolium*, kasneje pa je bil primerek določen kot *C. alpinum* (Ascherson in Kanitz 1877).

Leta 1875 je Pančić smiljko, nabrano na Komovih v Črni Gori, navedel kot *Cerastium alpinum* (Pančić, 1875). V resnici je skoraj gotovo nabral dinarsko smiljko, ki je bila 14 let kasneje opisana kot nova vrsta (Beck in Szyszyłowicz, 1888) z istega nahajališča. Wraber (1995) piše, da opis vrste temelji na primerkih, ki jih je Szyszyłowicz leta 1886, na botaničnem potovanju skozi floristično malo poznane dele Črne Gore in Albanije, nabral na Komu Kučkem (Črna Gora) ter primerkih, ki sta jih nabrala F. Malý leta 1869 ter Th. Pichler (približno istočasno) na Malovanu (Velebit, Hrvaška).

Beck (1906) za floro Bosne in Hercegovine iz agregata *C. latifolium*, poleg *C. dinaricum*, navaja tudi *Cerastium uniflorum* Clairv., za planino Čvrstica. To je bil v regionalnih florah dolgo časa edini podatek za to vrsto na Balkanu (Hayek, 1927). Runemark je prvi predpostavil, da je prišlo do napake in gre v resnici za *C. dinaricum* (Runemark 1961, cit. po Niketić, 2004). To je potrdil tudi Šilić na terenu (Šilić, 2002).

Javorka svoj novi takson, *Cerastium hekuravense* Jáv. (Albanija) vzporeja s predstavniki serije *Latifolia* (Javorka, 1921: 18), vendar Hayek (1927) kljub temu vrsto navaja poleg *C. alpinum* in »*Cerastium lanatum*« (*Cerastium eriophorum*). To mišljenje je ostalo dolgo časa nespremenjeno – vse dokler nista Merxmüller in Strid zaključila, da *C. hekuravense* ne pripada kompleksu *C. alpinum*, nista pa predlagala konkretnih sorodstvenih povezav (Merxmüller in Strid, 1977, cit. po Niketić, 2004). Niketić (1999) je na osnovi originalnega opisa z albanskega dela Prokletija in nabranega materiala na Durmitorju (Črna Gora), takson *C. hekuravense* znova uvrstil v ser. *Latifolia*.

Na ozemlju Slovenije je dinarsko smiljko 9. avgusta 1994 prvi našel in določil Tone Wraber na Notranjskem Snežniku, obstaja pa verjetnost, da jo je tam v 19. stoletju videl že Plemel (Wraber, 1995).

1.1.4 Znana nahajališča vrste

Niketić (2004) navaja naslednjo razširjenost varietet in form, ki je prikazana tudi na sliki 2:
var. *dinaricum*

f. *dinaricum*

Bosna in Hercegovina: Dinara (XY26), Prenj (YJ32)

Hrvaška: Velebit (WK31, WK40, WK41)

Črna Gora: Durmitor (CN47), Prokletije (CN82, CN92)

f. *velebiticum* Degen & Lengyel

Hrvaška: Dinara (XJ17, XJ18), Velebit (WK21, WK22, WK31, WK40, WK41)

Črna Gora: Prokletije (CN82, CN92)

var. *herukavense* (Jáv.) Niketić

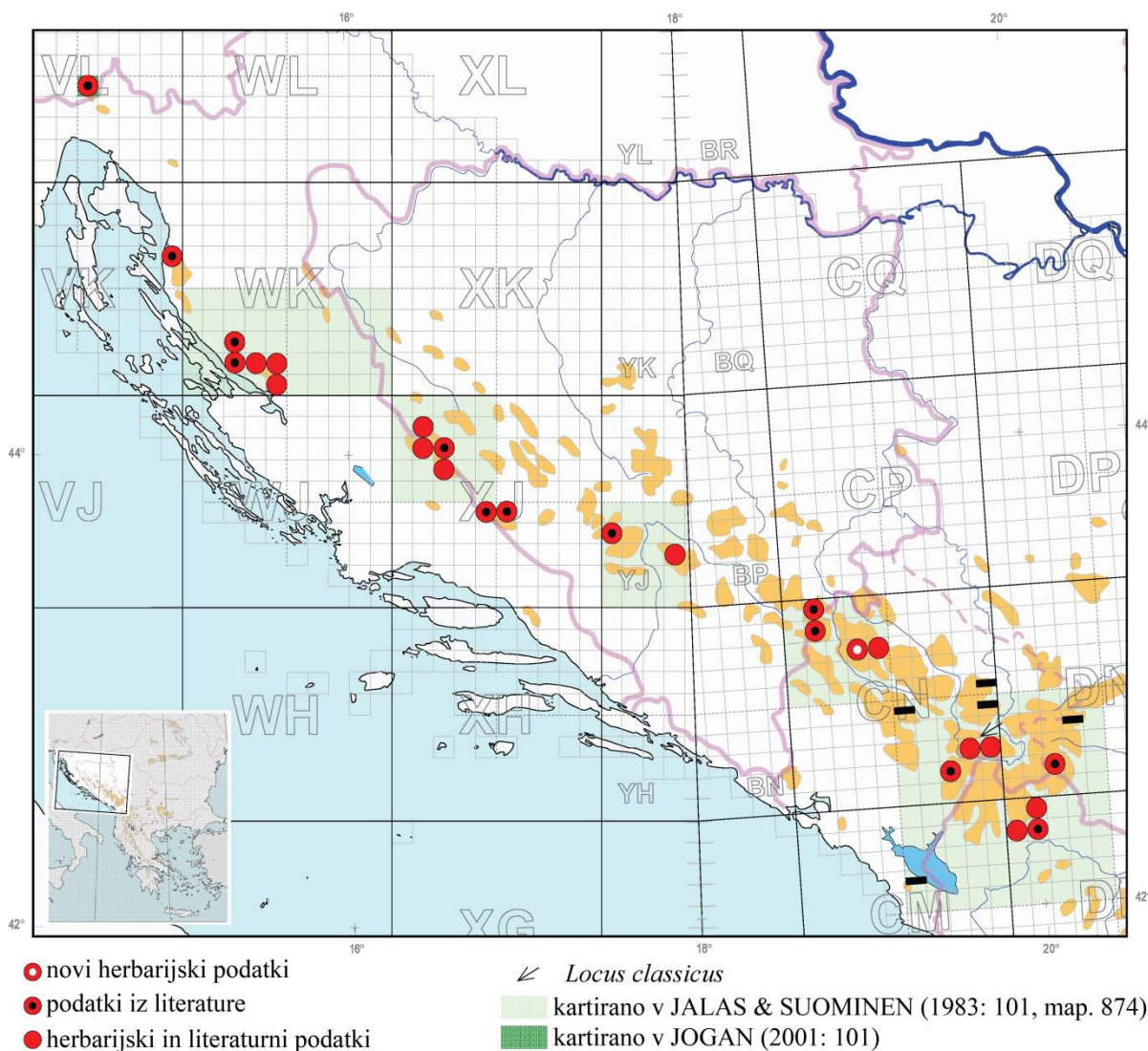
Hrvaška: Dinara (XJ17, XJ18), Velebit (WK31, WK41)

Bosna in Hercegovina: Prenj (YJ32)

Črna Gora: Durmitor (CN37, CN47), Prokletije (CN82, CN92)

Albanija: Prokletije (DM08, DM18, DM19)

Areala obeh varietet geografsko nista ločena in se, glede na znane podatke o razširjenosti (Niketić, 2004), v veliki meri prekrivata. Prav tako nista geografsko ločena areala obeh form znotraj var. *dinaricum*.

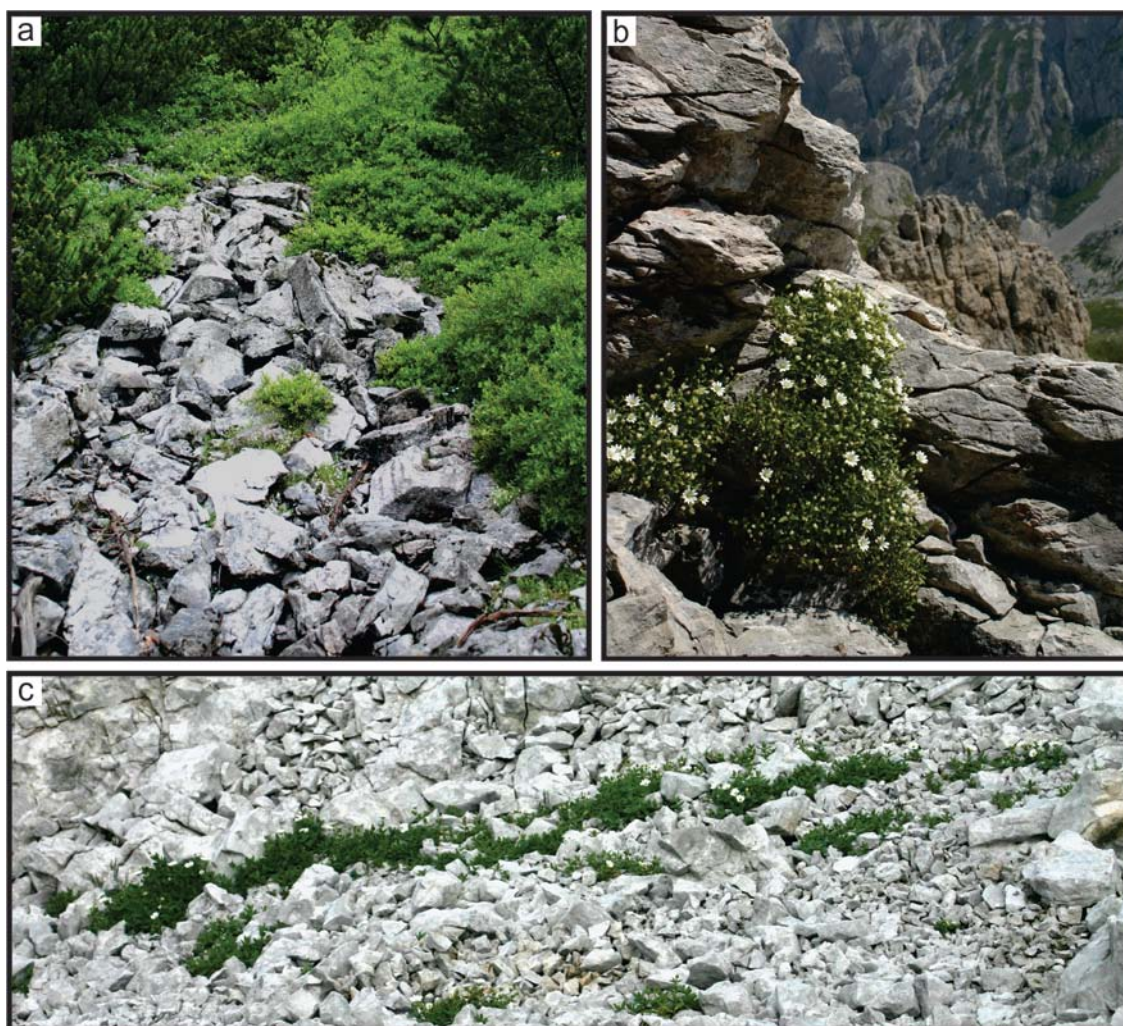


Slika 2: Zemljevid razširjenosti *Cerastium dinaricum* G. Beck & Szysz., črni pravokotniki predstavljajo napačne literaturne navedbe (Niketić, 2004: 98).

1.1.5 Ekologija in fitocenološki položaj vrste

Dinarska smiljka je vrsta melišč in skalnih razpok na karbonatni podlagi v subalpinskem pasu. Na Dinari in na južnem Velebitu se množično pojavlja na meliščih v sestojih asociacije *Cerastietum dinarici*, manj pogosto pa tudi v nekoliko vlažnejših sestojih

asociacij *Drypidetum linnaeanae-Adenostyletosum alliariae*, *Dryopteridetum villarii* oziroma *Bunio-Iberetum carnosae* (Horvat, 1931: 182, 188, cit. po Bačič in Jogan, 2004). Najdemo jo tudi na razpihaneh dinarskih grebenih v sestojih asociacije *Helianthemo alpestris-Caricetum kitaibeliana* (Horvat, 1930: 39, cit. po Bačič in Jogan, 2004), na nekoliko zavetrnih legah z dolgotrajno snežno odejo tudi v sestojih asociacije *Festucetum pungentis* oziroma v skalnih razpokah asociacije *Potentilletum clusiana* (Bačič in Jogan, 2004).



Slika 3: Rastišče dinarske smiljke *a* – na Snežniku, Slovenija, *b* – na Komovih, Črna Gora in *c* – na Prenju, Bosna in Hercegovina

1.1.6 Taksonomski položaj dinarske smiljke

Dinarska smiljka sodi v rod *Cerastium* L., ki spada v poddružino *Alsinoideae* (Candolle) Fenzl, ta pa je del družine *Caryophyllaceae*. Rod *Cerastium* obsega preko 100 vrst, od

katerih so nekatere kozmopolitske (Pax in Hoffmann, 1934). Največja pestrost znotraj rodu je prisotna na Holarktiki, nekatere skupine pa so pogoste tudi na področju Andov v Južni Ameriki. V flori Evrope je zabeleženih 58 vrst in 80 podvrst (Jalas, 1993).

Tipski podrod *Cerastium* je razdeljen na štiri sekcije. Tipska sekcija *Cerastium* sect. *Cerastium* je nadalje razdeljena na 3 podsekcije, podsekcija *Cerastium* sect. *Cerastium* subs. *Cerastium* pa je razdeljena na štiri serije. Serija *Latifolia* glede na zadnjo taksonomsko obdelavo obsega pet predstavnikov: *C. dinaricum*, *C. carinthiacum*, *C. runemarkii*, *C. subtriflorum* in *C. theophrasti*. Prvi dve (*C. dinaricum* in *C. carinthiacum*) sta obravnavani kot agregat vrst. Vsi predstavniki serije, ki rastejo na območju Balkanskega polotoka, imajo tetraploidno ($2n=36$) garnituro kromosomov (Niketić, 2004).

Objavljene študije, ki obravnavajo filogenetske odnose in biogeografijo rodu *Cerastium* (Scheen in sod., 2004, Brysting in sod., 2007), ne vključujejo niti dinarske smiljke niti številnih drugih vrst tega rodu, ki rastejo na območju Balkanskega polotoka, zato tudi ni znano, katere vrste so najbolj sorodne dinarski smiljki.

1.1.7 Varstvo dinarske smiljke v Sloveniji

Edino znano nahajališče dinarske smiljke v Sloveniji je na melišču (mezozojski apnenci) malo nad dnom vrtače, ki je najsevernejša od treh goličav na dnu večje podolgovate uleknine, imenovane Smrekova draga (Wraber, 1995). Nadmorska višina nahajališča je 1411 m. Vrtačo obdaja ruševje, ki je prednostni habitatni tip po Habitatni direktivi (Bačič in Jogan, 2004). Tako zaradi dinarske smiljke kot tudi zaradi prednostnih habitatnih tipov po Habitatni direktivi je območje Snežnika, skupaj s Smrekovo drago, uvrščeno v omrežje varstvenih območij Natura 2000. Populacija dinarske smiljke na Snežniku je maloštevilna, uspeva le nekaj 10 cvetočih poganjkov v okoli 10 blazinicah na nekaj kvadratnih metrih površine. Razmnoževalno je izolirana od balkanskih populacij, saj je najbližja znana populacija dinarske smiljke oddaljena 150 km (Vaganski vrh na Velebitu). Nahajališče na Snežniku zaradi prostorske majhnosti in floristične revščine ni fitocenološko določljivo (Wraber, 1995).

Dinarska smiljka uspeva v Sloveniji na svojem skrajnem severnem robu razširjenosti, v maloštevilni populaciji. V rdečem seznamu praprotnic in semenk (Rdeči seznam..., 2002) je uvrščena v kategorijo prizadetih vrst (E). Je izjemno redka: zaradi opustitve pregonske paše ovac po 2. svetovni vojni jo močno ogroža naravna sukcesija (zaraščanje območja z ruševjem in Waldsteinovo vrbo). V zadnjih letih se je populacija dinarske smiljke že zmanjšala, srednjeročno pa zaraščanje lahko povzroči propad populacije (Bačič in Jogan, 2004).

Bačič in Jogan (2004), v strokovnih izhodiščih za vzpostavljanje omrežja Natura 2000, predlagata varstvene smernice za varstvo *C. dinaricum* v Sloveniji. Redno, vsaj na dve leti, je treba spremljati stanje populacije in trende zaraščanja. Začetna inventarizacija bi zaradi maloštevilnosti populacije morala obsegati natančno kartiranje širšega območja rastišča ter mikrostrukturiranost sosednjih habitatnih tipov vključno z robom pasu ruševja, pri katerem je treba spremljati naravno razraščanje in ga po potrebi omejiti. Za vsako posamezno blazinico dinarske smiljke bi bilo treba vsako leto oceniti število jalovih in cvetočih poganjkov ter na slednjih prešteti število cvetov in oceniti kakovost dozorevanja plodov. Treba je spremljati morebitno naravno razraščanje ali razširjanje s semenom. V neposredni okolici je treba na nekaj let odstranjevati ruševje in Waldsteinovo vrbovje. Nahajališče mora ostati težko dostopno in pot do njega neoznačena. Nabiranje primerkov v kakršnekoli namene je nedopustno. Predlagata ponoven poskus gojenja iz semen v ljubljanskem Botaničnem vrtu ter, v primeru izumrtja, dopuščata možnost reintrodukcije z najbližjih južno ležečih populacij na Velebitu.

1.2 Balkanski polotok in Dinarsko gorstvo

Balkanski polotok se razteza od srednje Evrope na severu do vzhodnega Mediterana na jugu; omejujejo ga Jadransko morje na zahodu, Jonsko morje na jugozahodu, Egejsko morje na jugovzhodu ter Črno morje na vzhodu. Dinarsko gorstvo leži na zahodnem delu Balkanskega polotoka. Poteka v smeri severozahod-jugovzhod, vzporedno z obalo Jadranskega morja (Reed in sod., 2004). Na severozahodnem delu meji z alpskimi gorstvi, in sicer na črti Tolmin - Idrijca - Žiri - južni rob Ljubljanskega barja - Škofljica - Temenica - Šmarjeta - Krka - Sava, na zahodu zajema tudi Istro in otoke, na jugu pa se razteza do

porečij Kolubare in Morave, oziroma do Kosovske kotline in Prokletij v Črni Gori (Enciklopedija..., 1988). Na jugu se nadaljuje v Pindsko gorstvo in grške otoke (Reed in sod., 2004). Dinarsko gorstvo sega v majhen del severovzhodne Italije, obsega južno Slovenijo, srednjo in jugovzhodno Hrvaško, jugozahodno Bosno, celotno Hercegovino, južno Črno Goro in majhen del zahodne Albanije (Tvrković in Veen, 2006). Sestavljajo ga zlasti karbonatne kamnine; ker se te dobro raztapljajo, je hidrologija na tem območju v veliki meri odvisna od podzemnih voda. Na mnogih delih (npr. v Dalmaciji in Črni gori) je posledično prisotno pomanjkanje površinske vode, kakovost prsti pa je slaba (Reed in sod., 2004).

Balkanski polotok, zlasti njegovo gorato zahodno območje, predstavlja eno izmed najpomembnejših vročih točk biodiverzitete v Evropi (Kryštufek in Reed, 2004). Velika stabilnost okolja skozi geološko zgodovino, prisotnost kopenskih mostov ter topografska in klimatska raznolikost so ključni za razlago velike biotske raznovrstnosti na tem območju (Polunin, 1997; Kryštufek in Reed, 2004).

Balkanski polotok je v pleistocenu predstavljal v Evropi enega izmed najpomembnejših refugijev za rastline in živali (Tzedakis, 2004). Klimatska nihanja v kvartarju so povzročila migracije in lokalna izumrtja populacij – zaradi klimatskih sprememb med glaciali in interglaciali je prihajalo do zmanjševanja ali povečevanja in fragmentacije območij razširjenosti posameznih vrst (Comes in Kadereit, 1998; Petit, 2003). Izolacije populacij v interglacialih, s sekundarnimi stiki v glacialih, so oblikovale današnje vzorce genetske raznolikosti nekaterih vrst na zahodnem Balkanu (Kučera, 2008; Kryštufek, 2007; Frajman in Oxelman, 2007). Dinarsko gorstvo je bilo, v primerjavi z ostalimi južnoevropskimi gorstvi, v ledenih dobah manj prizadeto, saj so bili poledeneli le nekateri zelo visoki vrhovi, snežni pokrov na ostalih delih pa ni bil ves čas prisoten (Turill, 1929). Genetske študije kažejo, da je največji delež vrst po ledenih dobah koloniziral severnejše dele Evrope ravno z območja Balkanskega polotoka (Hewitt, 2004) – mnoge vrste so na Balkanu preživele dramatična klimatska nihanja, kar daje območju, z ozirom na spremembe, ki spremljajo globalno ogrevanje, še večji pomen (Kryštufek in Reed, 2004).

V Evropi je, v primerjavi z npr. Severno Ameriko ali Azijo, območje, ki je primerno za preživetje refugijskih populacij (južno od Alp), precej omejeno. Za dolgoročno preživetje vrst na kontinentu so bile bistvenega pomena populacije na jugu; severne populacije so navadno izginile ob koncu interglacialov, zato morebitno izumrtje južnih populacij med glaciali ali interglaciali pomeni tudi izumrtje vrste v Evropi. Prevelik pritisk na take populacije, zaradi človekovih posegov v okolje v trenutnem interglacialu, lahko vodi do znatnega povečanja stopnje izumiranja ob koncu naslednjega klimatskega cikla (Tzedakis, 2004). Vse do holocena je bil vpliv človeka na večjem delu Balkanskega polotoka najverjetneje precej majhen. S pojavom intenzivnega kmetijstva se je v zadnjem času pospešila degradacija okolja, kljub temu pa se je na Balkanu dobro ohranil velik delež gozdnih ekosistemov. Balkan ima zato v evropskem smislu velik potencial in pomen pri varovanju in ohranjanju narave, saj predstavlja zadnji »nedotaknjen košček divjine« na kontinentu. Slabo načrtovanje izrabe virov predstavlja neposredno grožnjo obstoju številnih stenoendemitov, zato je prepoznavanje in ohranjanje vročih točk vrstnega bogastva na tem območju izjemnega pomena (Kryštufek in Reed, 2004). Podrobne študije genetske raznolikosti taksonov v tej regiji so pomembne za vzpostavljanje varstvenih prioritet, območje zahodnega Balkana pa je pomembno tudi za razumevanje diverzitete in zgodovine mediteranske flore (Kučera, 2008).

1.3 Natura 2000

Natura 2000 je evropsko omrežje posebnih varstvenih območij, ki so jih določile države članice Evropske unije. Njen glavni cilj je ohraniti biotsko raznovrstnost za prihodnje rodove. Na varstvenih območjih želimo ohraniti živalske in rastlinske vrste ter habitate, ki so redki ali pa so v Evropi že ogroženi. Kot temeljna predpisa pravnega reda evropske unije s področja varstva narave in hkrati zakonska osnova za vzpostavitev omrežja Natura 2000 sta obveljali dve direktivi: Direktiva o prostoživečih pticah - Council Directive 79/409/EEC on the Conservation of wild birds iz leta 1979 in Direktiva Evropske skupnosti za ohranitev naravnih habitatov ter prostoživeče favne in flore - The Council Directive 92/43/EEC on the Conservation of natural habitats and wild fauna and flora iz leta 1992. Direktive ne veljajo neposredno, ampak kot obveznost opredeljujejo samo

skupni cilj. Vsaka država članica EU mora s svojim pravnim sistemom v določenem roku zagotoviti njihovo izvajanje (Skoberne, 2004).

Območja Nature 2000 se opredeljujejo le za tiste vrste in habitatne tipe, ki so naštetih v prilogah Direktive o habitatih, zato je treba vedeti, katere od teh vrst so prisotne na območju, na katerem se vzpostavlja Natura 2000 omrežje, kje uspevajo, kakšni sta njihova biologija in ekologija in kateri so vzroki za ogroženost. Na prilogo II Direktive o habitatih so uvrščene vrste, ki so evropskega pomena (Skoberne, 2004), med njimi je tudi dinarska smiljka – *Cerastium dinaricum* Beck & Szyszylł. (Direktiva sveta..., 2007). To pomeni, da mora vsaka država članica Evropske unije zagotoviti ugodno stanje ohranjenosti te vrste, tako da določi območja, v katerih jo bo ohranjala (po Skoberne, 2004).

V mrežo območij Natura 2000 je vključeno le širše območje nahajališča dinarske smiljke v Sloveniji (Smrekova draga na Snežniku). Druge države z znanimi nahajališči dinarske smiljke (Hrvaška, Bosna in Hercegovina, Črna Gora) še niso članice Evropske unije in zato nimajo opredeljenih območij v okviru Nature 2000. V prihodnosti, ob morebitni vključitvi teh držav v Evropsko unijo, bo tudi znotraj njihovih meja treba opredeliti območja Nature 2000, torej tudi območja, znotraj katerih se bo ohranjala dinarska smiljka.

1.4 Filogeografija in varstvena genetika

Koncept biodiverzitete združuje tri temeljne ravni: ekosisteme, vrste in gene (vključno z nekodirajočimi deli DNA). Raven genov se nanaša na genetsko raznolikost znotraj vrst. Definira evlucijski potencial vrst in je posledično osnovnega pomena za prilagoditev populacij na nove okoljske razmere ter dolgoročno ohranjanje biodiverzitete ob globalnih spremembah. Genetska raven biodiverzitete pa ni pomembna le za ohranjanje evlucijskega potenciala vrst, pač pa tudi za delovanje ekosistema. Pri načrtovanju strategij za ohranjanje biodiverzitete bi zato morali upoštevati tudi znotrajvrstno genetsko raznolikost (Gugerli in sod., 2008; Forest in sod., 2007; Moritz, 2002).

Filogeografija je raziskovalno področje, ki preučuje geografsko razporeditev evlucijskih linij, zlasti znotraj vrst ter med ozko sorodnimi vrstami. Ukvarja se z zgodovinskimi,

filogenetskimi komponentami prostorske razporeditve genskih linij. Filogeografi skušajo interpretirati način in obseg, s katerima so zgodovinski procesi populacijske demografije pustili evlucijske sledi na trenutni geografski razporeditvi genetskih lastnosti organizmov (Avice, 2000).

Osnovo za sledenje genskim drevesom skozi njihov razvoj predstavljajo sodobni molekularni pristopi. V večini filogeografskih raziskav živalskih vrst je uporabljena mitohondrijska DNA (mtDNA), saj ima številne ugodne lastnosti (npr. majhnost, hitra stopnja evolucije), zaradi katerih je primerna za filogeografske analize (Lomolino in sod., 2010). Mitohondrijska DNA rastlin ni pogosto uporabljena v filogeografskih študijah, saj se njena struktura (velikost, postavitve in vrstni red genov) izjemno hitro spreminja (Petit in Vendramin, 2007). Plastidna DNA (cpDNA) rastlin v splošnem evoluirajo počasneje kot mtDNA živali, a se kljub temu nekateri njeni deli spreminjajo relativno hitro; število študij, ki prikazujejo filogeografsko strukturo cpDNA se je znatno povečalo z uvedbo metod sekvenciranja, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo – PCR (Lomolino in sod., 2010). Tako pri živalih kot pri rastlinah so v študijah uporabljeni tudi nekodirajoči deli jedrnega genoma. Za določitev časovno manj oddaljene populacijske genetske dinamike in filogeografske divergence, na primer v poznem pleistocenu in holocenu, so potrebni visoko variabilni genetski označevalci, kot so mikrosateliti ali AFLPs – *amplified fragment length polymorphisms* (Hewitt, 2001).

Filogeografske metode predstavljajo uporabno orodje pri testiranju različnih zgodovinskih scenarijev, ki razlagajo današnjo geografsko razporeditev organizmov. Z ustreznimi filogeografskimi analizami lahko odkrijemo evlucijsko ločenost populacij v preteklosti, tudi če genske linije, ki jih analiziramo, nimajo vpliva na preživetveno zmogljivost organizmov. Populacije, ki so dolgo časa izolirane, so najboljši kandidati za razlike v genetskih adaptacijah, saj so lahko dolgo časa izpostavljene divergentnim selekcijskim pritiskom, brez homogenizacijskega učinka genskega pretoka. V študijah biodiverzitete so filogeografske enote, ki so določene z domnevno »nevtralnimi« molekularnimi označevalci, posebnega pomena ravno zato, ker lahko predstavljajo izvor divergentnih organizemskih adaptacij, ohranjanje le-teh pa je lahko ključnega pomena v varstveni biologiji (Avice, 2000).

Populacije, ki so genetsko enovite, združujemo tudi pod izrazom evolucijsko pomembne enote (ESUs – *evolutionarily significant units*). Izraz se nanaša na jasno ločene genetske skupine, pogosto definirane z uporabo mitohondrijske DNA pri živalih in plastidne DNA pri rastlinah (Lomolino in sod., 2010). Definicija ESU ni univerzalna, saj gre za do neke mere arbitrarno določitev mere genetskih razlik, ki zadoščajo za znotrajvrstno razdelitev na evolucijsko pomembne enote (Avise, 2000). Fraser in Bernatchez (2001) podajata pregled različnih definicij ESU in jo splošno definirata kot evolucijsko linijo, ki je od drugih takih linij znotraj višje organizacijske ravni (linije) vrste, ločena z močno omejenim genskim pretokom.

Takšne, genetsko izolirane linije postavlja v ospredje varstvena genetika, ki poskuša z uporabo genetskih tehnik in teorije zmanjšati grožnjo izumrtja ogroženih vrst. Dolgoročno je njen cilj ohranitev vrst kot dinamičnih entitet, ki so se sposobne spopadati s spremembami v okolju. Kot samostojna uporabna disciplina se varstvena genetika osredotoča na genetske posledice, ki nastanejo ob zmanjšanju nekoč velikih populacij na majhne enote, v katerih so stohastični faktorji in učinek razmnoževanja v sorodstvu (*inbreeding*) bistvenega pomena (Frankham in sod., 2009).

Pri načrtovanju varstvenih strategij ima velik pomen ocena metapopulacijske strukture in genskega pretoka med populacijami. Na tem področju so dolgo časa prevladovali klasični populacijsko genetski pristopi, ki sta jih, na osnovi F-statistike, utemeljila Fisher in Wright v 30. letih 20. stoletja. Ti pristopi so dobro razumljivi in enostavni za uporabo (Pearse in Crandall, 2003). V osnovi gre za izračun indeksa fiksacije (F_{ST}) ali drugih indeksov, ki temeljijo na Wrightovi F-statistiki (θ , Φ_{ST} , R_{ST} , Q_{ST}). F_{ST} je definiran kot delež genetske raznolikosti, ki jo prispevajo razlike v frekvenci alelov med populacijami (Holsinger in Weir, 2009). Te relativne mere genetske variance veliko raziskovalcev še danes uporablja kot glavne parametre za opis genetske strukture populacij (Holsinger in Weir, 2009; Pearse in Crandall, 2003). Zaradi majhnosti in izoliranosti populacij vrst, ki so v središču zanimanja varstvene genetike, idealizirani modeli populacijske strukture, migracij, demografije in evolucije, ki temeljijo na F_{ST} , pogosto ne dajo najboljših rezultatov. Z računalniško zahtevnejšimi analizami, ki temeljijo na koalescentni teoriji (teorija v populacijski genetiki, ki temelji na določitvi točke na kateri pride do združitve alelov v

skupnem predniku – deluje iz opaženega sedanjega stanja nazaj skozi čas: Freeland in sod., 2011), lahko ocenimo več parametrov hkrati in določimo tiste, ki najbolj opišejo populacijsko genetske podatke. Z njimi lahko ocenimo: (1) število genetsko definiranih podpopulacij v vzorcu in število genetsko jasnih skupin, ki smo jih zajeli z vzorčenjem; (2) diferenciacijo in asimetrični genski pretok za vsak par populacij; (3) relativni učinek izolacije in migracij; (4) efektivno velikost populacije danes in v preteklosti ter (5) demografsko zgodovino populacij. Za različne vrste analiz lahko uporabimo računalniške programe kot so STURCTURE, BAPS, GENETREE, BAYESASS+ in drugi. Z uporabo metode hierarhične filogeografske analize kladov (NCPA) pa lahko, za razliko od metod, ki jih uporabljajo prej omenjeni programi, analiziramo večje število hkratnih zgodovinskih dogodkov (fragmentacije, kolonizacije, sprememba območja razširjenosti), ki so vplivali na trenutno razširjenost genetske pestrosti (Pearse in Crandall, 2003).

V varstveni genetiki se pogosto pojavlja vprašanje o relativnem pomenu nevtralne proti adaptivni genetski variabilnosti pri načrtovanju varstvenih strategij (Bonin in sod., 2006; Fraser in Bernatchez, 2001). Tudi študije genetske variabilnosti so tako dveh tipov: (1) študije kvantitativnih genetskih znakov, ki naj bi bili direktna tarča naravne selekcije in tako odražali adaptivni potencial populacij ali vrst in (2) študije nevtralne genetske variacije, ob predpostavki, da je ta neposredno povezana z variacijo kvantitativnih znakov. Študij nevtrálnih molekularnih označevalcev je hitrejši, cenovno ugodnejši ter manj zahteven in se ga zato pogosto uporablja pri ocenjevanju globalne genetske diverzitete (Bonin in sod., 2006).

1.4.1 Varstvena genetika rastlin

Ohranjanje rastlinske genetske raznolikosti je mogoče *in situ* (ohranjanje populacij v divjini) ali *ex situ* - v zbirkah kot so semenske banke in banke DNA in z vzdrževanjem živih osebkov v botaničnih vrtovih. Varovanje *in situ* je bistveno za preživetje velikega dela rastlinskih vrst. Pri vzdrževanju rastlinske genetske raznolikosti v divjih populacijah s pomočjo filogenetskih metod, ki temeljijo na sekvenciranju DNA, raziščemo evolucijska razmerja med rastlinskimi vrstami in z molekularnimi analizami določimo genetsko raznolikost med populacijami in znotraj njih. Raziščemo lahko tudi razsežnost raznašanja

diaspor (semen oz. plodov) in peloda ter razmnoževalno strategijo raziskovanih vrst. Te metode predstavljajo temelj za odločitve o varovanju populacij, ki so viabilne v evolucijskem smislu. (Henry, 2006).

Pri načrtovanju varstvenih strategij za ogrožene vrste imamo pogosto omejena sredstva in možnosti, zato ne moremo zaščititi vseh populacij vrste. Izbrati moramo populacije, ki so najpomembnejše za ohranjanje in varovanje. Z opisom razporeditve genetske raznolikosti znotraj vrste lahko določimo območja in varstvene ukrepe, s katerimi zagotovimo največjo genetsko variabilnost znotraj rastlinske vrste (Dostálek in sod., 2010). Neel (2003) ugotavlja, da je treba za ohranjanje vseh alelov, ob nepoznavanju distribucije genetske raznolikosti znotraj vrste, zaščititi 53-100% vseh populacij. Ob poznavanju populacijsko genetske strukture in drugih ravni biodiverzitete je lahko delež zaščitene populacij precej nižji, kljub temu pa so zajeti vsi aleli znotraj vrste (Petit in sod., 1998; Neel, 2003).

V varstveni genetiki se za študije populacijsko genetske strukture znotraj vrst pri rastlinah v zadnjih letih kot molekulske označevalce najpogosteje uporablja jedrne mikrosatelite (Shanjani in sod., 2010; Jacquemyn in sod., 2010; Koopman in Carstens, 2010), AFLP (Bonin in sod., 2007; Smith in Waldren, 2010; Barnaud in Houliston, 2010; Mijnsbrugge in sod., 2010; Prinz in sod., 2010; Hargreaves in sod., 2010), cpDNA (Marchelli in sod., 2010; Shanjani in sod., 2010; Kuo in sod., 2010; Koopman in Carstens, 2010; Schirone in sod., 2010), redkeje pa tudi izocime (Dostálek in sod., 2010) ter mtDNA (Marchelli in sod., 2010).

V splošnem študije s področja varstvene genetike predstavljajo le teoretske znanstvene temelje za pripravo varstvenih načrtov za preučevane vrste; zastavlja se vprašanje, v kolikšni meri so rezultati takih študij kasneje v resnici uporabljeni pri pripravi naravovarstvenih strategij.

1.5 Velikost genoma

Velikost genoma lahko izrazimo na dva načina: (1) kot vsebnost DNA ene kromosomske garniture organizma (»monoploidna« ali »osnovna« velikost genoma – Cx-vrednost) ali (2) kot vsebnost DNA nepodvojenega haploidnega genoma (»holoploidna« velikost genoma – C-vrednost). C-vrednost se nanaša na polovico vsebnosti DNA somatskih celic (2C-vrednost), ne glede na organizmovno ploidno stopnjo, Cx-vrednost pa je 2C-vrednost, deljena z organizmovno ploidno stopnjo (Kron in sod., 2007).

Velikost genoma je med živimi organizmi izjemno variabilna. Pri različnih rastlinskih vrstah je razpon izmerjenih C-vrednosti od 0,065 pg vse do 127,4 pg (Kron in sod., 2007). Opažene variacije velikosti genoma (ali njihova odsotnost) predstavljajo pomembno informacijo na področju evolucijske biologije, vse bolj pa tudi na področjih celične in molekularne biologije ter raziskav genomov (Kron in sod., 2007). Variacija v velikosti genoma je očitna zlasti med vrstami. Razlika med najmanjšim in največjim izmerjenim genomom pri rastlinah je kar 8500-kratna. Večina C-vrednosti pri rastlinah je relativno nizka, poleg teh pa se pojavlja le nekaj skupin z ekstremno velikim genomom (Gregory, 2005). Obstajajo številni podatki o znotrajvrstni variaciji velikosti genoma (Cx-vrednosti) pri rastlinah. Najpogosteje je pripisana kromosomskim razlikam (aneuploidija, poliploidija, B-kromosomi, spolni kromosomi), kriptičnim vrstam in variaciji v velikosti kromosomov. Dokazi za znotrajvrstno variacijo velikosti genoma, ki niso povezani z naštetimi razlogi, so redki in kontroverzni (pogosto posledica eksperimentalnih napak), kljub temu pa se zdi verjetno, da lahko prihaja do divergence v velikosti genoma med populacijami (Kron in sod., 2007).

Pri rastlinah pogosto prihaja do variacije v ploidni stopnji, fenotipske plastičnosti, hibridizacij (in večje viabilnosti nastalih hibridov), zato so sistematske raziskave nekaterih skupin rastlin izjemno kompleksne. Meritve velikosti genoma lahko, zlasti pri takih skupinah, znatno prispevajo k razumevanju evolucije. Z meritvami velikosti genoma lahko razlikujemo med heteroploidnimi taksoni, hkrati pa lahko opazimo tudi morebitno divergenco velikosti genoma pri homoploidnih vrstah (Kron in sod., 2007).

1.6 Namen diplomskega dela

V okviru diplomskega dela sem, z uporabo različnih nevtralnih molekulskih označevalcev (AFLP, zaporedja regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA in zaporedja vmesnika ITS jedrnega ribosomalnega cistrona) in meritvami relativne velikosti genoma, skušal razkriti populacijsko genetsko strukturo dinarske smiljke in preveriti položaj vrste znotraj rodu ter ugotoviti ali vrsta predstavlja monofiletsko skupino.

Z uporabo nevtralnih molekulskih označevalcev sem želel preveriti, ali je takson, ki ga v nedavni taksonomski reviziji rodu *Cerastium* na Balkanu Niketić (1999) obravnava kot varieteto dinarske smiljke (*C. dinaricum* var. *hekuravense*), morda kljub vsemu samostojna vrsta (*C. hekuravense*), kot jo je leta 1921 opisal Javorka ter skušal kritično ovrednotiti obstoječo znotrajvrstno taksonomijo dinarske smiljke.

Na podlagi sinteze rezultatov pridobljenih s pomočjo različnih molekulskih označevalcev sem skušal postaviti hipotezo za razlago opažene populacijsko genetske strukture dinarske smiljke.

Razkrita filogeografsko strukturo dinarske smiljke sem nameraval uporabiti kot temelj za predlog evolucijsko pomembnih enot (ESUs – *evolutionarily significant units*), ki so bistvenega pomena za načrtovanje varstvenih strategij vrste.

1.7 Delovne hipoteze

- (1) Dinarska smiljka predstavlja znotraj rodu monofiletsko skupino.
- (2) Znotraj rodu je *C. dinaricum* najbolj soroden *C. hekuravense* in *C. carinthiacum*.
- (3) Glede na močno disjunkten areal in veliko medsebojno oddaljenost populacij dinarske smiljke, bo opazna znatna genetska diferenciacija populacij znotraj vrste.
- (4) Obstoječa znotrajvrstna taksonomija dinarske smiljke, ki temelji le na odsotnosti oz. prisotnosti žleznih dlak, se ne ujema z filogenetsko strukturo znotraj vrste.
- (5) *C. dinaricum* vključuje več evolucijsko pomembnih enot (ESUs).

2 MATERIAL IN METODE

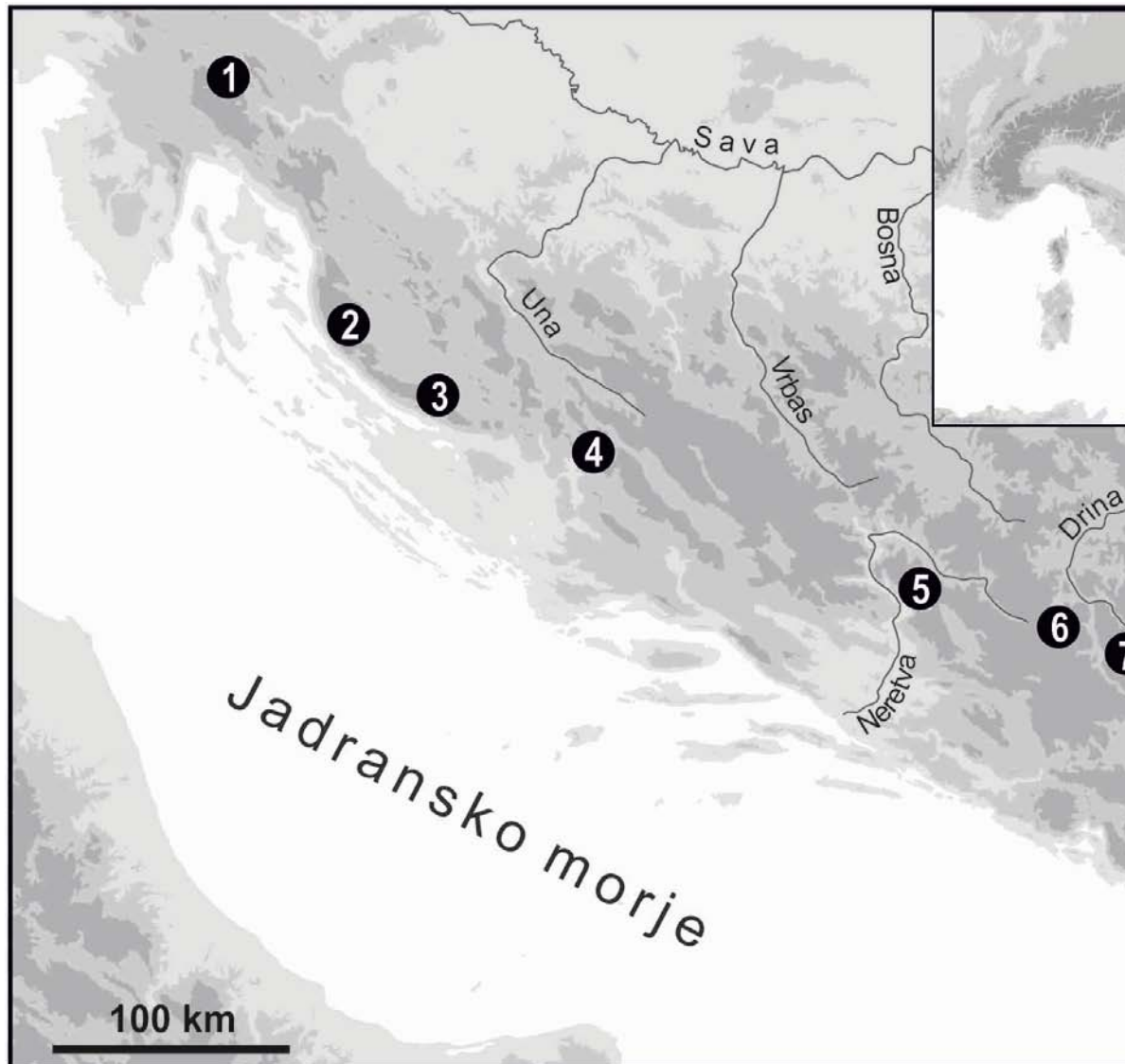
2.1 Nabiranje vzorcev in mesta vzorčenja

Nabrali smo vzorce iz 10 populacij dinarske smiljke, razporejenih po celotnem območju njene razširjenosti (slika 4, preglednica 1). Vzorčne populacije smo izbrali glede na zbrane podatke o nahajališčih vrste iz literature in herbarijskih primerkov (Niketić, 2010). Pri vzorčenju šestih populacij sem sodeloval sam (1, 5, 7-10), vzorce osebkov iz preostalih štirih populacij pa so nabrali botanični kolegi iz Zagreba in Beograda. Preverili smo pojavljanje vrste na 14 znanih nahajališčih; na desetih smo uspevanje vrste potrdili in tudi nabrali vzorce, na štirih (Bosna in Hercegovina: Čvrstica, Troglav; Kosovo: Prokletije, Marijaš in Bogdaš) pa dinarske smiljke nismo našli. Za vzorčenje na Snežniku smo pridobili dovoljenje ARSO (številka 35603-6/2010-4).

Če je bilo mogoče, smo nabrali vzorce 20 osebkov iz vsake populacije (5, 6, 7, 8, 10). Na vzorčnih mestih, na katerih je bilo število osebkov v populaciji manjše od 20, smo nabrali vzorce vseh osebkov v populaciji (1, 2, 3, 4). Iz populacije 9 smo nabrali vzorce 30 osebkov.

Zelene liste posameznih osebkov smo nabrali v ločene čajne filter vrečke. Filter vrečke z vzorci osebkov iz ene populacije smo vstavili v večjo plastično vrečko s *silica gelom* (za sušenje rastlinskega materiala), to pa nato neprodušno zaprli. Ko je bil material suh, smo *silica gel* odstranili iz vrečk ter jih spet neprodušno zaprli; vrečke z nabranimi vzorci smo shranili v zaprtih plastičnih posodah na suhem mestu.

Druge vrste rodu *Cerastium*, ki sem jih vključili v filogenetsko analizo, so navedene v preglednici 2. Njihovo nabiranje je potekalo na enak način, kot je opisano zgoraj.



Slika 4: Zemljevid z označenimi vzorčenimi populacijami dinarske smiljke

nahajališče datum nabiranja, nabiralci	zemljepisna širina/ zemljepisna dolžina	nadmorska višina [m]	tip rastišča
mnjska, Snežnik, Smrekova Draga Frajman in D. Kutnjak	45,5953 N 14,4539 E	1431	apnenčasto melišče v vrtači ruševjem in Waldsteinovo v
vaška, Velebit, Malovan Bogdanović in I. Rešetnik	44,6502 N 15,0313 E	1579	severno, ob poti, na robu ses ruševja
vaška, Velebit, Vaganski vrh Bogdanović in I. Rešetnik	44,3655 N 15,5042 E	1690	melišča na S strani
cija, Dinara, Sinjal Alegró in S. Bogdanović	44,0626 N 16,3833 E	1831	skalnata področja pod vrhom
govina: Hercegovina, Prenj, greben Vjetrana o glavo in Lupoglavom Schönswetter, B. Frajman in D. Kutnjak	43,5486 N 17,8817 E	1864	apnenčasto melišče in skalno
govina: Bosna, Volujak, Studenac Bikić	43,2535 N 18,6934 E	2100	melišča na V strani, združba zaplat s <i>Papaver kernerii</i>
mitor, dolina Škrčkega jezera, Čuskija, Z od a Schönswetter, B. Frajman in D. Kutnjak	43,1283 N 19,0300 E	1883	fina, rahlo do pretežno mobi apnenčasta melišča
mitor, Velika Kalica, Z od Kuline Schönswetter, B. Frajman in D. Kutnjak	43,1189 N 19,0719 E	1977	fina, rahlo do pretežno mobi apnenčasta melišča
rovi, JV greben Koma Kučkega Schönswetter, B. Frajman in D. Kutnjak	42,6775 N 19,6458 E	2259	apnenčasta melišča in skalno
vo, vrh Žijevo Schönswetter, B. Frajman in D. Kutnjak	42,5539 N 19,5064 E	2140	senčne, hladne skalne razpo dolgo časa obstojno snežno

Preglednica 2: Druge vrste rodu *Cerastium* vključene v filogenetsko analizo

vrsta, podvrsta	oznaka populacije	zemljepisna širina/ zemljepisna dolžina	datum
<i>Cerastium alpinum</i> L.	Calp C299	42,0978 N 20,8744 E	Makedonija: Šar planir 20. 8. 2006, M. Niketić
<i>Cerastium alpinum</i> L.	Calp C046	47,3486 N 14,7158 E	Avstrija: Štajerska/Steir Alpen, Seckauer Zinke 10. 7. 2010, G. Pflugbe
<i>Cerastium arvense</i> L. subsp. <i>strictum</i> (L.) Gaudin	Carv C002	46,4406 N 14,4317 E	Slovenija: Gorenjska, I Dolga njiva 8. 7. 2010, B. Frajman
<i>Cerastium banaticum</i> (Rochel) Heuffel subsp. <i>kosaninii</i> Georgiev	Cban C241	41,0015 N 21,1693 E	Makedonija: Baba Plar 16. 7. 2010, M. Niketić
<i>Cerastium carinthiacum</i> Vest	Ccar C006	46,3994 N 11,7989 E	Italija: Južna Tirolska/ od prelaza San Pellegr 5. 9. 2010, B. Frajman,
<i>Cerastium carinthiacum</i> Vest	Ccar C050	46,5019 N 14,4947 E	Avstrija: Koroška/Kärn (Eisenkappler Hütte) 13. 7. 2010, G. Pflugbe
<i>Cerastium carinthiacum</i> Vest	Ccar C005	47,6072 N 15,1578 E	Avstrija: Štajerska/Steir Hochschwab: Z in S pe 2. 8. 2010, P. Schöns
<i>Cerastium carinthiacum</i> Vest	Ccar C043	46,3794 N 13,4064 E	Italija: Friuli Venezia-G gore Sart (Žrd) 11. 9. 2010, P. Schöns (»se nadaljuje«)

Preglednica 2. Druge vrste rodu <i>Cerastium</i> vključne v filogenetsko analizo («siadajljevanje»)			
<i>Cerastium cerastoides</i> (L.) Britton	Ccer C007	42,5278 N 20,1572 E	Kosovo: Prokletije, Đeravica, vzhod Đeravice 14. 8. 2010, P. Schönswetter, B. Frajman
<i>Cerastium comatum</i> Desv.	Ccom C057	34,9939 N 32,6811 E	Ciper: Južni Ciper, dolina Cedar, JN 29. 4. 2010, P. Schönswetter in B. Frajman
<i>Cerastium decalvans</i> Schloss. & Vuk. subsp. <i>decalvans</i>	Cdec C008	45,9289 N 13,8256 E	Slovenija: Primorska, Trnovski gozd 27. 7. 2010, B. Frajman
<i>Cerastium decalvans</i> Schloss. & Vuk. subsp. <i>decalvans</i>	Cdec C011	42,6889 N 19,6586 E	Črna Gora: Komovi, Međukomlje 13. 8. 2010, P. Schönswetter, B. Frajman
<i>Cerastium eriophorum</i> Kit. ex Rochel.	Ceri C025	42,5278 N 20,1572 E	Kosovo: Prokletije, Đeravica, vzhod Đeravice 14. 8. 2010, P. Schönswetter, B. Frajman
<i>Cerastium eriophorum</i> Kit. ex Rochel.	Ceri C051	47,2742 N 14,3558 E	Avstrija: Štajerska/Steiermark, Nock Tauern, Kl. Zinken 12. 7. 2010, G. Pflugbeil in A. Tribel
<i>Cerastium fontanum</i> Baumg. subsp. <i>fontanum</i>	Cfon C026	46,5881 N 11,7581 E	Italija: Južna Tirolska/Südtirol/Alto Gruppe, SZ od Regensburger Hütte 4. 9. 2010, B. Frajman, R. Flatscher
<i>Cerastium grandiflorum</i> Waldst. & Kit.	Cgra C027	43,1294 N 19,0747 E	Črna Gora: Durmitor, Z od Struge, jezero in ledenikom Debeli namet 11. 8. 2010, P. Schönswetter, B. Frajman
<i>Cerastium grandiflorum</i> Waldst. & Kit.	Cgra C100	44,5292 N 15,1439 E	Hrvaška: Velebit, Oštarijska vrata 14. 7. 2010, S. Bogdanović in I. Rešetar
<i>Cerastium grandiflorum</i> Waldst. & Kit.	Cgra C103	43,3659 N 16,9851 E	Hrvaška: Dalmacija, Biokovo, Bast 17. 7. 2011, A. Alegro in S. Bogdanović

<i>Cerastium hekuravense</i> Jav.	Cdin C024	42,3944 N 19,9469 E	Albanija: Tropoj- greben in S pobo 16. 8. 2010, P. S.
<i>Cerastium julicum</i> Schellm.	Cjul C031	46,4469 N 14,4294 E	Slovenija: Karav 8. 7. 2010, B. Fr.
<i>Cerastium malyi</i> (Georgiev) Niketić subsp. <i>malyi</i>	Cmal C032	43,1319 N 19,0842 E	Črna Gora: Durn 11. 8. 2010, P. S.
<i>Cerastium neoscardicum</i> Niketić	Cneo C326	42,2354 N 20,9384 E	Kosovo: Šar Plar 10. 7. 2007, M. P.
<i>Cerastium pedunculatum</i> Gaudin	Cped C058	47,0339 N 10,7178 E	Avstrija: Tirolsk: Roter Schrofen 29. 8. 2008, B. F.
<i>Cerastium sylvaticum</i> Waldst. & Kit.	Csyl C039	46,1283 N 13,7453 E	Slovenija: Primo 22. 7. 2010, B. F.
<i>Cerastium theophrasti</i> Merxm. & Strid	Cthe C328	40,0820 N 22,3507 E	Grčija: osrednja 17. 6. 2005, M. P.
<i>Cerastium uniflorum</i> Clairv.	Cuni C056	46,9636 N 12,9967 E	Avstrija: Korošk Sadniggruppe, N 13. 7. 2010, G. M.
<i>Cerastium uniflorum</i> Clairv.	Cuni C059	47,3486 N 14,7158 E	Avstrija: Štajersk Tauern, Maieran 10. 7. 2010, G. P.

2.2 Določanje relativne velikosti genoma s pretočno citometrijo

Pretočna citometrija je analitično orodje, ki omogoča sočasno ojačenje in zaznavo več optičnih lastnosti (fluorescenca, sipanje svetlobe) analiziranih delcev. Delci v suspenziji, obarvani s fluorescentnimi barvili, so hidrodinamično usmerjeni in pri visokih hitrostih eden za drugim potujejo skozi svetlobni žarek. Pri tem odklonijo svetlobo v različnih smereh ter oddajo fluorescentno svetlobo. Oddani svetlobni signali potujejo skozi serijo filtrov, detektorjev svetlobe, pretvornikov in pomnoževalk do računalnika, kjer so rezultati shranjeni in prikazani v obliki enoparametrskega razporeditvenega histograma FCM ali večparametrskega točkovnega diagrama. V evlucijskih, ekoloških in biosistematskih raziskavah je najpogosteje izmerjeni parameter relativna fluorescenca izoliranih jeder. Ta, ob uporabi fluorescentnih barvil, ki se vežejo na DNA, omogoča izjemno natančno oceno količine DNA (Kron in sod., 2007). Uporaba pretočne citometrije pri določanju velikosti genoma je enostavna, zanesljiva, časovno učinkovita in cenovno ugodna. To omogoča analizo velikega števila vzorcev in s tem tudi študije znotrajvrstnih in znotrajorganizemskih variacij v velikosti genoma (Doležal in sod., 2007, Kron in sod., 2007).

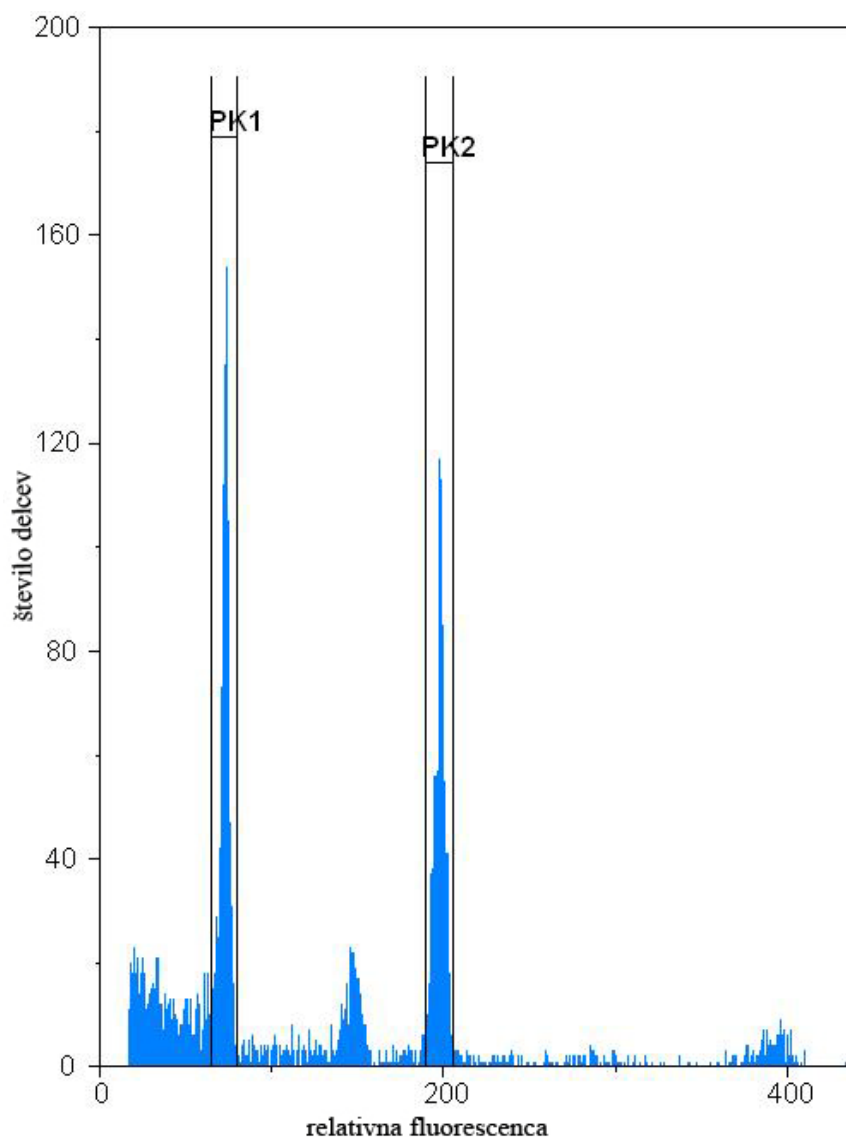
Za interpretacijo rezultatov in določitve velikosti genoma ter posledično ploidne stopnje iz podatkov o relativni fluorescenci je potrebna uporaba referenčnega standarda. Pri določanju ploidne stopnje lahko uporabljamo zunanji standard – sočasno izoliramo, obarvamo in analiziramo jedra vzorca in standarda (Doležal in sod., 2007).

Za meritev relativne vsebnosti jedrne DNA vzorcev dinarske smiljke sem uporabil pretočni citometer CyFlow Space podjetja Partec. V analizo sem vključil vseh 180 osebkov dinarske smiljke (iz vseh desetih populacij), katerih vzorce smo nabrali. Izmeril sem tudi velikost genoma drugih vrst, vključenih v filogenetsko analizo. Hkrati sem analiziral po dva osebka iz populacije. Za referenčni standard sem pri vseh meritvah uporabil *Pisum sativum* cv. Kleine Rheinländerin z velikostjo genoma $2C = 8,84$ pg (Greilhuber in Ebert, 1994).

Izmeril sem relativno velikost jedrne DNA posušenih vzorcev rastlinskega tkiva, po enostopenjskem protokolu, opisanem v Suda in Trávníček (2006):

- (1) Izolacija jeder: odrezal sem po košček posušenega tkiva dveh vzorcev (osebkov iz iste populacije) in nepoškodovanega vegetativnega svežega tkiva standarda ter jih prenesel v središče plastične petrijevke s premerom 5,5 cm. Odrezal sem toliko tkiva vzorcev in standarda, da sta bila vrhova, ki sta na histogramu FCM predstavljala število analiziranih jeder vzorcev in standarda, približno enake višine - količino tkiva sem prilagodil po prvi opravljeni meritvi. S pipeto sem dodal 0,5 ml pufra za izolacijo Otto I, ki je bil ves čas hranjen na ledu. Z ostrim rezilom britvice sem nasekljal tkivo na drobne koščke. Vsako rezilo britvice sem uporabili dvakrat; pred naslednjo uporabo sem ga temeljito obrisal s papirnato brisačo. Homogenat sem premešal s pipetiranjem in ga, skozi košček najlonske mrežice s porami velikosti 30 μm (Silk and Progress, Brněnec, Češka), prefiltriral v epruveto s prostornino 3,5 ml (*cytometer sample tube*). Preverili sem, da v filtratu ni bilo prisotnih večjih delcev. Sledila je nekajminutna (5 do 20 min) inkubacija suspenzije jeder na sobni temperaturi.
- (2) Barvanje jeder: suspenziji jeder sem s pipeto dodal 1 ml pufra za barvanje Otto II, ki vsebuje fluorescentno barvilo DAPI.
- (3) Meritev relativne fluorescence izoliranih obarvanih jeder: pretočni citometer sem pripravili za meritve, prižgal UV diodo in v programu FloMax naložil ustrezno predlogo za meritev fluorescence pri barvanju DNA z barvilom DAPI in osvetljevanju z UV svetlobo. Epruveto s suspenzijo obarvanih jeder sem vstavil v pretočni citometer in pričel z meritvijo. Hitrost toka sem prilagodili na 20 do 50 delcev na sekundo. Izmeril sem relativno fluorescenco 3000 delcev in shranil rezultat meritve – FCM histogram. Če vrhova, ki sta na FCM histogramu predstavljala število analiziranih jeder vzorcev in standarda, nista bila približno enake višine, sem v koraku 1 prilagodil razmerje v količini dodanega tkiva vzorcev in standarda.

- (4) Analiza vrhov na histogramu FCM: v programu FloMax sem na histogramu določil meje vrhov, ki sta predstavljala relativno fluorescenco jeder vzorcev in jeder standarda v fazi G_0/G_1 . Če je količnik variacije v odstotkih (CV-%) na izbranih odsekih presegal 5%, sem rezultat izločil in meritev ponovil. V obliki Wordovega poročila sem izvozil podatke o srednji vrednosti relativne fluorescence izbranih odsekov (*Mean-x*) in količniku med njima (srednja vrednost odseka z vrhom, ki predstavlja fluorescenco jeder vzorcev / srednja vrednost odseka z vrhom, ki predstavlja fluorescenco jeder standarda).



Slika 5: Primer histograma FCM z izbranimi odseki (PK1 – odsek z vrhom, ki predstavlja fluorescenco jeder vzorcev *C. dinaricum*; PK2 – odsek z vrhom, ki predstavlja fluorescenco jeder standarda *Pisum sativum* cv. Kleine Rheinländerin).

Prvo v seriji meritev sem vedno izvedel tako, da sem izoliral in analiziral samo jedra standarda. V programu FloMax sem nastavili stopnjo ojačenja signala, tako da je bil vrh, ki je predstavljal relativno fluorescenco jeder standarda (v fazi G_0/G_1), na FCM histogramu okoli vrednosti 200 (na merilni skali z razponom 1024 enot).

Sestava pufrov:

Otto I (pufer za izolacijo) je vseboval 0,1M citronske kisline monohidrata in 0,5% (v/v) Tween 20 (Sigma). Raztopino sem prefiltriral skozi filter z velikostjo por 0,22 μm .

Otto II (pufer za barvanje) je vseboval 25 ml založne raztopine + 1 ml DAPI + 50 μl 2-merkaptoetanol. [Založna raztopina: 0,4 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ prefiltrirana skozi filter z velikostjo por 0,22 μm .]

2.2.1 Statistična analiza podatkov o velikosti genoma pri vrsti *C. dinaricum* in eksperimentalno testiranje znotrajvrstnih razlik

Povprečne vrednosti in standardne odklone relativne fluorescences za posamezne populacije sem izračunal v programu Microsoft Excel 2010.

S pomočjo statističnega programa R 2.13.1 (R Development Core Team, 2011) sem izvedel hierarhično združevanje (hclust) povprečnih populacijskih vrednosti relativne velikosti genoma pri dinarski smiljki. S pomočjo istega programa sem izdelal histogram za vse izmerjene podatke, za grafično ponazoritev rezultatov meritev pa sem izdelal tudi grafikone kvantilov za izmerjene populacije.

Zaznano znotrajvrstno razliko v velikosti genoma sem testiral tudi eksperimentalno. Sočasno sem izoliral jedra dveh osebkov iz skupin, ki sta se razlikovali v izmerjeni relativni velikosti genoma. Uporabil sem osebek iz populacije 1 in osebek iz populacije 9. Tako pripravljenemu vzorcu izoliranih jeder sem izmeril relativno fluorescenco s pretočnim citometrom in analiziral vrhove na histogramu FCM.

2.3 Ekstrakcija celokupne DNA

Za ekstrakcijo celokupne DNA vzorcev dinarske smiljke sem uporabil približno 10 mg posušenega tkiva listov vsakega izmed vzorcev. Izolacijo sem izvedel z DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen). V vsako izmed 96 epruвет na zbirni plošči (*collection plate*) sem najprej dal kroglico iz volframovega karbida s premerom 3 mm. V 95 epruвет sem prenesel posušeno tkivo listov vzorcev – v vsako epruветo tkivo odvzeto od enega osebka. Eno epruветo na plošči sem uporabil kot negativno kontrolo in vanjo nisem dal vzorca. Z vzorci dinarske smiljke sem napolnil dve zbirni plošči. Homogenizacija tkiva je potekla s hitrim stresanjem (30 Hz, 2 x 1,5 min) plastičnih epruвет z vzorci in kroglicami iz volframovega karbida v zbirnih ploščah, vstavljenih v sistem TissueLyser II (Qiagen). Ekstrakcijo celokupne DNA sem izvedel po navodilih proizvajalca kita (DNeasy® Plant Handbook, Qiagen), pri čemer sem za elucijo DNA posameznega vzorca dinarske smiljke uporabil 200 µl elucijskega pufra.

Uspešnost izolacije sem preverili z elektroforezo v gelu (0,5% agaroze, 0,06 µl/ml GelRed) v pufri TBA. Na gel sem naneseł izolirano DNA 25 izbranih vzorcev in kontroli z obeh plošč (5 µl izolirane DNA vzorca oz. kontrole + 1 µl nanašalnega pufra). Za velikostni standard sem uporabil BenchTop 100bp DNA Ladder (Promega). Elektroforeza je potekala 20 min pri napetosti 80 V. Vizualizacija DNA v gelu je potekla s pomočjo naprave Molecular Imager® Gel Doc™ XR+. Koncentracijo izolirane DNA vseh vzorcev sem preveril tudi z Nanodrop-om (Thermo Scientific), ki omogoča meritve absorbance pri zelo majhnem volumnu vzorcev. Za meritev sem uporabil po 1 µl vsakega izmed vzorcev, ki sem ga naneseł na merilno površino instrumenta, zaprl ročico in v računalniškem programu zagnal meritev.

Ker so bile izmerjene koncentracije izolirane celokupne DNA vzorcev dinarske smiljke precej nizke, sem kasneje za ekstrakcijo DNA vzorcev drugih vrst iz rodu *Cerastium*, ki sem jih vključil v filogenetsko analizo, uporabil 15 mg posušenega tkiva listov, za elucijo DNA pa sem uporabil 150 µl elucijskega pufra.

2.4 Pomnoževanje, določanje in analiza izbranih zaporedij DNA

Za pomnoževanje, določanje in analizo sem izbral regijo *ndhJ-trnT* plastidne DNA (okoli 2250 baznih parov) in vmesnik ITS (*internal transcribed spacer*) jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S (okoli 850 baznih parov). Za izvedbo pomnoževanja izbranih zaporedij v verižni reakciji s polimerazo (PCR) sem uporabil termociklerje Eppendorf MasterCycler® Gradient.

2.4.1 Pomnoževanje *ndhJ-trnT* regije plastidne DNA

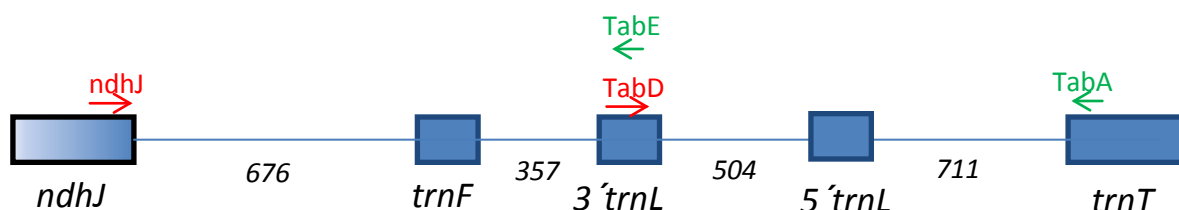
Za pomnoževanje regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA sem uporabil začetne oligonukleotide:

ndhJ: 5'— ATGCCYGAAAGTTGGATAGG —3' (Shaw in sod. 2007),

TabA: 5'— CATTACAAATGCGATGCTCT —3' (Taberlet in sod., 1991),

TabD: 5'— GGGGATAGAGGGACTTGAAC —3' (Taberlet in sod., 1991) in

TabE: 5'— GGTTCAAGTCCCTCTATCCC —3' (Taberlet in sod., 1991).



Slika 6: Shema regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA z označenimi začetnimi oligonukleotidi (ndhJ, TabA, TabD, TabE) in dolžinami posameznih odsekov (pri *Nicotiana* sp.); z rdečo barvo so označeni vodilni (*forward*), z zeleno pa povratni (*reverse*) začetni oligonukleotidi (prirejeno po: Shaw in sod., 2007 ter Shaw in sod., 2005).

Mešanica za PCR (30 μ l) je vsebovala 12 μ l REDTaq® ReadyMix PCR Reaction Mix z $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich), 0,6 μ l vodilnega (*forward*) začetnega oligonukleotida (10 μ M), 0,6 μ l povratnega (*reverse*) začetnega oligonukleotida (10 μ M), 1 μ l izolirane DNA vzorca, 0,3 μ l BSA (goveji serumski albumin; 10 mg/ml) in 15,5 μ l ddH₂O.

PCR program je bil sestavljen iz 5 min začetne denaturacije (95°C), nato 35 ciklov 30 s denaturacije (95°C), 30 s vezave začetnih oligonukleotidov (60°C) in 4 min podaljševanja (65°C). Sledilo je 10 min končnega podaljševanja (65°C).

2.4.2 Pomnoževanje vmesnika ITS jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S

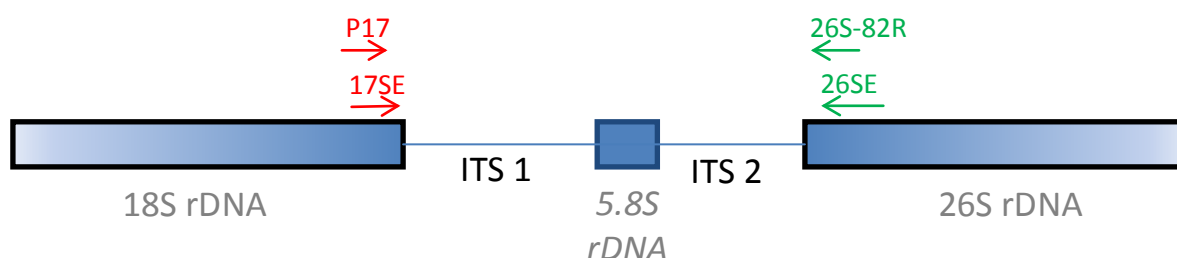
Za pomnoževanje vmesnika ITS (*internal transcribed spacer*) jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S sem uporabil začetne oligonukleotide:

17SE: 5'— ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG —3' (Sun in sod., 1994),

26SE: 5'— TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC —3' (Sun in sod., 1994),

P17: 5'— CTACCGATTGAATGGTCCGGTGAA —3' (Popp in Oxelman, 2001) in

26S-82R: 5'— TCCCGTTCGCTCGCCGTTACTA —3' (Popp in Oxelman, 2001).



Slika 7: Shema regije ITS jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S z označenimi uporabljenimi začetnimi oligonukleotidi (P17, 17SE, 26SE in 26S-82R); z rdečo barvo so označeni vodilni (*forward*), z zeleno pa povratni (*reverse*) začetni oligonukleotidi (prirejeno po: Baldwin in sod., 1995).

Mešanica za PCR (16,5 μ l) je vsebovala 6 μ l REDTaq® ReadyMix PCR Reaction Mix z $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich), 0,4 μ l vodilnega (*forward*) začetnega oligonukleotida (10 μ M), 0,4 μ l povratnega (*reverse*) začetnega oligonukleotida (10 μ M), 1 μ l izolirane DNA vzorca, 0,7 μ l BSA (10 mg/ml) in 8 μ l ddH₂O.

PCR program je bil sestavljen iz 4 min začetne denaturacije (94°C), nato 35 ciklov 1 min denaturacije (95°C), 1 min vezave začetnih oligonukleotidov (56°C) in 70 s podaljševanja (72°C). Sledilo je 10 min končnega podaljševanja (72°C).

2.4.3 Preverjanje uspešnosti pomnoževanja

Uspešnost pomnoževanja sem preverili z elektroforezo v gelu (0,5% agaroze, 0,06 μ l/ml GelRed) v pufru TBA. Na gel sem nanese 4 μ l produkta PCR. Za velikostni standard sem uporabil BenchTop 100bp DNA Ladder (Promega). Elektroforeza je potekala 20 min pri

napetosti 80 V. Vizualizacija DNA v gelu je potekla s pomočjo naprave Molecular Imager® Gel Doc™ XR+.

2.4.4 Čiščenje produktov pomnoževanja

Za čiščenje produktov pomnoževanja sem uporabil encima EXO (*Exonuklease I*) in SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*), proizvajalca Fermentas. Produktom PCR sem dodal 0,5 µl EXO, 1µl SAP in 1,5 µl ddH₂O. Inkubacija mešanice je potekala 45 minut na 37 °C, sledila je inaktivacija na 85 °C, 15 minut.

2.4.5 Reakcije za določanje zaporedja

Mešanica za reakcijo (10 µl) je vsebovala 1 µl Ready reaction mix (BigDye), 1µl začetnega oligonukleotida za določanje nukleotidnega zaporedja (3.2 pmol/µl), 3µl ddH₂O in 5 µl PCR produkta, očiščenega z EXO in SAP.

PCR program je bil sestavljen iz 1 min začetne denaturacije (96°C), ki ji je sledilo 25 ciklov 10 s denaturacije (96°C), 5 s vezave začetnih oligonukleotidov (50°C) in 4 min podaljševanja (60°C).

Pri izvedbi reakcij za določanje zaporedja za regijo *ndhJ-trnT* plastidne DNA sem uporabil štiri začetne oligonukleotide za določanje nukleotidnega zaporedja: *ndhJ*, *TabA*, *TabD*, *TabE* (Slika 5).

Pri izvedbi reakcij za določanje zaporedja za vmesnik ITS jedrnega ribosomalnega cistrona sem uporabil enaka začetna oligonukleotida za določanje zaporedja, ki sem ju predhodno uporabil tudi za pomnoževanje vmesnika pri določenem vzorcu (17SE, 26SE, P17, 26S-82R v različnih parnih kombinacijah).

V vsako mešanico za reakcijo za določanje zaporedja sem dodal samo en začetni nukleotid za določanje nukleotidnega zaporedja. Cikli denaturacije, vezave začetnih nukleotidov in

elongacije tako rezultirajo v linearni pomnožitvi DNA različnih dolžin, s fluorescentno označenim nukleotidom na 3' koncu verige.

2.4.6 Čiščenje produktov reakcij za določanje zaporedja

Neuporabljene fluorescentno označene dideoksinukleotid trifosfate in nezaželene nizko molekularne snovi (soli) sem od produktov reakcij za določanje zaporedja odstranil s filtriranjem skozi Sephadex® G-50 fine na Millipore MultiScreen® 96-Well Filtrations Plates.

Pakiranje Sephadex® G-50 fine: na filtrirno ploščo sem v vsako luknjico nanese 200 µl Sephadex® G-50 fine, filtrirno ploščo postavil na zbirno ploščo in ju dal v centrifugo na 600 g za 1 min. Ves postopek sem ponovil še dvakrat, zadnji korak centrifugiranja je trajal 5 min.

Čiščenje produktov reakcij za določanje zaporedja: Filtrirno ploščo s pripravljenim Sephadex® G-50 fine sem postavil na novo zbirno ploščo in na sredino vsake luknjice odpipetiral 15 µl ddH₂O in produkt reakcije za določanje zaporedja. Sledilo je centrifugiranje plošč na 750 g, 5 min. Očiščene produkte reakcij za določanje zaporedja (filtrat) sem shranil na -20°C.

Očiščene produkte reakcij za določanje zaporedja sem v izolirani škatli s hladilnim sredstvom poslal na Botanični inštitut Univerze na Dunaju, kjer je potekalo določanje zaporedja pomnoženih delov DNA vzorcev na napravi za določanje zaporedja (kapilarnem sekvenatorju ABI 3100, Applied Biosystems).

2.4.7 Sestavljanje sosesk, pregledovanje in urejanje zaporedij, poravnava zaporedij

Soseske (*contigs*; daljša zaporedja DNA, pridobljena s prekrivanjem krajših fragmentov DNA, ki so rezultat določanja zaporedja DNA z uporabo več različnih začetnih oligonukleotidov) sem sestavil s pomočjo programa Geneious 5. 5. 6 (Drummond s sod.,

2010). Ob tem sem natančno pregledal kromatograme in morebitne napake v zapisu nukleotidov v zaporedju ročno popravil.

Vmesnik ITS je v genomu prisoten v veliko kopijah, zato se lahko pri določanju zaporedja te regije v kromatogramu pojavijo polimorfizmi (Alvarez in Wendel, 2003). Za kodiranje prisotnih polimorfizmov sem uporabil veljavne NC-IUPAC znake. Polimorfizem sem kodiral v določenih primerih, ko se je na istem mestu v kromatogramu pojavil več kot en vrh. Ko je bila dostopna informacija iz obeh verig (vodilne in povratne), sem kodiral polimorfizem, če je šibkejši signal v obeh kromatogramih dosegel vsaj tretjino višine močnejšega signala. V nekaterih primerih informacija iz obeh verig ni bila dostopna; v takem primeru sem polimorfizem kodiral, če je šibkejši signal dosegel vsaj polovico višine močnejšega.

V istem programu sem tudi poravnal zaporedja. Poravnave sem pregledal in na določenih mestih ročno popravil. Pri nekaterih osebkih nekatera mesta v zaporedju niso bila uspešno določena; na taka mesta sem vstavil znak vprašaj (?).

2.4.8 Filogenetske analize z metodo največje varčnosti

Filogenetski analizi zaporedij regij *ndhJ-trnT* plastidne DNA in ITS jedrne DNA, v katero so bili vključeni osebki iz populacij, označenih v preglednicah 1 in 2, sem izvedel po metodi največje varčnosti s programom PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). S pomočjo istega programa sem dobljenim filogenetskim drevesom določil statistično podporo z metodo zankanja (*bootstrapping*).

Filogenetska drevesa regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA, ki so ustrezala kriteriju največje varčnosti, je program poiskal hevristično s 1000 ponovitvami naključnega dodajanja zaporedij (*addseq=random*), algoritmom *TBR swapping*, optimizacijo *DELTRAN*, vključeno možnostjo *MULTREES* in največ 1000 shranjenimi drevesi na ponovitev (*nchuck=1000*).

Filogenetska drevesa za vmesnik ITS 18S-5.8S-26S jedrnega ribosomalnega cistrona, ki so ustrezala kriteriju največje varčnosti, je program poiskal hevrstično s 1000 ponovitvami naključnega dodajanja zaporedij (addseq=random), algoritmom *TBR swapping*, optimizacijo *DELTRAN* in vključeno možnostjo *MULTREES*.

Za koreninjenje filogenetskih dreves sem kot zunanjik (*outgroup*) v obeh primerih izbral zaporedje vrste *Cerastium cerastoides*.

V obeh primerih je zankanje (*bootstrapping*) potekalo hevrstično, s 1000 ponovitvami, algoritmom *TBR swapping*, izključeno možnostjo *MULTREES* in naključnim dodajanjem zaporedij s petimi ponovitvami.

2.4.9 Diagram NeighborNet na podlagi regije ITS 18S-5.8S-26S jedrnega ribosomalnega cistrona

Za ponazoritev filogenetskih odnosov za regijo ITS, pri kateri so veliko variabilnih znakov predstavljali polimorfizmi, sem s pomočjo programa SplitsTree 4.12.3 (Huson in Bryant, 2006) izdelal tudi diagram NeighborNet. Metoda Neighbor-Net z razširitvijo algoritma združevanja sosedov omogoča izgradnjo filogenetskega omrežja s pomočjo izračuna krožnega nabora nekompatibilnih *splitov* iz matrike razdalj. Statistično podporo omrežja sem v istem programu določil z metodo zankanja (*bootstrapping*) z 2000 ponovitvami. Predstavitev v obliki omrežja omogoča prikaz več filogenetskih hipotez hkrati in zaznavo zapletenih evolucijskih procesov, kot so rekombinacija, lateralni prenos genov in križanje (Bryant in Moulton, 2004).

2.4.10 Statistično omrežje največje varčnosti haplotipov plastidne DNA (*ndhJ-trnT*) za osebke dinarske smiljke

Statistično omrežje haplotipov regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA 3-6 osebkov iz vsake od vzorčenih populacij dinarske smiljke (preglednica 4) sem izdelal po metodi največje varčnosti s pomočjo programa TCS 1.21 (Clement s sod., 2000); pri tem sem izbral možnost, da vrzeli predstavljajo peti znak. Pred analizo sem vse insercije in delecije daljše

od enega baznega para prekodiral v en bazni par dolge insercije oz. delecije, iz poravnave pa odstranil dele zaporedij, ki niso bili določeni pri vseh osebkih.

Za dodatno razjasnitev odnosov med haplotipi in interpretacijo opaženih povezav sem v analizo poleg zaporedij osebkov dinarske smiljke dodal tudi zaporedja najbolj sorodnih vrst (glede na filogenetsko analizo plastidne DNA): *C. hekuravense*, *C. carinthiacum*, *C. uniflorum*. S tem sem določil korenino za omrežje haplotipov dinarske smiljke.

2.5 Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP)

AFLP je tehnika genotipizacije, ki temelji na selektivni PCR pomnožitvi fragmentov, ki nastanejo s popolno restrikcijo DNA. Vključuje tri korake: (1) restrikcijo DNA in vezavo oligonukleotidnih adapterjev, (2) selektivno pomnožitev nastalih fragmentov in (3) analizo pomnoženih fragmentov na gelu. Metoda omogoča specifično sočasno pomnožitev velikega števila fragmentov, nastalih z restrikcijo DNA, brez predhodnega poznavanja zaporedja DNA (Vos in sod., 1995).

Prva dva koraka sem izvedel s 166 vzorci vrste *Cerastium dinaricum* iz 10 populacij, 19 vzorci *C. hekuravense* iz ene populacije, 3 vzorci *C. carinthiacum* iz 3 populacij in dvema slepima vzorcema (voda) za negativno kontrolo. V celoten nabor je bilo vključenih 9 podvojenih vzorcev. Pred analizo pomnoženih fragmentov na gelu sem izključili slepa vzorca in vzorce, katerih profili AFLP niso bili dovolj kakovostni za analizo. Število vzorcev dinarske smiljke za vsako populacijo, ki so bili na koncu vključeni v filogeografske analize profilov AFLP, je navedeno v preglednici 4 v poglavju Rezultati.

Pri izvedbi AFLP sem sledil prilagojenemu protokolu opisanem v Vos in sod. (1995).

2.5.1 Restrikcija izolirane celokupne DNA vzorcev in ligacija adapterjev (Res/Lig)

Izolirana celokupna DNA vzorcev je bila v tem koraku razgrajena z dvema restrikcijskima endonukleazama: *EcoRI* in *MseI*. Na mesta restrikcije pa so se vezali dvoverižni adapterji *EcoRI* in *MseI*.

Mešanica za reakcijo (6 μ l)

1,2 μ l pufru DNA ligaze T4	1,0 μ l 5 μ M adapterjev EcoRI
1,0 μ l adapterjev MseI (50 μ M)	0,0625 μ l EcoRI (80 U/ μ l)
0,02 μ l MseI (50 U/ μ l)	0,7175 μ l ddH ₂ O
0,2 μ l U DNA ligaze T4 (3 U/ μ l)	0,6 μ l BSA (1 mg/ml)
1,2 μ l 0,5 M NaCl	

Preden sem adapterje *EcoRI* in *MseI* dodal mešanici za reakcijo, je potekla njihova inkubacija: 5 min na 95 °C ter 30 min na 37 °C.

6 μ l mešanice za reakcijo sem dodal μ l izolirane celokupne DNA vzorca. Inkubacija mešanice je potekala 3 ure pri 37 °C in nato 2 uri pri 17 °C (termocikler Eppendorf MasterCycler® Gradient).

Uspešnost restrikcije sem preveril z elektroforezo v gelu (1,5% agaroze, 0,06 μ l/ml GelRed) v pufru TBA. Elektroforeza je potekala 20 min pri napetosti 80 V. Vizualizacija DNA v gelu je potekla s pomočjo naprave Molecular Imager® Gel Doc™ XR+.

Produkte restrikcije in ligacije sem razredčil z destilirano vodo (10x).

2.5.2 Preselektivna pomnožitev fragmentov (Presel)

Nukleotidno zaporedje adapterjev in mesta restrikcije predstavljajo vezavno mesto za vezavo preselektivnih začetnih oligonukleotidov. Uporabil sem začetne oligonukleotide (preselektivna začetna oligonukleotida *EcoRI*-A in *MseI*-C) z enim selektivnim nukleotidom. V tem koraku je tako prišlo do približno 16-kratnega zmanjšanja števila različnih fragmentov.

Mešanica za reakcijo (8 μ l):

5,86 μ l ddH₂O

1,14 μ l pufra 10x RedTaq

0,2 μ l SigmaRedTaq (1 U/ μ l)

0,22 μ l dNTP-jev (10 mM)

0,58 μ l preselektivnih oligonukleotidov (5 μ M *EcoRI* + 5 μ M *MseI*)

8 μ l mešanice za reakcijo sem dodal 2 μ l razredčenega produkta Res/Lig. Za izvedbo PCR sem uporabil termocikler Eppendorf MasterCycler® Gradient. PCR program je bil sestavljen iz 2 min začetne denaturacije (72°C), nato 25 ciklov 1 s denaturacije (94°C), 30 s vezave začetnih oligonukleotidov (56°C) in 2 min podaljševanja (72°C). Sledilo je 30 min končnega podaljševanja (60°C).

Uspešnost preselektivne pomnožitve sem preveril z elektroforezo v gelu (1,5% agaroze, 0,06 μ l/ml GelRed) v pufri TBA. Elektroforeza je potekala 20 min pri napetosti 80 V. Vizualizacija DNA v gelu je potekla s pomočjo naprave Molecular Imager® Gel Doc™ XR+.

Produkte preselektivne pomnožitve sem razredčil z destilirano vodo (10x).

2.5.3 Selektivna pomnožitev fragmentov (Sel)

Pri selektivni pomnožitvi fragmentov pride do povečanja specifičnosti pomnoženih fragmentov (okoli 256x). Uporabil sem začetne oligonukleotide z enakim prvim selektivnim nukleotidom kot pri preselektivni pomnožitvi ter dvema dodatnima selektivnima nukleotidoma. Preizkusil sem 12 kombinacij selektivnih začetnih nukleotidov in izbral tri, pri katerih sem dobil najbolj jasne in informativne profile AFLP:

EcoRI(6-Fam)-ATC/*MseI*-CTG,

EcoRI(VIC)-AAG/*MseI*-CTG in

EcoRI(NED)-AAC/*MseI*-CAT.

Mešanica za reakcijo (8 µl) – za vsak par selektivnih začetnih nukleotidov posebej:

5,50 µl ddH₂O

1,0 µl 10x pufra RedTaq

0,2 µl SigmaRedTaq (1 U/ul)

0,22 µl dNTPs (10 mM)

0,54 µl selektivnega začetnega oligonuklotida MseI (5 µM)

0,54 µl selektivnega začetnega oligonuklotida EcoRI (1 µM)

8 µl mešanice za reakcijo sem dodal 1 µl razredčenega produkta Presel. Uporabili sem naslednje PCR pogoje (termocikler Eppendorf MasterCycler® Gradient, R = 1,8 °/s):

<i>denaturacija</i>	<i>vezava primerjev</i>	<i>elongacija</i>	<i>število ciklov</i>
94°C (2 min)	65°C (30 s)	72°C (2 min)	1
94°C (1 s)	64°C (30 s)	72°C (2 min)	1
94°C (1 s)	63°C (30 s)	72°C (2 min)	1
94°C (1 s)	62°C (30 s)	72°C (2 min)	1
94°C (1 s)	61°C (30 s)	72°C (2 min)	1
94°C (1 s)	60°C (30 s)	72°C (2 min)	1
94°C (1 s)	59°C (30 s)	72°C (2 min)	1
94°C (1 s)	58°C (30 s)	72°C (2 min)	1
94°C (1 s)	57°C (30 s)	72°C (2 min)	1
94°C (1 s)	56°C (30 s)	72°C (2 min)	23
60°C (30 min)	--	--	1
4°C ∞	--	--	--

2.5.4 Čiščenje produktov selektivne pomnožitve fragmentov

Pakiranje Sephadex® G-50 fine: na filtrirno ploščo sem v vsako luknjico nanese 200 µl Sephadex® G-50 fine, filtrirno ploščo postavil na zbirno ploščo in ju dal v centrifugo na 600 g za 1 min. Ves postopek sem ponovili še dvakrat, zadnji korak centrifugiranja je trajal 5 min.

Čiščenje produktov selektivne pomnožitve fragmentov: filtrirno ploščo s pripravljenim Sephadex® G-50 fine sem postavil na novo zbirno ploščo in na sredino vsake luknjice odpipetiral produkt selektivne pomnožitve fragmentov. Sledilo je centrifugiranje plošč na 600 g, 5 min. Očiščene produkte selektivne pomnožitve fragmentov (filtrat) sem shranil na -20 °C.

Očiščene produkte selektivne pomnožitve fragmentov sem v izolirani škatli s hladilnim sredstvom poslal na Botanični inštitut Univerze na Dunaju. Tam je bilo 1,2 µl produkta dodano 10 µl formamida in 0,1 µl GeneScan ROX. Elektroforeza vzorcev je potekala na avtomatskem kapilarnem sekvenatorju ABI 3130x (Applied Biosystems).

2.5.5 Analiza pomnoženih fragmentov na gelu

Pridobljeni profili so bili poravnani z internim velikostnim standardom s pomočjo programa ABI Prism GENESCAN analysis software 3.7.1 (Applied Biosystems). GeneScan datoteke sem uvozil v program GENOGRAPHER 1.6.0 (Montana State University) s pomočjo katerega sem »ročno« določil prisotnost ali odsotnost posameznih fragmentov pri vzorcih. Vsak fragment sem pregledal na navideznem gelu in s pomočjo funkcije *thumbnail*, ki omogoča primerjavo signala izbranega fragmenta v vseh vzorcih. Rezultat predstavlja matrika prisotnosti (1) / odsotnosti (0) vsakega od fragmentov pri vseh vzorcih.

Za primerjavo in ovrednotenje objektivnosti »ročnega« določanja prisotnosti fragmentov na navideznem gelu sem izvedel tudi računalniško samodejno določanje prisotnosti fragmentov. Za zaznavo in ovrednotenje velikosti fragmentov sem uporabil program PeakScanner (Applied Biosystems) z naslednjimi nastavitvami: size standard = GS500(-250), vklopljeno funkcijo *light smoothing* in privzetimi parametri metode analize. Za določanje prisotnosti/odsotnosti fragmentov sem uporabil paket RawGeno 2.0-1 (Arrigo in sod., 2009) za program R x64 2.15.0 (R Development Core Team, 2011), s privzetimi nastavitvami.

2.5.6 AFLP – izračun indeksa napake (*error rate*)

Pri uporabi molekularnih metod za genotipiziranje osebkov se pogosto pojavljajo napake. Pri uporabi AFLP je najpogostejši vir napak razlika v jakosti vrhov na kromatogramu, ki predstavljajo enake alele pri različnih osebkih, seveda pa se lahko pojavlja tudi vpliv človeške napake v postopku. Odkrivanje in vrednotenje obsega takih napak v začetnih

korakih analize pridobljenih podatkov je bistveno za kasnejšo verodostojnost zaključkov, izpeljanih iz teh podatkov (Bonin in sod., 2004).

V genotipizacijo AFLP sem vključili 9 podvojenih osebkov in njihove profile na navideznem gelu analiziral kot vse ostale vzorce. Profile AFLP parov podvojenih vzorcev sem nato primerjal in izračunal stopnjo napake (Bonin in sod., 2004) kot količnik med zaznanimi razlikami (1/0 ali 0/1) in ujemanji (1/1) v profilih podvojenih osebkov.

2.5.7 AFLP – statistična analiza podatkov

Pred začetkom natančnejše analize sem s pomočjo programa SplitsTree 4.12.3 (Huson in Bryant, 2006) izdelal diagram NeighborNet, v katerega sem vključil vse osebke, katerih profile AFLP sem pridobil (*C. dinaricum*, *C. hekuravense* in *C. carinthiacum*). Statistično podporo omrežja sem v istem programu določil z metodo zankanja (bootstrapping) z 2000 ponovitvami. Rezultati te analize, analize velikosti genoma in filogenetske analize regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA so pokazali, da sta vrsti *C. carinthiacum* in *C. hekuravense* filogenetsko ločeni od *C. dinaricum*, zato profilov AFLP prvih dveh vrst nisem vključil v nadaljnjo filogeografsko analizo.

Iz nadaljnje analize sem izključil tudi podvojene osebke, ki so služili za izračun indeksa napake. Iz matrike sem odstranil tudi 5 fragmentov, katerih identiteta (1/0) je bila pri pregledovanju matrike (po izračuni indeksa napake in primerjavi podvojenih osebkov) dvomljiva, in fragmente, ki so bili prisotni samo pri po enem osebku.

Matriko prisotnosti/odsotnosti fragmentov AFLP sem s pomočjo statističnega programa R 2.13.1 (R Development Core Team, 2011), paket AFLPdat (Ehrich, 2006) formatiral na način, da je bila primerna za delo s programi, ki omogočajo nadaljnjo analizo pridobljenih podatkov.

2.5.7.1 Nei-jev koeficient genetske raznolikosti - D

Nei-jev koeficient genetske raznolikosti sem izračunal za 11 naključno izbranih osebkov iz vsake od populacij, razen populacije 2, ki sem jo zaradi majhnega števila vzorčenih osebkov izključil iz primerjave. Izračunal sem ga s pomočjo statističnega programa R 2.13.1 (R Development Core Team, 2011), paket AFLPdat (Ehrich, 2006), po formuli

$$D = \left(\frac{n}{n-1} \right) \left[1 - (freq_1^2 + freq_0^2) \right] \quad \dots (1)$$

za vsak označevalec. Število osebkov v populaciji predstavlja n , $freq_1$ in $freq_0$ pa predstavljata število prisotnosti oziroma odsotnosti označevalca v populaciji. Končni rezultat je povprečje za vse označevalce v populaciji (Winkler in sod., 2010).

2.5.7.2 Indeks redkosti alelov - R

Za kvantifikacijo redkih označevalcev v populacijah sem uporabil indeks redkosti alelov (R) ali *frequency-down-weighted* vrednosti označevalcev: indeks, ki omogoča ovrednotenje redkih označevalcev v populaciji brez postavitve arbitrarnega frekvenčnega praga (Schönswetter in Tribsch, 2005). V analizo sem vključil 11 naključno izbranih osebkov iz vsake od populacij, razen populacije 2, ki sem jo zaradi majhnega števila vzorčenih osebkov izključil iz primerjave. Indeks sem izračunal s pomočjo statističnega programa R 2.13.1 (R Development Core Team, 2011), paket AFLPdat (Ehrich, 2006), za vsak osebek po formuli

$$R_x = \frac{\sum_{i=1}^n s_{ix}}{\sum_{j=1}^k s_{ij}} \quad \dots (2)$$

Število označevalcev predstavlja n , s_i je stanje i -tega označevalca za osebek x (1 ali 0), k pa število vseh osebkov v vseh populacijah. Števec predstavlja število pojavov i -tega označevalca pri vseh osebkih v vseh populacijah. Končni rezultat (R_{pop}) je povprečje vrednosti R_a vseh 11 osebkov vsake od populacij (Winkler in sod., 2010).

2.5.7.3 Analiza molekularne variance (AMOVA)

S pomočjo analize molekularne variance (AMOVA) lahko na podlagi informacije o prisotnosti alelov in njihovih frekvenc pri posameznih haplotipih ocenimo genetsko strukturo preučevanih podatkov. Informacija o razlikah v vsebnosti alelov med haplotipi je pretvorjena v matriko evklidskih kvadratnih razdalj. Pomembnost (signifikantnost) komponent kovariance, ki jih lahko pripišemo različnim ravnam genetske strukture (npr.: med osebki znotraj populacij, med populacijami, med skupinami populacij) je nato testirana z neparametričnimi permutacijskimi postopki (Excoffier in sod., 1992).

Analize molekularne variance sem izračunal s pomočjo programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier in sod., 2005). Izbral sem možnost *Locus by locus AMOVA*, pri kateri program izvede ločene analize za vsak lokus, rezultat pa je podan kot povprečje za vse lokuse.

Analizo molekularne variance sem najprej izvedel brez določitve posebnih skupin (vse populacije predstavljajo eno skupino). Rezultat je razdelitev variacije na deleža variacije, ki ju lahko pripišemo variaciji med populacijami in variaciji znotraj populacij.

Glede na rezultate drugih analiz, sem nato določil dve skupini populacij – severozahodno (populacije 1–4) in jugovzhodno (populacije 5–10) in ponovno izvedel analizo molekularne variance. Rezultat je razdelitev variacije na deleže variacije, ki jih lahko pripišemo variaciji med skupinama, variaciji med populacijami znotraj skupin in variaciji med osebki znotraj populacij.

2.5.7.4 Diagram NeighborNet

Na podlagi matrike prisotnosti (1) / odsotnosti (0) vsakega od AFLP fragmentov pri vseh vzorcih sem s pomočjo programa TreeCon 1.3b (Van de Peer in De Watcher, 1997) izračunal Nei-Li razdalje (Nei in Li, 1979) med osebki po formuli:

$$GD_{xy} = 1 - \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y} \quad \dots (3)$$

N_{xy} predstavlja število fragmentov, prisotnih pri obeh osebkih, N_x število vseh fragmentov prisotnih pri osebku x in N_y število vseh fragmentov prisotnih pri osebku y (Van de Peer in De Watcher, 1997).

V istem programu sem na podlagi izračunanih razdalj izdelal tudi drevo z analizo združevanja sosedov (*neighbour-joining*). Statistično podporo drevesa sem določil z metodo zankanja (bootstrapping) z 2000 ponovitvami.

S programom SplitsTree 4.12.3 (Huson in Bryant, 2006) sem na podlagi Nei-Li razdalj iz prejšnje analize izdelal NeighborNet diagram. Na diagram sem vnesel stopnje zaupanja iz zankanja analize združevanja sosedov opisane zgoraj.

2.5.7.5 Bayesovo združevanje profilov AFLP s programom STRUCTURE

STRUCTURE je program, ki z Bayesovim pristopom omogoča določitev populacijske strukture na osnovi multilokusnih podatkov in omogoča uporabo več modelov z različnimi predpostavkami. Za razvrščanje osebkov v populacije uporablja algoritem Monte Carlo Markovske verige (MCMC). Najenostavnejši, model *no-admixture* predpostavlja, da ves genetski material določenega osebka izvira iz iste populacije. V okviru modela *admixture* pa program predvideva, da lahko genetski material vzorčenih osebkov izvira iz ene ali več od skupno K populacij (Pritchard in sod., 2000, Falush in sod., 2007).

Za analize sem uporabil različico programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard in sod., 2000, Falush in sod., 2007). Uporabil sem model *admixture* z nekoreliranimi alelnimi frekvencami in recesivnimi aleli. Za vsak K (število določenih skupin: 1-9) je bilo izvedenih 10 replikacijskih ponovitev z 10^5 začetnimi iteracijami *burn-in* in nato 10^6 dodatnimi iteracijami MCMC. Analize so potekale na strežniku Bioportala Univerze v Oslu (<http://www.bioportal.uio.no/>). Za primerjavo sem izvedel analizo tudi z modelom "no-admixture" z enakimi parametri MCMC.

Podobnost med rezultati posameznih replikacijskih ponovitev za isti K sem izračunal po postopku Nordborg-a s sod. (2005) s pomočjo paketa Structure-sum-2009 (Ehrich, 2006)

za program R. S pomočjo istega paketa sem določil tudi optimalno število skupin kot vrednost K, pri kateri se krivulja naraščanja verjetnosti prične izravnovati, pri tem pa so podobnosti replikacijskih ponovitev za ta K višje od 0,85 (Rosenberg in sod., 2002) in nobena od skupin ni prazna.

Za vsako od skupin določenih pri optimalnem K sem v nadaljevanju izvedel ločeno analizo STRUCTURE na enak način, kot je opisano zgoraj. Pred začetkom analize sem iz novih (ločenih) matrik odstranil fragmente, ki niso bili prisotni pri nobenem osebk, in tiste, ki so bili prisotni samo pri enem osebk.

2.5.7.6 Populacijski grafi

Strukturo genetske kovariance med vzorčenimi populacijami dinarske smiljke sem modeliral tudi v okviru teorije grafov (Dyer in Nason, 2004) z uporabo spletne aplikacije Population Graphs (dostopna na <http://dyerlab.bio.vcu.edu/software>). Kadar obstaja med dvema populacijama (po odstranitvi kovariance, ki jo ima vsaka od populacij z vsemi preostalimi vzorčenimi populacijami) signifikantna genetska kovarianca, sta ti povezani s povezavo. Omrežje populacij, povezanih s povezavo, tvori populacijski graf. Distribucija najkrajših poti skozi tako omrežje ustvarja pričakovanje sorazmernih razdalj med populacijami. Če je genetska kovarianca prostorsko strukturirana, so fizične (geografske) razdalje sorazmerne genetskim. V nasprotnem primeru so populacije bližje skupaj ali bolj oddaljene druga od druge, kot bi pričakovali glede na genetske razdalje. Populacije, ki so bližje skupaj, kot bi pričakovali glede na genetsko razdaljo, so v omrežju povezane s stisnjenimi povezavami (*compressed edges*), ki lahko nakazujejo topološke, zgodovinske ali ekološke razloge vikariance. Populacije, ki so bolj oddaljene druga od druge, kot bi pričakovali glede na genetsko razdaljo, pa so povezane z razširjenimi povezavami (*extended edges*), ki lahko kažejo na primer disperzijo na dolge razdalje (Garrick in sod., 2009). Identiteto povezav (normalna, stisnjena, razširjena) sem določil s pomočjo programa Graph programskega paketa Genetic Studio (Dyer, 2009) z uporabo analize *Isolation By Graph Distance (IBGD)* in izvozom topologije grafa v program GoogleEarth (Google Inc., 2012).

Stabilnost povezav med populacijami sem preveril z metodo zankanja (*bootstrapping*) z 200 ponovitvami. S pomočjo programa seqboot programskega paketa PHYLIP (Felsenstein, 1989) sem izdelal 200 psevdoreplikativ izvirne matrike. Vsakega izmed teh sem nato analiziral s spletno aplikacijo Population Graphs na enak način kot izvirno matriko. Izračunal sem odstotek replikativ, pri katerih se pojavi določena povezava. Ta vrednost predstavlja statistično podporo povezave in nakazuje na njeno stabilnost oz. nestabilnost.

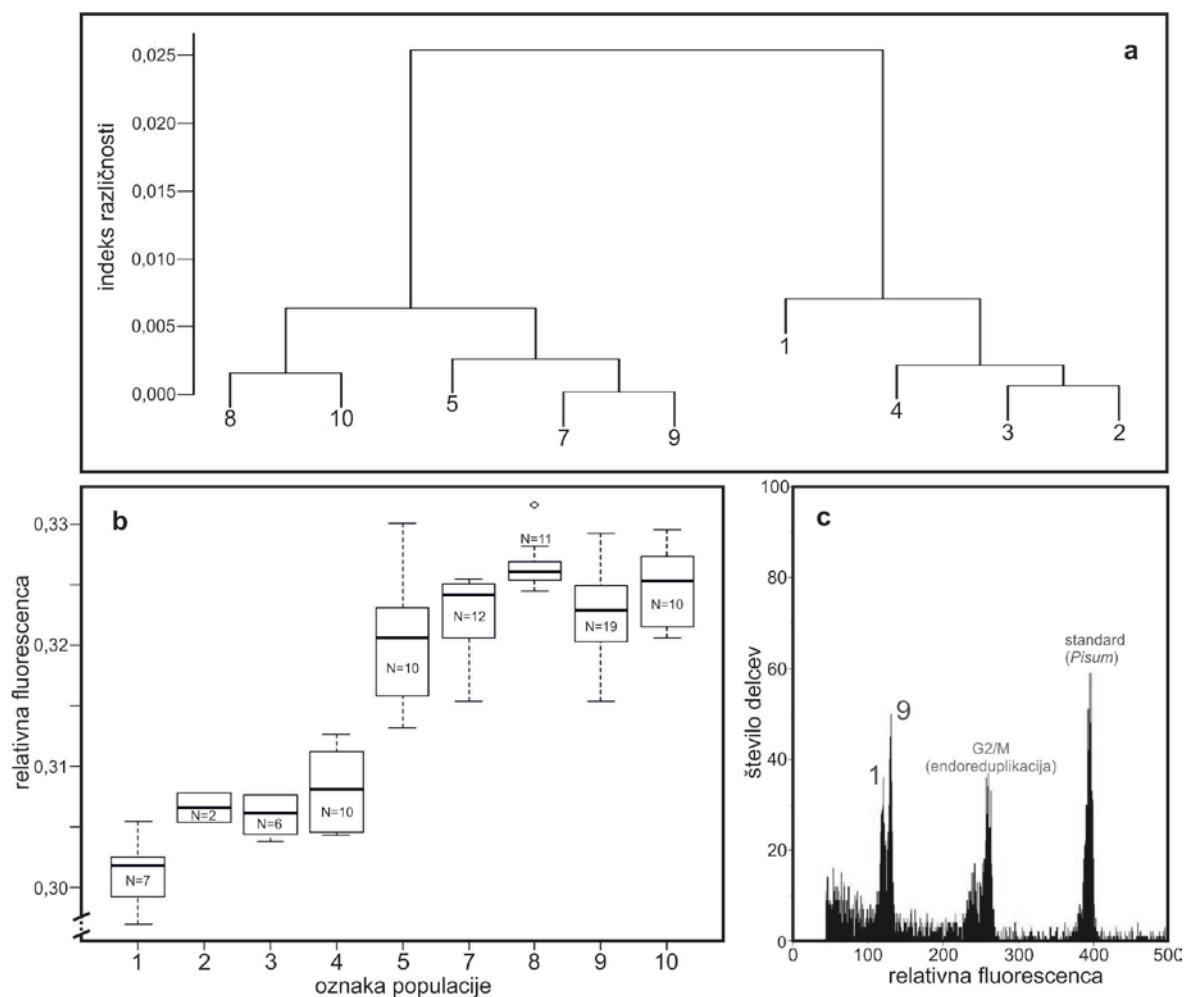
2.5.7.7 Genetski test dodelitve s programom AFLPOP

Za določitev najverjetnejše izvorne populacije za osebke iz populacije 7 sem izvedel test dodelitve (*assignment test*) s pomočjo programa AFLPOP 1.1 (Duchesne in Bernatchez, 2002). Vse ostale populacije dinarske smiljke sem vključil v analizo kot možne izvorne populacije. Za analizo sem uporabil privzete parametre programa. Alokacijo sem testiral z tremi stopnjami najmanjše log-verjetnostne razlike (0 – alokacija osebkov v populacijo X poteče takoj, ko je verjetnost alokacije v to populacijo večja, kot verjetnost alokacije v katerokoli drugo populacijo; 1 - alokacija osebkov v populacijo X poteče, ko je verjetnost alokacije v to populacijo najmanj 10x večja, kot verjetnost alokacije v katerokoli drugo populacijo in 2 - alokacija osebkov v populacijo X poteče, ko je verjetnost alokacije v to populacijo najmanj 100x večja, kot verjetnost alokacije v katerokoli drugo populacijo) in izbral možnost pri kateri program frekvenčne vrednosti, ki so enake 0 zamenja za $1/(\text{velikost vzorca} + 1)$.

3 REZULTATI

3.1 Relativna velikost genoma

Meritve relativne velikosti genoma so pokazale, da imajo vsi osebki iz vseh vzorčenih populacij dinarske smiljke enako ploidno stopnjo DNA. Pri meritvah osebkov iz populacije 6, kvaliteta pridobljenih histogramov FCM ni bila zadostna za natančno določitev relativne velikosti genoma, vidno pa je bilo, da imajo osebki iz te populacije enako ploidno stopnjo DNA kot ostali izmerjeni osebki dinarske smiljke.



Slika 8: Znotrajvrstna variabilnost relativne velikosti genoma pri dinarski smiljki. *a* – dendrogram, pridobljen s hierarhičnim združevanjem povprečnih populacijskih vrednosti relativne velikosti genoma pri dinarski smiljki; *b* – grafikoni kvantilov relativnih velikosti genoma za posamezne populacije, prekinjen odsek osi ponazarja, da se merilna skala ne začne pri 0; *c* – histogram FCM hkratne meritve relativne velikosti genoma osebkov iz populacij 1 in 9.

Rezultati meritev (preglednica 3) kažejo na znatne znotrajvrstne razlike v velikosti genoma med populacijami dinarske smiljke. Podatki meritev relativne velikosti genoma dinarske smiljke imajo bimodalno razporeditev (histogram vseh podatkov, ni prikazan). V dendrogramu, pridobljenem s hierarhičnim združevanjem povprečnih populacijskih vrednosti relativne velikosti genoma sta vidni dve večji skupini (Slika 8). Prva (severozahodna) združuje populacije 1–4, druga (jugovzhodna) pa populacije 5, 7, 8, 9, 10. Skupini ustrezata različnima modusoma, opaženima na histogramu. Meritev relativne velikosti sočasno izoliranih jeder osebkov iz populacij 1 in 9 potrjuje razlike opažene pri statistični analizi. Na histogramu FCM sta razločno vidna dva ločena vrhova, ki ustrezata različni fluorescenci jeder vzorcev iz dveh skupin (Slika 8); ta se je med vzorcema razlikovala za 8,3%. Izračunana razlika med povprečnima vrednostima relativne velikosti genoma obeh skupin je znašala 5,8%.

V preglednici 3 so za primerjavo podane tudi vrednosti relativnih velikosti genoma še za nekatere druge vrste iz rodu *Cerastium*, ki so bile vključene tudi v filogenetsko analizo. Pri večini vrst rodu *Cerastium*, ki so bile vključene v meritve, je na histogramu FCM močno izražen vrh, ki sicer predstavlja fluorescenco jeder, ki so v G2/M fazi celičnega cikla. Izrazit vrh na tem mestu v histogramih FCM je v teh primerih najverjetneje posledica pogoste endoreduplikacije jeder pri osebkih vrst iz tega rodu.

Preglednica 3: Relativne velikosti genoma dinarske smiljke in nekaterih drugih vrst rodu *Cerastium*, vključenih tudi v filogenetsko analizo; N – število meritev za populacijo, * – zaradi slabe kakovosti histogramov FCM je bilo možno oceniti le ploidno stopnjo DNA, ki je navedena v oklepaju.

vrsta	oznaka populacije	N	relativna velikost genoma (povprečje ± SD)
<i>C. dinaricum</i>	1	7	0,3011 ± 0,0029
<i>C. dinaricum</i>	2	2	0,3066 ± 0,0017
<i>C. dinaricum</i>	3	6	0,3060 ± 0,0016
<i>C. dinaricum</i>	4	10	0,3081 ± 0,0031
<i>C. dinaricum</i>	5	10	0,3202 ± 0,0051
<i>C. dinaricum</i>	6	-	* (2n=2x)
<i>C. dinaricum</i>	7	12	0,3226 ± 0,0035
<i>C. dinaricum</i>	8	11	0,3265 ± 0,002
<i>C. dinaricum</i>	9	19	0,3228 ± 0,0038
<i>C. dinaricum</i>	10	10	0,3249 ± 0,0033
<i>C. arvense</i> subsp. <i>strictum</i>	Carv C002	4	0,333 ± 0,006
<i>C. banaticum</i> subsp. <i>kosaninii</i>	Cban C241	5	0,668 ± 0,005
<i>C. carinthiacum</i>	Ccar C006	5	0,367 ± 0,002

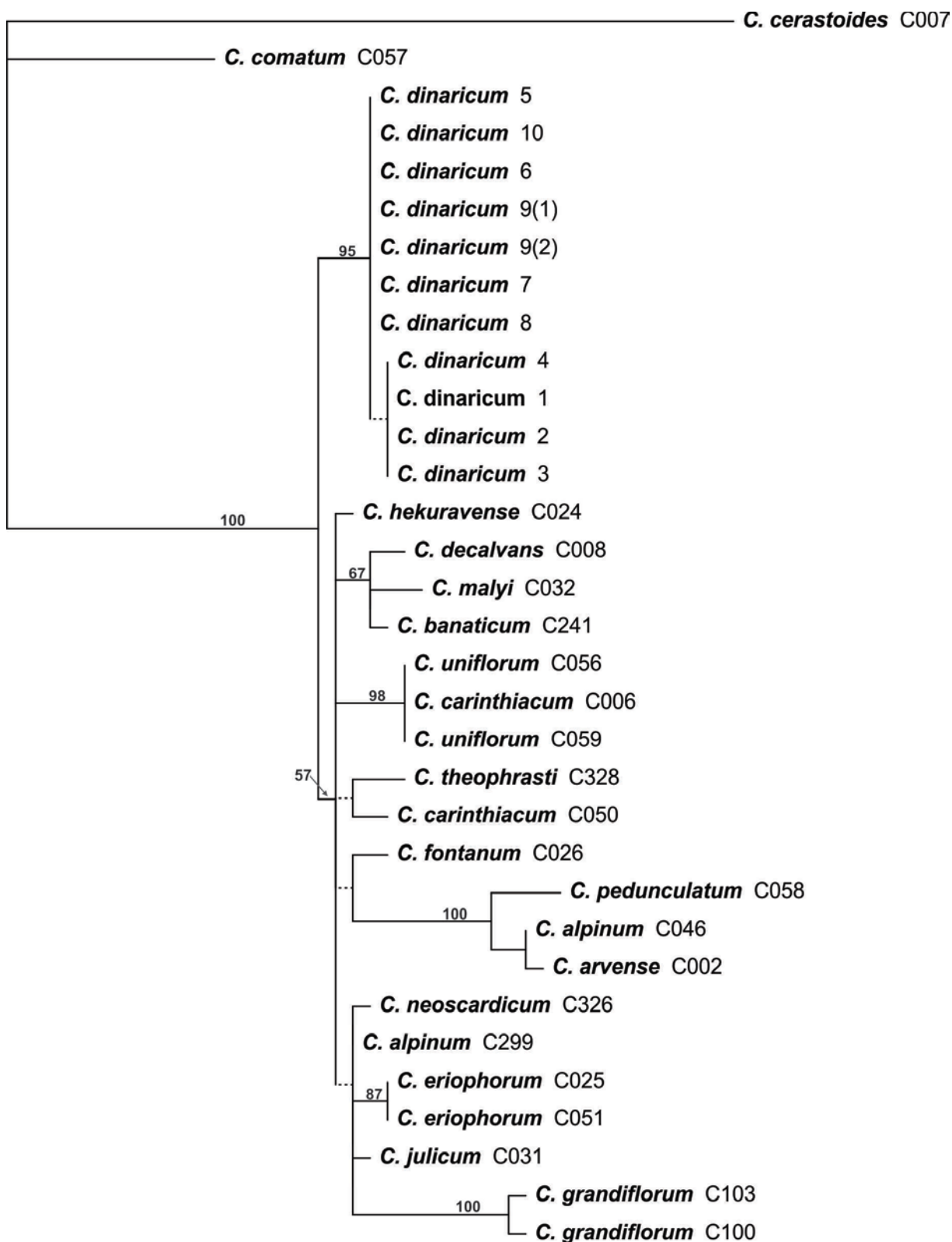
(»se nadaljuje«)

Preglednica 3 (»nadaljevanje«)

<i>C. carinthiacum</i>	Ccar C050	3	0,370 ± 0,000
<i>C. carinthiacum</i>	Ccar C005	5	0,368 ± 0,003
<i>C. carinthiacum</i>	Ccar C043	5	0,358 ± 0,002
<i>C. cerastoides</i>	Ccer C007	5	0,364 ± 0,005
<i>C. comatum</i>	Ccom C057	1	0,320
<i>C. decalvans</i> subsp. <i>decalvans</i>	Cdec C008	4	0,315 ± 0,006
<i>C. decalvans</i> subsp. <i>decalvans</i>	Cdec C011	1	0,320
<i>C. eriophorum</i>	Ceri C025	5	0,302 ± 0,003
<i>C. eriophorum</i>	Ceri C051	5	0,354 ± 0,003
<i>C. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>	Cfon C026	5	0,716 ± 0,015
<i>C. grandiflorum</i>	Cgra C027	5	0,338 ± 0,004
<i>C. grandiflorum</i>	Cgra C100	5	0,594 ± 0,009
<i>C. hekuravense</i>	Cdin C024	10	0,374 ± 0,003
<i>C. julicum</i>	Cjul C031	-	* (2n=2x)
<i>C. malyi</i> subsp. <i>malyi</i>	Cmal C032	-	* (2n=4x)
<i>C. neoscardicum</i>	Cneo C326	3	0,883 ± 0,006
<i>C. pedunculatum</i>	Cped C058	-	* (2n=2x)
<i>C. sylvaticum</i>	Csyl C039	5	0,306 ± 0,002
<i>C. uniflorum</i>	Cuni C056	3	0,377 ± 0,004
<i>C. uniflorum</i>	Cuni C059	6	0,382 ± 0,005

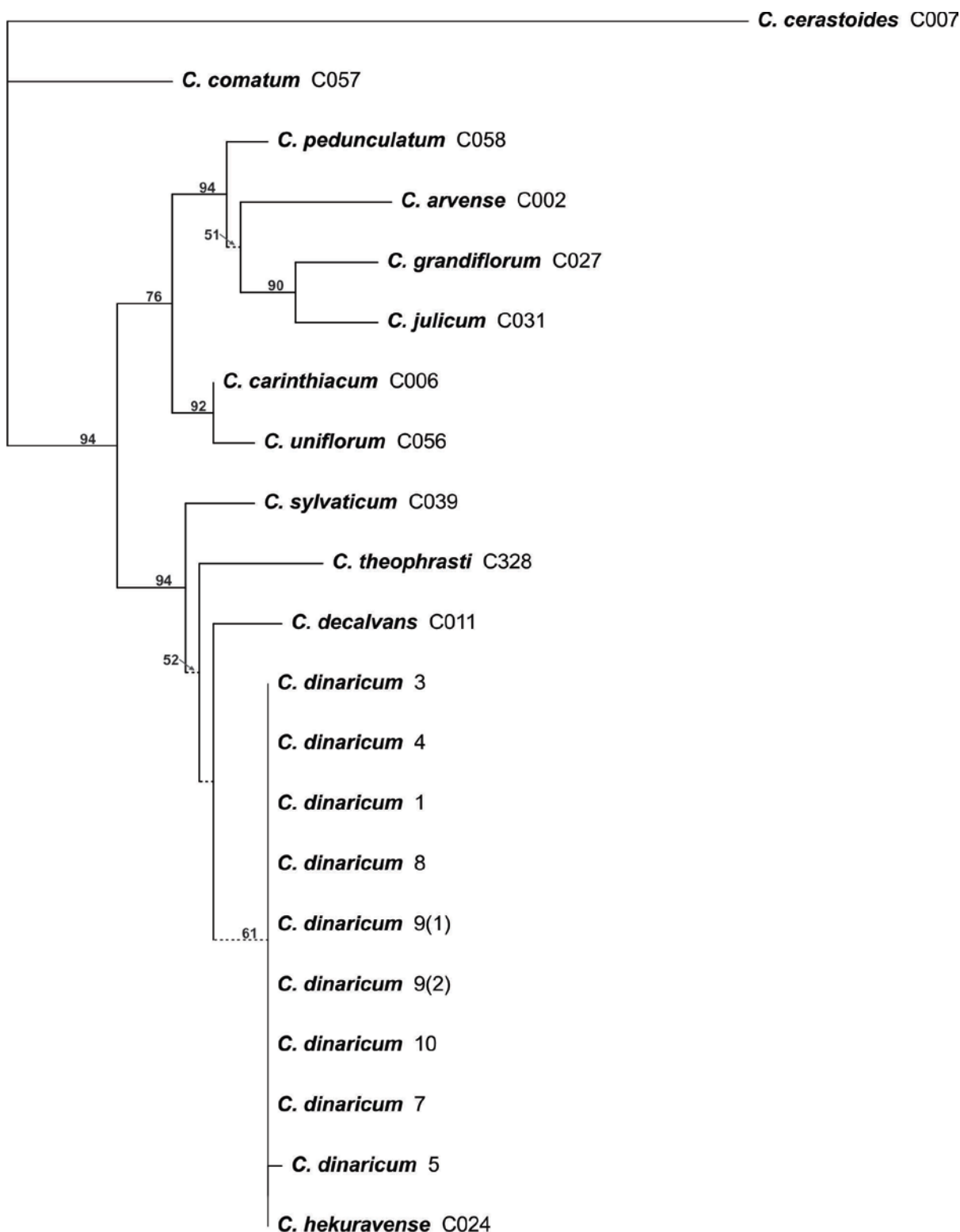
3.2 Filogenetska analiza regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA

Poravnava zaporedij regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA 33 osebkov (vrst, ki so navedene v preglednicah 1 in 2) je bila dolga 2733 baznih parov. Iz analize sem izključil 93 baznih parov (mesta 1582-1674 v poravnavi), ker je bila poravnava zaporedij na tem mestu dvomljiva. V analizo je bilo tako vključenih 2640 znakov, od tega je bilo 74 znakov variabilnih, a niso bili informativni za kriterij največje varčnosti, 48 znakov pa je bilo informativnih za kriterij največje varčnosti. V hevrističnem iskanju je bilo najdenih 521062 dreves, dolgih 130 korakov. *Consistency* indeks (CI) je znašal 0,9615 (brez neinformativnih znakov 0,9107), *retention* indeks (RI) pa 0,9550. Dinarska smiljka predstavlja v drevesu monofiletsko skupino (Slika 9), ki ima tudi dobro statistično podporo (95%). Razmerje z ostalimi vrstami rodu, vključenimi v analizo, ni razrešeno.



— 1 sprememba

Slika 9: Filogram enega izmed 521062 dreves, ki so ustrezala kriteriju največje varčnosti za regijo *ndhJ-trnT* plastidne DNA; dolžina vej je sorazmerna številu substitucij, številke nad vejami predstavljajo statistično podporo (višjo od 50%), določeno z metodo zankanja, črktane veje v drevesu strogega soglasja niso prisotne.



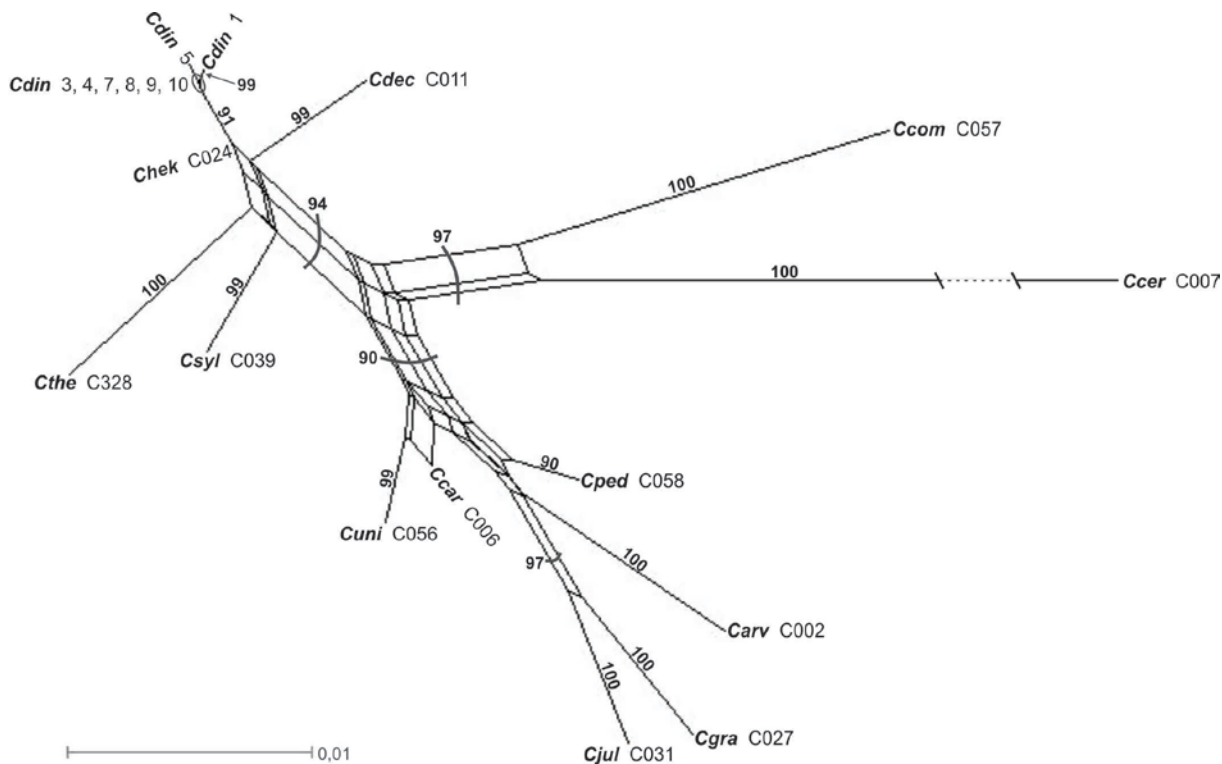
– 1 sprememba

Slika 10: Filogram enega izmed 28131 dreves, ki so ustrezala kriteriju največje varčnosti za regijo ITS jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S; dolžina vej je sorazmerna številu substitucij, številke nad vejami predstavljajo statistično podporo (višjo od 50%), določeno z metodo zankanja, črtkane veje v drevesu strogega soglasja niso prisotne.

3.3 Filogenetska analiza regije ITS jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S

Poravnava zaporedij regije ITS jedrnega ribosomalnega cistrona osebkov (vrst, ki so navedene v preglednicah 1 in 2) je bila dolga 855 baznih parov. Od tega je bilo 75 znakov variabilnih, a niso bili informativni za kriterij največje varčnosti, 39 znakov pa je bilo informativnih za kriterij največje varčnosti. V hevrističnem iskanju je bilo najdenih 28131 dreves, dolgih 150 korakov. *Consistency* indeks (CI) je znašal 0,8800 (brez neinformativnih znakov 0,7231), *retention* indeks (RI) pa 0,8676.

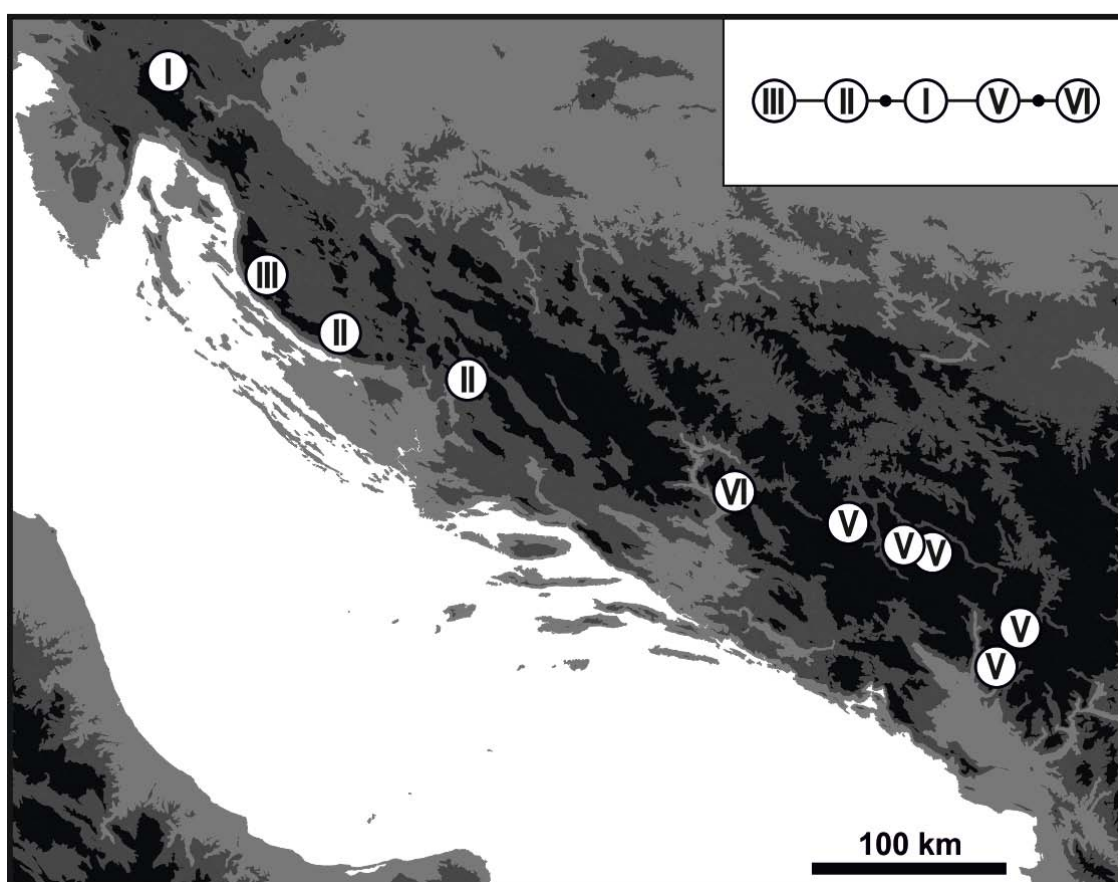
V drevesu *C. dinaricum* ne predstavlja monofiletske skupine (Slika 10), saj je v isti klad vključen vsaj *C. hekuravense* (statistična podpora te skupine je nizka - 61%), v drevesu strogega soglasja pa tudi *C. decalvans*, *C. theophrasti* in *C. sylvaticum*. V diagramu NeighborNet (Slika 11), izdelanem na podlagi istega nabora podatkov, je *C. dinaricum* ločen od ostalih vrst, tudi od *C. hekuravense* - s *splitom*, ki ima visoko statistično podporo (91%).



Slika 11: Diagram NeighborNet za regijo ITS jedrnega ribosomalnega cistrona 18S-5.8S-26S; na diagramu so ob *splitih* označene vrednosti statistične podpore, ki so večje od 90%; prekinjena črta ponazarja, da je povezava do *Ccer* predstavljena nesorazmerno in je v resnici daljša.

3.4 Statistično omrežje največje varčnosti za haplotipe regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA dinarske smiljke

Poravnava zaporedij regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA 45 osebkov dinarske smiljke iz 10 različnih populacij (preglednica 4) je bila dolga 2170 baznih parov in je vsebovala 7 variabilnih znakov. Analiza je pokazala obstoj 5 haplotipov. Znotraj populacij nisem zaznal variabilnosti haplotipov plastidne DNA. Rezultati so prikazani na sliki 11 in navedeni v preglednici 4.



Slika 12: Geografska razporeditev haplotipov plastidne DNA na podlagi analize zaporedja *ndhJ-trnT* 10 populacij dinarske smiljke in statistično omrežje največje varčnosti za iste haplotipe (desno zgoraj).

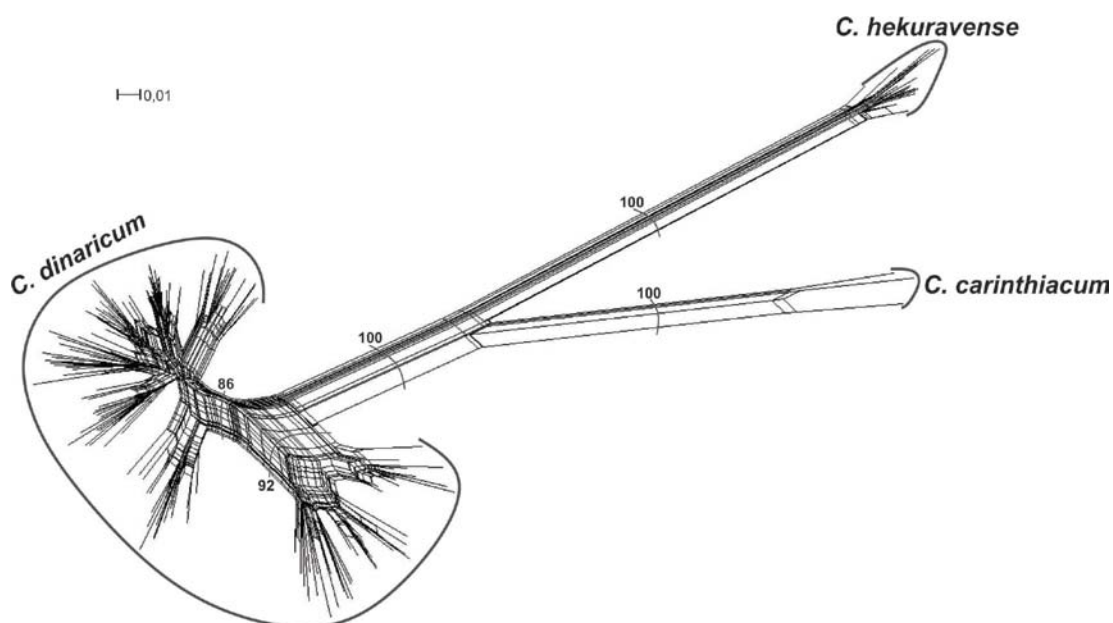
Z analizo, v katero sem kot zunanjik (*outgroup*) dodal zaporedja nekaj sorodnih vrst (*C. hekuravense* in *C. carinthiacum*, *C. uniflorum*), sem določil korenino za omrežje haplotipov plastidne DNA dinarske smiljke, ki izhaja iz haplotipa V (Slika 17 v poglavju Razprava).

3.5 Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP)

V analizo fragmentov na gelu sem vključil profile AFLP nastale z dvema kombinacijama selektivnih začetnih oligonukleotidov: *EcoRI*(6-Fam)-ATC/*MseI*-CTG in *EcoRI*(VIC)-AAG/*MseI*-CTG. Selektivno pomnoževanje za kombinacijo *EcoRI*(NED)-AAC/*MseI*-CAT ni uspelo.

Indeks napake (po Bonin in sod., 2004) je, pred izključitvijo dvomljivih fragmentov, znašal povprečno 2,2%, po izključitvi teh fragmentov pa 0,85%. Nizka vrednost indeksa napake kaže na zanesljivost pridobljenih podatkov (Bonin, 2004).

Matrika, v katero so bili vključeni osebki *C. dinaricum*, *C. hekuravense* in *C. carinthiacum*, je vsebovala 168 osebkov in 264 označevalcev AFLP (od tega 6 takih, ki so bili prisotni pri vseh osebkih). Diagram NeighborNet, izračunan iz razdalj med osebki, je prikazan na sliki 12. Na njem je vidna statistično dobro podprta močna ločitev osebkov *C. hekuravense* in *C. carinthiacum* od osebkov *C. dinaricum*.



Slika 13: Diagram NeighborNet profilov AFLP osebkov *C. dinaricum*, *C. hekuravense* in *C. carinthiacum*. Številke ob *splittih* predstavljajo statistično podporo, določeno z metodo zankanja.

Matrika, ki sem jo uporabil za filogeografsko analizo dinarske smiljke, je vsebovala 170 označevalcev AFLP (od tega 19 takih, ki so bili prisotni pri vseh osebkih) za 148 osebkov iz 10 populacij.

Matrika, ki sem jo za primerjavo pridobil z računalniškim samodejnim določanjem prisotnosti/odsotnosti fragmentov, je vsebovala podobno število fragmentov, rezultati njene analize (diagram NeighbourNet) pa so bili izjemno podobni rezultatom analize matrike, ki sem jo pridobil z »ročnim« določanjem prisotnosti/odsotnosti fragmentov. Vsi prikazani rezultati so produkt analize slednje matrike.

3.5.1 Nei-jev koeficient genetske raznolikosti (D) in indeks redkosti alelov (R)

Nei-jev koeficient genetske raznolikosti znaša od 0,12 do 0,04. Populacija 4 ima najvišjo vrednost indeksa, sledi populacija 6, najmanjšo vrednost pa ima indeks za populacijo 7. Največ redkih alelov je prisotnih v populacijah 4 in 6, najmanj pa v populaciji 7. Indeks R_{pop} znaša od 2,04 do 1,00. Rezultati za vse populacije (razen populacije 2, ki je bila zaradi nizkega števila vzorčenih osebkov izključena iz te analize) so prikazani v preglednici 4 in na sliki 13.

Preglednica 4: Haplotipi plastidne DNA in indeksa za oceno genetske pestrosti na podlagi AFLP; N_{cpDNA} – število osebkov na populacijo, katerih zaporedje regije *ndhJ-trnT* smo pridobili; H_{cp} - haplotipi plastidne DNA na podlagi analize zaporedja *ndhJ-trnT*; N_{AFLP} - število osebkov na populacijo, vključenih v analizo AFLP; D - Nei-jeva genetska raznolikost; R_{pop} - indeks redkosti alelov.

oznaka populacije	N_{cpDNA}	H_{cp}	N_{AFLP}	D (N=11)	R_{pop} (N=11)
1	4	I	15	0,0535	1,387
2	4	III	4	-	-
3	5	II	11	0,0519	1,217
4	3	II	15	0,1204	2,035
5	5	VI	18	0,0910	1,528
6	4	V	16	0,1129	1,682
7	5	V	17	0,0384	0,999
8	5	V	17	0,0714	1,332
9	6	V	18	0,0915	1,423
10	4	V	17	0,0858	1,215

3.5.2 Analiza molekularne variance (AMOVA)

Pri nehierarhični analizi molekularne variance predstavlja večji delež variacije medpopulacijska variacija (62%), v primerjavi z znotrajpopulacijsko variacijo (38%). Pri analizi, v katero sem vključil tudi raven geografskih skupin (severozahodna in jugovzhodna skupina), največji del variacije odpade ravno na to raven (42,4%). Rezultati analiz so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Rezultati analize molekularne variance (AMOVA)

	vir variacije	vsota kvadratov	komponente variance	odstotek variacije
brez določitve skupin	med populacijami	1480,7	10,8	61,94
	znotraj populacij	912,4	6,6	38,06
dve skupini	med skupinama	690,2	9,5	42,41
	med populacijami znotraj skupin	790,5	6,3	28,02
	znotraj populacij	912,4	6,6	29,57

3.5.3 Diagram NeighborNet

Diagram NeighborNet, dopoljen s stopnjami zaupanja iz zankanja analize združevanja sosedov (Slika 14), kaže na močno diferenciacijo populacij dinarske smiljke v dve skupini, severozahodno (populacije 1–4) in jugovzhodno (populacije 5–10). Statistična podpora je visoka (100%). V omrežju je razvidna tudi močna diferenciacija populacije 1 od ostalih populacij severne skupine (2, 3, 4) s prav tako visoko statistično podporo (98%). V južni skupini je opazna diferenciacija populacije 5 od ostalih populacij (6, 7, 8, 9, 10) te skupine, med slednjimi (6, 7, 8, 9, 10) pa tudi diferenciacija populacije 10. Statistična podpora v zadnjih dveh primerih ni zelo visoka (74%, 76%).

3.5.4 Bayesovo združevanje profilov AFLP s programom STRUCTURE

V okviru analize podatkov s programom STRUCTURE sem (po kriteriju opisanem v poglavju Material in metode) izbral $K=2$ kot najprimernejše število skupin. Populacije 1–4 so bile na ta način uvrščene v prvo (severozahodno), populacije 5–10 pa v drugo (jugovzhodno) skupino. Na sliki 13 so grafično prikazani populacijski koeficienti pripadnosti posamezni genetski skupini. Pripadnost populacije severozahodni skupini je označena z zelenimi odtenki, pripadnost jugovzhodni skupini pa z rdečimi. Vsi osebki vsake od populacij so uvrščeni le v eno skupino.

Za izvedbo nadaljnjih ločenih analiz sem izdelal ločeni matriki za severozahodno in jugovzhodno skupino. Matrika za severozahodno skupino je vsebovala 130 fragmentov (od tega 30 takih, ki so bili prisotni pri vseh osebkih) za 45 osebkov, matrika za jugovzhodno skupino pa 139 fragmentov (od tega 26 takih, ki so bili prisotni pri vseh osebkih) za 103 osebke.

Pri analizi severne skupine sem določil $K=2$ kot optimalno število skupin. Populacija 1 je vključena v prvo, vse ostale (2, 3, 4) pa v drugo skupino. Pri ločeni analizi južne skupine sem določil optimalno število podskupin pri dveh vrednostih K . Pri $K=2$ je populacija 5 ločena od ostalih populacij jugovzhodne skupine (6–10); pri $K=5$ pa so populacije 5, 7, 9 in 10 vključene vsaka v svojo podskupino, populaciji 6 in 8 pa sta vključeni v isto podskupino. Pri tem je večina osebkov populacij uvrščenih le v po eno podskupino, pri nekaterih pa je opaziti rahlo mešanje (8, 9). Na sliki 13 so različne genetske podskupine severozahodne skupine prikazane z različnimi zelenimi odtenki, različne genetske podskupine jugovzhodne skupine pa z različnimi rdečimi odtenki.

3.5.5 Populacijski grafi

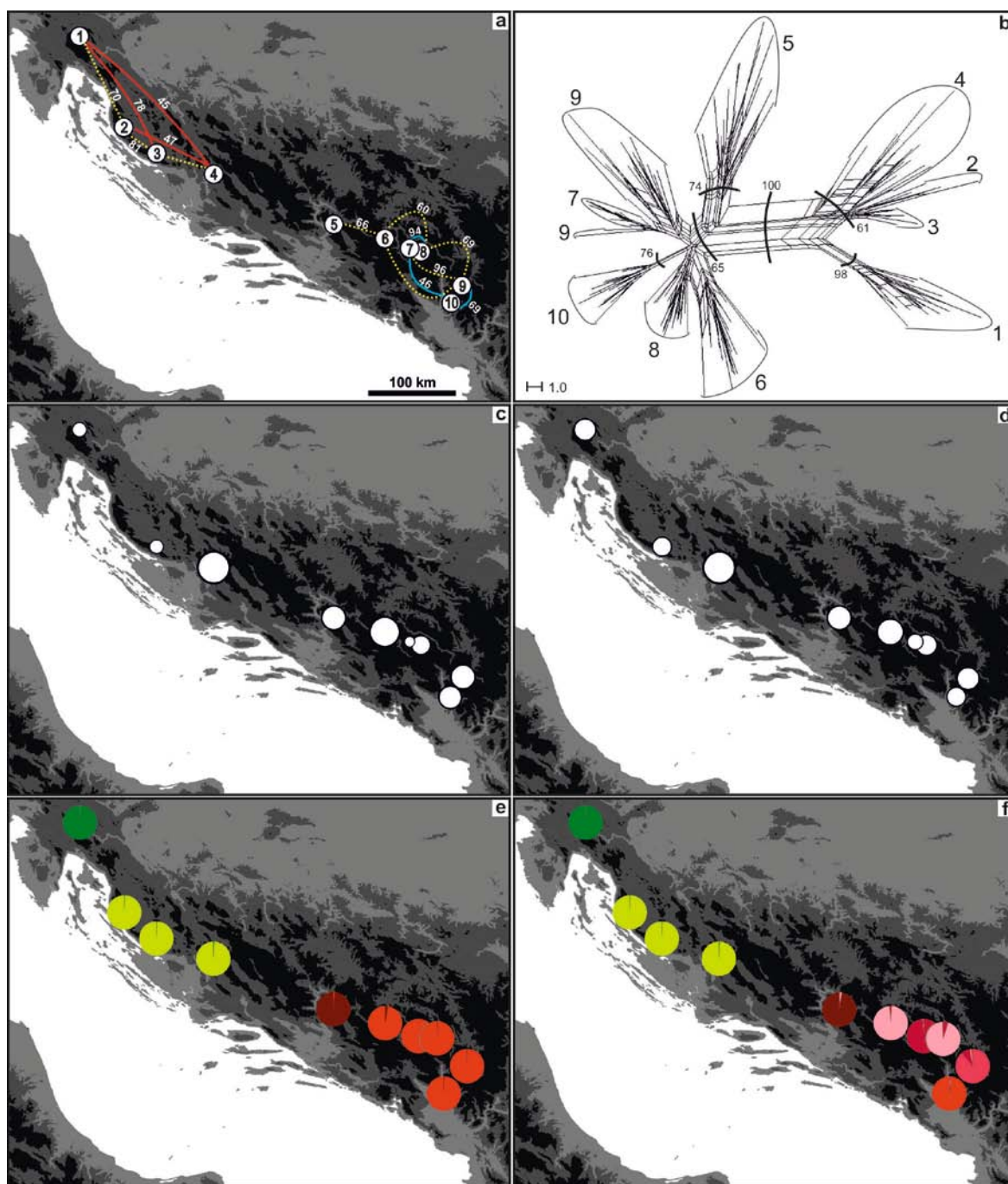
Rezultat analize v okviru teorije grafov predstavljata dva ločena grafa. V prvega so povezane populacije severozahodne (1–4), v drugega pa populacije jugovzhodne skupine (5–10). Grafa z vsemi povezavami, nanesena na geografsko ozadje, sta prikazana na sliki 13. Vse povezave, razen povezav med 3 in 4 ter med 6 in 9, so, glede na statistično podporo določeno z metodo zankanja, stabilne (podpora je višja ali enaka 45%).

V grafu severozahodne skupine so vse populacije povezane druga z drugo. Povezave med 1 in 3, med 1 in 4 ter med 2 in 4 predstavljajo razširjene povezave, kar pomeni, da so si ti pari populacij geografsko bolj narazen, kot bi pričakovali glede na njihove genetske razdalje. Razširjene povezave so na sliki 13 rdeče barve.

V grafu jugovzhodne skupine je populacija 9 povezana z vsemi ostalimi populacijami skupine, razen s populacijo 5. Populacija 5 je povezana samo s populacijo 6. Povezave med 7 in 8, med 8 in 10 ter med 9 in 10 predstavljajo stisnjene povezave, kar pomeni, da so ti pari populacij geografsko bolj skupaj, kot bi pričakovali glede na njihove genetske razdalje. Stisnjene povezave so na sliki 13 modre barve.

3.5.6 Genetski test dodelitve s programom AFLPOP

Genetski test dodelitve (assignment test) s pomočjo programa AFLPOP 1.1 je kot najverjetnejši izvorni populaciji za populacijo 7 (pri testu, pri katerem je bila izbrana najmanjša stopnja log-verjetnostne razlike enaka 0) določil populaciji 8 (70,6%) in 9 (29,4%). Pri testu, pri katerem je bila izbrana najmanjša stopnja log-verjetnostne razlike enaka 1, je program uspešno izvedel alokacijo 9 osebkov, osmim je kot izvorno populacijo pripisal populacijo 8, enemu pa populacijo 9. V primeru, ko je bila pri testu izbrana najmanjša stopnja log-verjetnostne razlike enaka 2, je program uspešno izvedel alokacijo le enega osebkov, temu je za izvorno populacijo pripisal populacijo 8.



Slika 14: Genetska struktura dinarske smiljke na podlagi analize profilov AFLP. *a* – populacijska grafa za dinarsko smiljko, nanesena na geografsko ozadje, rumene črtkane črte predstavljajo povezave pri katerih je geografska razdalja sorazmerna genetski, rdeče so razširjene, modre pa stisnjene povezave, številke ob robovih predstavljajo njihovo statistično podporo; *b* – Diagram NeighborNet na podlagi matrike razdalj Nei-Li, večje številke predstavljajo oznake populacij, manjše številke ob odebeljenih črtah pa statistično podporo *splita*; *c* – Nei-jeva genetska raznolikost (D); *d* – indeks redkosti alelov za populacije (R_{pop}); *c in d* – velikost kroga je sorazmerna vrednosti indeksa; *e in f* – Bayesovo združevanje profilov AFLP s programom STRUCTURE, zelena in rdeča predstavljata dva genska sklada ($K=2$) kot rezultat analize celotnega nabora podatkov, dva različna odtenka zelene predstavljata dva genska sklada ($K=2$) kot rezultat ločene analize za severozahodno skupino populacij; *e* – dva različna odtenka rdeče predstavljata dva genska sklada kot rezultat ločene analize za jugovzhodno skupino populacij pri $K=2$; *f* – pet različnih odtenkov rdeče predstavlja pet genskih skladov kot rezultat ločene analize za jugovzhodno skupino populacij pri $K=5$.

4 RAZPRAVA

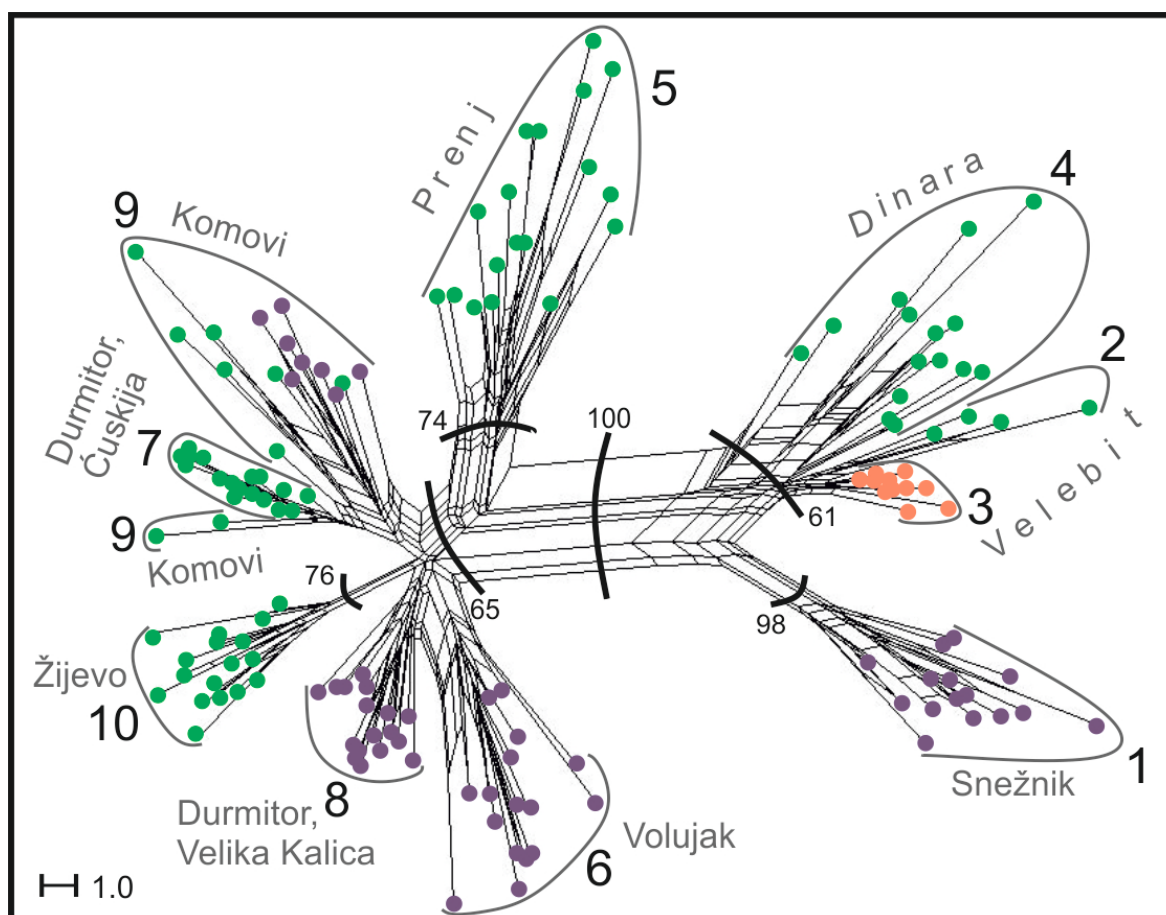
4.1 *Cerastium dinaricum* in *C. hekuravense* ter tradicionalna znotrajvrstna delitev dinarske smiljke

Od opisa dinarske smiljke (Beck in Szyszylł, 1888) do danes je pojmovanje te vrste in njene znotrajvrstne variabilnosti doživelo nekaj sprememb. Zadnji se je z dinarsko smiljko v okviru taksonomske revizije rodu *Cerastium* na Balkanu ukvarjal Niketić (1999, 2004), ki znotraj vrste prepoznava obstoj dveh varietet: var. *dinaricum* in var. *hekuravense* (Jáv.) Niketić in Glasn., pri prvi pa še nadalje dveh form (f. *dinaricum* in f. *velebiticum* Degen et Lengyel), vendar rezultati mojih analiz kažejo, da ta taksonomska delitev ne ustreza dejanskim filogenetskim odnosom. Filogenetske analize plastidne regije DNA (Slika 11), meritve relativne velikosti genoma (preglednica 3), in analize označevalcev AFLP (Slika 13), namreč podpirajo *C. hekuravense* s klasičnega nahajališča (Maja Hekurave, Prokletije, Albanija) kot samostojno evlucijsko linijo (vrsto), s katero pa ostale populacije, ki jih Niketić (2004) označuje kot var. *hekuravense*, ne tvorijo monofiletske skupine, temveč so vključene v evlucijsko linijo *C. dinaricum*. Filogenetska analiza zaporedja vmesnika ITS jedrne DNA z metodo največje varčnosti združi *C. hekuravense* in *C. dinaricum* v isto skupino, ki pa ima nizko statistično podporo. Resolucija izbranega vmesnika je bila v splošnem nizka, poleg tega pa so se, še zlasti pri *C. hekuravense*, v zaporedju pojavljali številni polimorfizmi, ki niso informativni po kriteriju največje varčnosti. Filogenetske odnose v tem primeru bolje predstavlja diagram NeighborNet, v katerem je *C. dinaricum* ločen od ostalih vrst, tudi od *C. hekuravense* – s *splitom*, ki ima visoko statistično podporo (Slika 9). Niketić (2004) kot edini razlikovalni znak med varietetama navaja prisotnost žleznih dlak na listih, vendar pa se po naših opažanjih (na klasičnih nahajališčih vrste) in primerjavi nabranih herbarijskih primerkov, *C. hekuravense* in *C. dinaricum* že na pogled razlikujeta v habitusu oz. razrasti (Slika 15), zato bi z natančnejšo morfometrično analizo verjetno lahko ugotovili tudi druge razlikovalne znake.



Slika 15: Fotografiji *a* – *C. dinaricum* (Komovi, Črna Gora) in *b* – *C. hekuravense* (Prokletije, Albanija) s klasičnih nahajališč.

V nadaljevanju se bom omejil le na dinarsko smiljko, torej populacije, ki v filogenetskem drevesu plastidne regije *ndhJ-trnT* (Slika 11) in diagramu NeighbourNet profilov AFLP (Slika 13) tvorijo monofiletsko skupino. Zaradi enostavnosti bom populacije z žlezasto dlakavimi listi še naprej označeval kot var. *hekuravense*, čeprav niso konspecifične s *C. hekuravense* s klasičnega nahajališča.



Slika 16: Diagram NeighbourNet profilov AFLP dinarske smiljke na katerem so prikazane varietete in forme vzorčenih osebkov po obstoječi znotrajvrstni taksonomiji; zelene pike predstavljajo osebke *C. dinaricum* var. *hekuravense*, oranžne *C. dinaricum* var. *dinaricum* f. *velebiticum* in vijolične *C. dinaricum* var. *dinaricum* f. *dinaricum*. Številke od 1 do 10 predstavljajo številke populacij iz preglednice 1, številke ob odebeljenih črnih črtah pa statistično podporo *splitov*, določeno z metodo zankanja.

Glede na rezultate mojih filogenetskih analiz (slike 8-11, 15), delitev dinarske smiljke na dve varieteti nima nobene filogenetske podpore, saj so populacije obeh varietet medsebojno prepletene v drevesih ter diagramih in ne tvorijo dveh ločenih evlucijskih linij. Poleg tega smo ob vzorčenju znotraj populacije 9 (Komovi, Črna Gora) opazili osebke, ki so bili popolnoma brez žlezni dlak (var. *dinaricum*), poleg njih pa tudi take, ki so bili popolnoma poraščeni z žlezni dlakami (in bi torej po obstoječi taksonomiji pripadali var. *hekuravense*). Iz te populacije smo vzorčili 10 žlezno dlakavih osebkov in 10 osebkov brez žlezni dlak. Med njimi z nobeno od uporabljenih metod nismo zaznali filogenetskih razlik (Slika 16), niti razlik v velikosti genoma.

Tudi razlikovanje med formama znotraj var. *dinaricum* temelji le na podlagi prisotnosti žleznihi dlak na cvetočih poganjkih: f. *dinaricum* nima žleznihi dlak v socvetju, f. *velebiticum* pa jih ima. Degen in sod. (1908) so že na začetku 20. stoletja poročali o pojavljanju obeh form (takrat smatrani kot varieteti) na istem nahajališču na Velebitu. Razlike v prisotnosti žleznihi dlak, na katerih temelji znotrajvrstna razdelitev dinarske smiljke, bi morda lahko bile odraz lokalne adaptacije, ki je ni moč zaznati s pomočjo nevtralnih molekulskih označevalcev (Freeland s sod., 2011). Tudi pri drugih vrstah so znane dlakave in gole populacije; pri vrsti *Arabidopsis lyrata* so ugotovili, da je za izražanje tega znaka odgovoren en sam gen (Karkkäinen in sod., 2004). Ob upoštevanju dejstva, da varieteti in formi dinarske smiljke niso ločene niti geografsko niti ekološko, lahko ugotovimo, da je obstoječa znotrajvrstna taksonomija dinarske smiljke neustrezna.

4.2 Filogeografska struktura dinarske smiljke na podlagi analize profilov AFLP

Analiza profilov AFLP z različnimi metodami (distančna, koalescentna, analiza kovariance, teorija grafov) kaže na obstoj dveh evlucijskih linij znotraj dinarske smiljke (Slika 14a, b, e, f). Prvo (severozahodno) skupino sestavljajo štiri populacije iz Slovenije in Hrvaške, drugo (jugovzhodno) pa šest populacij iz Bosne in Hercegovine ter Črne Gore. Filogeografsko ločitev podpirajo tudi rezultati meritev relativne velikosti genoma (Slika 8); ta se med skupinama v povprečju razlikuje za 5,8%, pri čemer ima SZ skupina manjši genom kot JV. Meja med skupinama sovpada z dolino reke Neretve. Več objavljenih študij živalskih in rastlinskihi vrst na Balkanu ugotavlja pomen doline Neretve kot močne biogeografske bariere (Surina in sod., 2011; Frajman in Oxelman, 2007; Kryštufek in sod., 2007; Podnar in sod., 2004). Znotrajvrstna variabilnost velikosti genoma je lahko pokazatelj taksonomske heterogenosti ali speciacije v teku (Murray, 2005). S poskusi križanja med osebki iz severozahodne in jugovzhodne skupine bi bilo mogoče ugotoviti, ali ti predstavljajo isto biološko vrsto (v primeru, da tvorijo plodne potomce) ali pa bi bila smiselna členitev na dve ločeni vrsti.

Z analizo profilov AFLP (distančna metoda, koalescentna teorija) smo zaznali genetsko strukturiranost tudi znotraj dveh divergentnih skupin (Slika 14b, e, f). Ločena analiza profilov AFLP severozahodne skupine s programom STRUCTURE nakazuje divergenco

najsevernejše populacije (Snežnik, Slovenija) od ostalih populacij skupine (Slika 14e, f). To je razvidno tudi na diagramu NeighborNet (Slika 14b), na katerem ima ločitev osebkov te populacije od ostalih osebkov skupine visoko statistično podporo. Populacijo iz Snežnika po naših opažanjih na terenu (leta 2010) sestavlja le 15 osebkov. Zaradi majhne efektivne velikosti populacije je v njej zelo verjeten povečan učinek genetskega drsa. Povečan učinek genetskega drsa in posledično homogenizacijo genetskega sklada potrjuje opažena relativno nizka genetska diverziteteta te populacije (Nei-jev indeks: Slika 14c). Ob tem velja omeniti, da je indeks redkosti alelov (Slika 14d) za to populacijo relativno visok, kar bi lahko nakazovalo že dolgo časa trajajočo izoliranost te populacije (Schönswetter in Tribsch, 2005).

Na osnovi profilov AFLP dinarske smiljke sem izdelal tudi populacijski graf (Slika 14a), ki omogoča sočasen prikaz signifikantne genetske kovariance za vse pare populacij (Dyer in Nason, 2004). Rezultat analize sta ločena grafa za severozahodno in jugovzhodno skupino. V populacijskem grafu severozahodne skupine je vsaka od populacij povezana z vsemi ostalimi populacijami skupine, statistična podpora v veliki večini primerov nakazuje stabilnost povezav. Tri izmed šestih povezav v grafu so razširjene povezave; genetske razdalje med pari populacij so v teh primerih manjše, kot bi pričakovali glede na geografske razdalje (Garrick in sod., 2009).

Brez natančne časovne analize je nemogoče časovno umestiti divergenco med Snežniško in ostalimi populacijami severozahodne skupine dinarske smiljke, vendar je, glede na opažen vzorec in plitko genetsko delitev, mogoče, da je vrsta v času zadnje poledenitve preživela v dveh glacialnih refugijih (Snežnik, Velebit-Dinara), od koder se je nato, v času segrevanja ozračja, z disperzijo razširila tudi na druga območja, vendar ne čez dolino Neretve. Na terenu smo opazili, da je vrsta ekološko vezana na hladnejša visokogorska melišča in skalne razpoke severnih pobočij (oz. na Snežniku na vrtačo z dokazano temperaturno inverzijo). Predpostavljamo lahko, da je med nadaljnjo otoplitvijo vrsta migrirala v višje nadmorske lege, kjer se je ohranila do danes. Disjunktni areal dinarske smiljke na severozahodu je torej verjetno posledica disperzije vrste iz enega od refugijev in kasnejše fragmentacije areala zaradi migracije v višje nadmorske lege, ki so v tem delu

areala dinarske smiljke razmeroma geografsko oddaljene, kar preprečuje stik med populacijami (vsaj med Snežniško in Velebitsko-Dinarsko skupino).

Analiza profilov AFLP jugovzhodne skupine prav tako nakazuje divergenco najsevernejše izmed populacij te skupine (Prenj, Bosna in Hercegovina) od ostalih populacij skupine. Ločitev osebkov te populacije od ostalih osebkov skupine je vidna na diagramu NeighbourNet (Slika 14b) in v populacijskem grafu jugovzhodne skupine (Slika 14a) ter podprta z analizo STRUCTURE (pri $K=2$). Rezultat analize profilov AFLP jugovzhodne skupine s programom STRUCTURE sta dve enako verjetni rešitvi pri različnih številih skupin ($K=2$, $K=5$). Pri $K=5$ vsaka od populacij predstavlja ločen genetski sklad, razen populaciji 6 (Volujak, Bosna in Hercegovina) in 8 (Velika Kalica, Durmitor, Črna Gora), ki sta uvrščeni v isto skupino (Slika 14f). Populacija 7 (Ćuskija, Durmitor, Črna Gora), ki predstavlja svoj genetski sklad, geografsko sicer leži med populacijama 6 in 8, v veliki bližini populacije 8, a na drugi strani glavnega gorskega grebena Durmitorja. Nei-jev indeks genetske raznolikosti in indeks redkosti alelov za populacijo 7 sta zelo nizka. Opaženo lahko razlagamo na dva načina: (1) z relativno nedavno migracijo enega ali nekaj semen iz populacije 8 čez gorski greben in ustanovitvijo nove populacije 7 s sočasno prekinitvijo pretoka genov s populacijo 8. Nizka genetska diverziteteta in divergenca populacije 7 od verjetne donorske populacije 8 je tako posledica ustanoviteljevega učinka. (2) Glede na to, da sta populaciji 6 in 8 uvrščeni v isti genetski sklad, je možno, da je bila nekoč, npr. med zadnjo poledenitvijo, na območju med obema današnjima populacijama sklenjena populacija, v času nadaljnje otoplitve pa je dinarska smiljka migrirala v višje nadmorske lege. Morda je današnja nizka stopnja genetske diverzitetete populacije 7 odraz učinka ozkega grla ob migraciji iz refugialne populacije v območje ozke ledeniške doline Ćuskija, medtem ko populaciji 6 in 8 nista bili podvrženi učinku ozkega grla. Rezultati genetskega testa dodelitve s programom AFLPOP so v prid prvi hipotezi, saj je populacija 8 najverjetnejša donorska populacija vzorčenih osebkov iz populacije 7, noben osebek iz te populacije pa ni v nobenem primeru alociran v populacijo 6.

V populacijskem grafu jugovzhodne skupine (Slika 14a) je povezanost med populacijami manjša kot v SZ skupini (vsaka od populacij ni povezana z vsemi ostalimi), tri izmed osmih povezav v grafu so stisnjene povezave; genetske razdalje med pari populacij so v teh

primerih večje, kot bi pričakovali glede na geografske razdalje. Stisnjena identiteta povezave med populacijama 7 in 8 podpira zgoraj opisano hipotezo (1) o nastanku populacije 7 z migracijo nekaj semen iz populacije 8 in sledečim ustanoviteljevim učinkom. Manjšo stopnjo povezanosti med populacijami v grafu, prisotnost stisnjenih povezav in večjo genetsko strukturiranost znotraj skupine, ki jo nakazuje analiza s programom STRUCTURE (pri $K=5$), lahko razložimo, če hipotetiziramo, da je vrsta v tem delu areala čas zadnje poledenitve preživela v več ločenih refugijih. Današnja disjunktna distribucija dinarske smiljke v jugovzhodnem delu areala je torej verjetno vsaj v določeni meri izvira že iz časa poledenitev, opažena genetska struktura znotraj JV skupine pa bi lahko bila tudi rezultat vikariance populacij po zadnji ledeni dobi. Danes lahko na terenu opazimo, da je vrsta omejena na hladna visokogorska rastišča, ki so med seboj ločena z dolinami, v katerih ekološke razmere za preživetje dinarske smiljke niso primerne. Genetska struktura, opažena z analizo profilov AFLP, je tako lahko posledica izoliranosti populacij, ki je nastopila po poledenitvah, ko je vrsta domnevno migrirala v višje nadmorske lege.

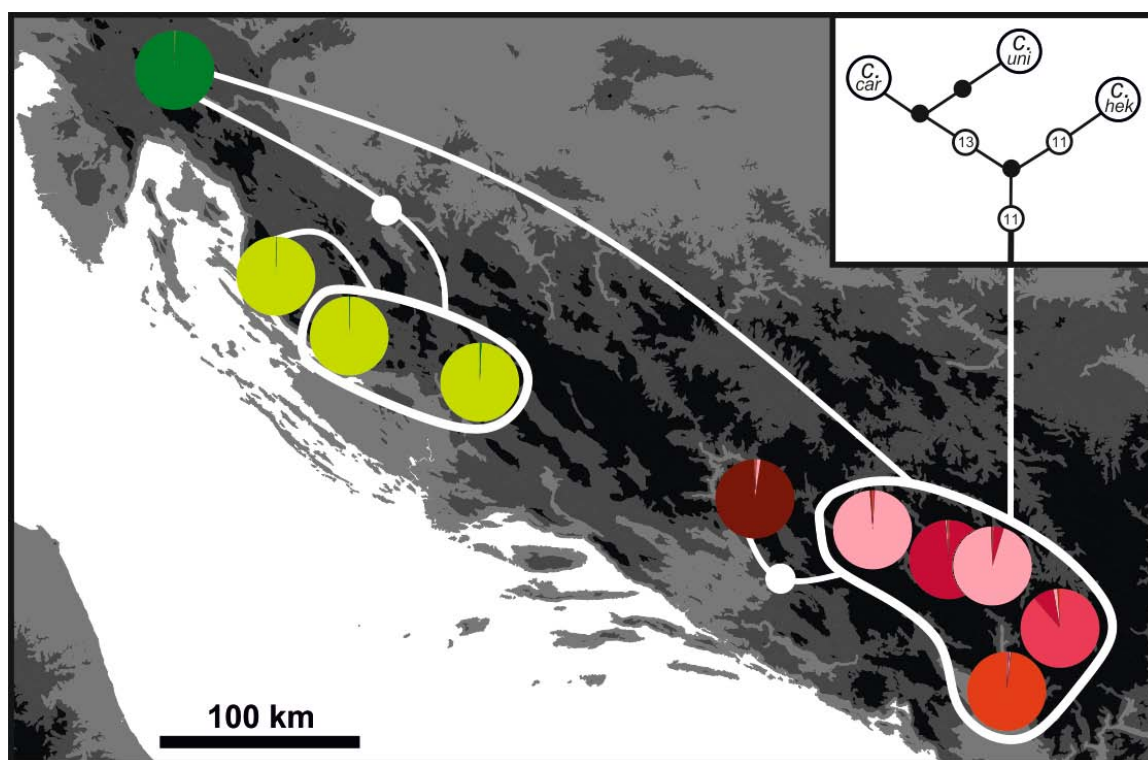
4.3 Sinteza rezultatov vseh uporabljenih molekularnih označevalcev in interpretacija opažene genetske strukture dinarske smiljke

Filogenetska analiza zaporedja vmesnika ITS ne kaže jasne genetske strukture med populacijami dinarske smiljke. ITS je jedrni označevalec, ki se deduje po obeh starših, zato pogosto izkazuje nižjo stopnjo divergence kot npr. nekatere regije plastidne DNA, ki se dedujejo zlasti maternalno (Petit in sod., 2005). Poleg tega je vmesnik ITS podvržen kompleksnemu procesu koncertirane evolucije, v katerem se številne kopije tega vmesnika v genomu, v primeru heterogenosti, homogenizirajo, kar lahko prav tako vodi k zmanjšani stopnji divergence (Alvarez in Wendel, 2003, Eidesen in sod., 2007). Kljub vsemu je na diagramu NeighbourNet (Slika 9) za vmesnik ITS opazna divergenca najsevernejše izmed populacij v obeh skupinah, ki smo jo zaznali tudi z analizo profilov AFLP in regije *ndhJ-trnT* plastidne DNA.

Rezultati filogeografske analize regije *ndhJ-trnT* se ne skladajo povsem z analizo profilov AFLP in meritvami velikosti genoma, kar glede na različno naravo evolucije izbranih

označevalcev ni nenavadno (Petit in sod., 2005, Eidesen in sod., 2007). Najpogostejši haplotip plastidne DNA se pojavlja v petih populacijah na jugovzhodu, populaciji 3 (Vaganski vrh, Velebit) in 4 (Dinara) sta opredeljeni z istim haplotipom, v vsaki od ostalih populacij pa je prisoten svoj haplotip. Haplotip s Prenja (Bosna in Hercegovina) je v omrežju haplotipov ločen od najpogostejšega haplotipa z dvema korakoma. Razen divergence slednjega, je torej genetska struktura (glede na analizo regije *ndhJ-trnT*) v jugovzhodnem delu areala vrste homogena, kar je nasprotno od opažene strukturiranosti znotraj jugovzhodne skupine pri analizi profilov AFLP. Takšna razlika ni povsem nepričakovana, saj genotipizacija AFLP temelji na bistveno več znakih in tako zajame razlike v celotnem genomu, medtem ko uporabljeno plastidno zaporedje predstavlja le majhen delček genoma. Tudi v številnih drugih študijah so z metodo AFLP odkrili divergentnost populacij ali vrst ob odsotnosti divergence plastidnih zaporedij (npr. Beardsley in sod., 2003; Despres in sod., 2003). Pri tem je verjetno, da filogeografska struktura plastidne DNA predstavlja starejši vzorec, medtem ko je struktura profilov AFLP odraz mlajših evlucijskih dogodkov. Tako lahko predpostavimo, da označevalci plastidne DNA kažejo na časovno bolj oddaljeno divergenco, ki lahko izvira iz časa pred velikimi poledenitvami (Eidesen in sod., 2007), medtem ko označevalci AFLP odražajo časovno manj oddaljeno divergenco, zato so v mnogih študijah uporabljeni za interpretacijo dogodkov v času poledenitev (Hewitt, 2001).

V skladu s temi domnevami lahko predpostavimo, da je vrsta jugovzhodno od doline Neretve, poledenitve preživela v več ločenih refugijih, ki sovpadajo z lokacijo večjih gorskih grebenov na tem območju, kar je bilo opaženo tudi pri vrsti *Edraianthus serpyllifolius* (Surina in sod., 2011) in nekaterih živalskih vrstah na tem območju (Kryštufek in sod., 2007; Sotiropoulos in sod., 2007). Tako disjunktnost populacij na jugovzhodu (razen populacije s Prenja, Bosna in Hercegovina) izvira že iz časa poledenitev in med ali po zadnji poledenitvi najverjetneje ni prišlo do sekundarnega stika populacij na tem območju, razen morda do stika populacije 8 iz Velike Kalice (Durmitor, Črna Gora) in populacije 6 z Volujaka (Bosna in Hercegovina), ki sta glede na analizo profilov AFLP s programom STRUCTURE uvrščeni v isti genetski sklad. Divergenca populacije iz Prenja (Bosna in Hercegovina) je starejša in morda lahko izvira iz časa pred poledenitvami, čeprav je z uporabljenimi metodami čas divergence populacij nemogoče opredeliti.



Slika 17: Genetska struktura dinarske smiljke na osnovi Bayesovega združevanja profilov AFLP pri K=2 za SZ skupino in K=5 za JV skupino (tortni diagrami; za natančnejšo razlago glej sliko 12) in na geografsko ozadje naneseo koreninjeno statistično omrežje največje varčnosti haplotipov plastidne DNA dinarske smiljke (bele črte; za natančnejšo razlago glej sliko 11).

V omrežju haplotipov plastidne DNA je najpogostejši haplotip z jugovzhoda povezan tudi s haplotipom s Snežnika (Slovenija). Razlikujeta se le v prisotnosti enega indela. Haplotip s Snežnika je od haplotipa z Dinare (Hrvaška) ločen z dvema korakoma. Verjetno je, da se je izolacija populacije s Snežnika (Slovenija) zgodila kmalu za ločitvijo severozahodne in jugovzhodne skupine. Zaradi majhne učinkovite velikosti populacije, je tudi pogostost mutacij v taki populaciji manjša, kar lahko razloži izvirnejši haplotip, ohranjen v tej populaciji. Dolgo časa trajajočo izolacijo te populacije podpira tudi visok indeks redkosti alelov (AFLP) ter v šok a statističn a p odpora *splita*, ki na diagramu NeighbourNet za vmesnik ITS jedrnega ribosomalnega cistrona ločuje to populacijo od ostalih populacij dinarske smiljke. Visoka genetska raznolikost (profilov AFLP) populacije z Dinare (Hrvaška) lahko nakazuje obstoj glacialnega refugija v času zadnje poledenitve na območju med Velebitom in Dinaro (Slika 14c). V času otoplitve se je vrsta iz refugija najverjetneje z disperzijo razširila na Dinaro, na južni del Velebita (populacija 3 z Vaganskega vrha ima isti haplotip plastidne DNA kot populacija z Dinare) in dalje proti

severu Velebita (haplotip populacije 2 z Malovana je v omrežju z enim korakom ločen od haplotipa z Dinare in Vaganskega vrha).

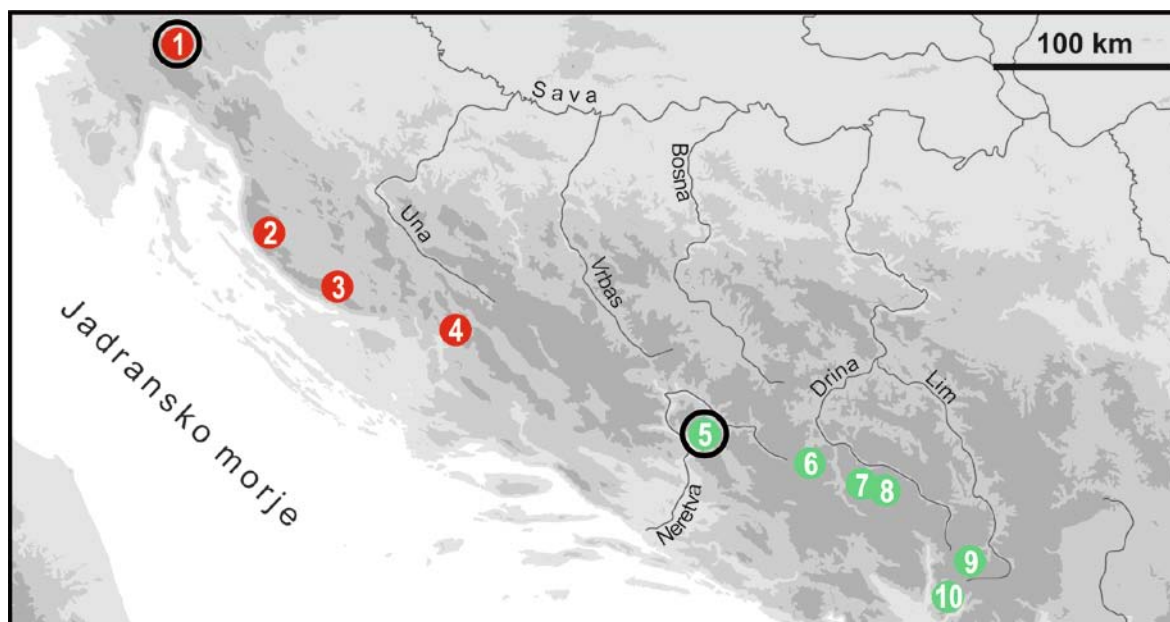
Večjo heterogenost haplotipov plastidne DNA v severozahodni skupini dinarske smiljke (v primerjavi z jugovzhodno) lahko razložimo v kontekstu zgodovine obeh linij. Nedavne simulacijske študije evolucije med disperzijo s povečevanjem areala (Excoffier in sod., 2009) poročajo o povečani mutacijski stopnji na fronti disperzijskega vala (deskanje mutacij), kar bi lahko, glede na predlagano hipotezo, razložilo večjo heterogenost haplotipov plastidne DNA v severozahodni skupini populacij dinarske smiljke, kjer je disjunkten areal vrste verjetno vsaj v določeni meri rezultat disperzije po zadnji poledenitvi, medtem ko je v jugovzhodni skupini najverjetneje rezultat vikariance, ki izvira iz časa poledenitev. Prav tako ni zanemarljivo, da je populacija 2 (Malovan, Velebit) zelo majhna – na terenu so uspeli najti le 4 osebk: zaradi majhne efektivne velikosti populacije je verjetno, da je v njej hitro prišlo do fiksacije novega haplotipa.

Korenina omrežja haplotipov plastidne DNA dinarske smiljke, določena z vključitvijo vrst *C. hekuravense*, *C. carinthiacum* in *C. uniflorum* v analizo, izhaja iz najpogostejšega haplotipa iz jugovzhoda in s tem podpira ločitev severozahodne in jugovzhodne skupine populacij (Slika 17).

4.4 Izhodišča za varstvo dinarske smiljke

Znotraj dinarske smiljke smo z molekularnimi orodji razkrili obstoj dveh močno divergentnih evlucijskih linij. Ti se med sabo razlikujeta celo v velikosti genoma, zato bi bilo treba s poskusi križanja ugotoviti ali še vedno pripadata isti biološki vrsti. V vsakem primeru je divergenca med severozahodno in jugovzhodno skupino populacij znotraj dinarske smiljke gotovo zadosten temelj za prepoznavanje dveh evlucijsko pomembnih enot (*evolutionarily significant units* – ESUs) znotraj vrste (Fraser in Bernatchez, 2001). Obstoj, prepoznavanje in ohranjanje teh enot bi v prihodnosti morali biti temelj načrtovanja varstvenih strategij za ohranjanje dinarske smiljke.

Znotraj predlaganih dveh evolucijsko pomembnih enot pa nikakor ni zanemarljiva niti divergenca najsevernejših populacij obeh skupin (v SZ skupini populacije s Snežnika, Slovenija in v JV skupini populacije iz Prenja, Bosna in Hercegovina). Divergenca teh dveh populacij od ostalih populacij pripadajoče skupine so razkrili vsi uporabljeni molekularni označevalci, zato bi bilo morda smiselno posebno varstveno pozornost nameniti tudi tema populacijama. Populacija s Snežnika je kot edina populacija dinarske smiljke v Sloveniji že deležna posebnega varstvenega statusa v okviru varstvenega omrežja Natura 2000. V prihodnosti lahko pričakujemo priključitev drugih držav, v katerih je prisotna dinarska smiljka, k Evropski uniji, s tem pa tudi njihovo zavezo o ohranjanju vrst s priloge II Direktive o habitatih, torej tudi dinarske smiljke.



Slika 18: Evolucijsko pomembni enoti dinarske smiljke – severozahodna enota je označena z rdečo, jugovzhodna pa z zeleno barvo; obkroženi populaciji 1 in 5 sta divergentni znotraj pripadajočih enot.

Dinarska smiljka je rastlina visokogorskih melišč in skalnih razpok; po naših opažanjih s terena je prisotna na severnih, senčnih in hladnih pobočjih. Večina nahajališč vrste je relativno težko dostopnih, zato se zdi neposredno ogrožanje vrste z npr. visokogorskim turizmom za enkrat zanemarljivo. V prihodnosti se lahko, z razvojem gospodarstva in turizma v državah zahodnega Balkana, situacija spremeni, zato je gotovo treba zagotoviti posebno varstvo te redke vrste.

Zadnje študije rastlinske diverzitete na več gorskih pobočjih po vsem svetu (Gottfried in sod., 2012) kažejo, da je vpliv globalnega segrevanja na vrstno sestavo na takih območjih že opazen. Gre za učinek t. i. termofilizacije, ko se v visokogorskih habitatih opazno zmanjšuje delež hladnoljubnih rastlin, povečuje pa delež bolj toploljubnih. Nadaljevanje opisanega procesa lahko v prihodnosti morda vodi do izumrtja rastlin, ki so danes vezane na hladnejše visokogorske habitate. Tudi dinarska smiljka je vrsta, vezana na take habitate in zato se zdi največja grožnja za njen obstoj v danih okoliščinah ravno učinek globalnega segrevanja ozračja. Opisan pojav verjetno predstavlja največjo grožnjo populaciji s Snežnika, ki raste na zelo omejenem območju, v njeni bližini pa ni nobenega primernega nadomestnega habitata. Introdukcijska vrsta z najbližjih južno ležečih populacij na Velebitu, ki jo kot eno izmed opcij predlagata Bačić in Jogan (2004), se ne zdi ustrezna, saj predstavlja populacija s Snežnika divergentno evlucijsko linijo. V primeru izginotja vrste na Snežniku se zaradi odsotnosti primernega habitata reintrodukcija vrste (četudi iz semen rastlin iste populacije) ne zdi smiselna.

Kljub temu da nam daje študija genetske pestrosti dinarske smiljke obsežen vpogled v »zgodovino vrste«, lahko preprosto in nepresenetljivo ugotovimo, da je ena izmed najpomembnejših varstvenih usmeritev za ohranjanje vrste prav gotovo osveščanje človeštva o omejenosti virov in uničujočih vplivih globalnega segrevanja, ki so posledica destruktivnega odnosa človeštva do okolja in nezavedanja pomena krhkosti ravnovesja povezav v ekosistemu.

V okviru diplomskega dela sem potrdil vse zastavljene delovne hipoteze (poglavje 1.7), razen hipoteze (2), saj opravljene filogenetske analize niso jasno nakazale sorodstvenih odnosov med analiziranimi vrstami.

5 SKLEPI

Dinarska smiljka predstavlja monofiletsko skupino, če upoštevamo dejstvo, da takson, ki ga je Javorka (1921) opisal kot *Cerastium hekuravense*, res predstavlja samostojno vrsto in ne le varietete dinarske smiljke, kot v nedavni taksonomski reviziji rodu *Cerastium* na Balkanu predlaga Niketić (1999).

Obstoječa znotrajvrstna delitev dinarske smiljke (Niketić, 2004) se je izkazala za neustrezno, saj nima niti filogenetske niti geografske niti ekološke podlage.

Znotraj dinarske smiljke obstajata dve močno divergentni evolucijski liniji (severozahodna in jugovzhodna skupina), ki se razlikujeta tudi v velikosti genoma. Filogeografska ločnica sovпада z dolino reke Neretve.

Genetska strukturiranost znotraj severozahodne skupine je najverjetneje posledica dolgo časa trajajoče izolacije populacije s Snežnika (Slovenija) in preživetja vrste v dveh glacialnih refugijih (Snežnik, Velebit-Dinara), kasnejše razširitve areala iz Velebitsko-Dinarskega refugija ter njegove fragmentacije ob nadaljnji otoplitvi.

Genetska struktura znotraj jugovzhodne skupine je ali (1) posledica preživetja vrste v več glacialnih refugijih ali pa (2) opažena struktura izvira iz časa po poledenitvah, ko je prišlo, zaradi migracije vrste v hladna visokogorska rastišča do fragmentacije areala in izolacije populacij. Divergenca najsevernejše populacije skupine (Prenj, BiH) je starejšega izvora.

S poskusi križanja bi bilo treba ugotoviti, ali dve divergentni evolucijski liniji (SZ in JV) morda lahko predstavljata samostojni vrsti. Vsekakor pa predstavljata evolucijsko pomembni enoti, katerih prepoznavanje in ohranjanje bi moralo predstavljati temelj prihodnjih varstvenih strategij vrste.

6 POVZETEK

Z molekularnimi pristopi, ki jih uporabljamo v filogeografiji in varstveni genetiki, lahko preučujemo genetsko strukturiranost znotraj vrst, zaznavamo zgodovinske procese, ki so to strukturo oblikovali, ter prepoznavamo evlucijsko pomembne linije, ki so bistvenega pomena za načrtovanje naravovarstvenih strategij. Filogeografske in varstveno genetske študije rastlinskih vrst na območju Balkanskega polotoka so relativno redke, kljub temu da ima to območje v evropskem merilu velik potencial in pomen pri varovanju in ohranjanju narave. Podrobne študije genetske raznolikosti taksonov v tej regiji so pomembne za vzpostavljanje varstvenih prioritet, območje zahodnega Balkana pa je pomembno tudi za razumevanje diverzitete in zgodovine mediteranske flore.

Dinarska smiljka (*Cerastium dinaricum*) je endemna rastlinska vrsta zahodnega Balkana, ki se pojavlja od Slovenije na severozahodu (Snežnik) do Črne Gore na jugovzhodu (Žijevo). Njen areal predstavlja nekaj disjunktnih populacij, ki so druga od druge pogosto zelo oddaljene. Je vrsta melišč in skalnih razpok na karbonatni podlagi v subalpskem pasu. Uvrščena je na prilogo II Direktive o habitatih (NATURA 2000), kar pomeni, da mora vsaka država članica Evropske unije zagotoviti ugodno stanje ohranjenosti te vrste, tako da določi območja, v katerih jo bo ohranjala.

Z uporabo različnih molekulskih označevalcev (polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov – AFLP; zaporedje *ndhJ-trnT* plastidne DNA in vmesnik ITS jedrnega ribosomalnega cistrona) ter meritvami relativne velikosti genoma sem skušal preveriti ali je vrsta znotraj rodu monofiletska, opisati populacijsko genetsko strukturo dinarske smiljke, podati razlago te strukture ter na podlagi rezultatov določiti evlucijsko pomembne enote (*evolutionarily significant units* - ESUs) znotraj vrste.

V vzorčenje je bilo zajetih 4-30 osebkov iz vsake od desetih vzorčenih populacij dinarske smiljke, razporejenih vzdolž celotnega areala vrste. Pridobil sem profile AFLP 4-18 osebkov na populacijo, zaporedja *ndhJ-trnT* plastidne DNA 3-6 osebkov na populacijo ter zaporedja vmesnika ITS jedrnega ribosomalnega cistrona 1 osebka na populacijo. Relativno velikost genoma sem določil s pomočjo precizne citometrije z DAPI-jem

obarvanih izoliranih jeder. Profile AFLP sem analiziral s pomočjo Bayesovega pristopa združevanja (STRUCTURE), izgradnjo distančnega omrežja (NeighbourNet), analizo kovariance (AMOVA, PopulationGraphs – v okviru teorije grafov) in na njihovi podlagi izračunal dva indeksa genetske raznolikosti (Nei-jev indeks genetske raznolikosti in indeks redkosti alelov). Zaporedja plastidne DNA sem uporabil za izgradnjo statističnega omrežja največje varčnosti haplotipov dinarske smiljke. V filogenetske analize (metoda največje varčnosti in NeighbourNet) zaporedja plastidne DNA in vmesnika ITS jedrnega ribosomalnega cistrona sem vključil tudi zaporedja drugih vrst rodu *Cerastium*, nabranih na Balkanu.

Rezultati filogenetskih analiz, analize profilov AFLP in meritve relativne velikosti genoma kažejo, da je populacija z nahajališča Maja Hekurave (Prokletije, Albanija) v resnici samostojna vrsta – *C. hekuravense*, kot jo je prvotno opisal Javorka (1921), in ne le varieteta dinarske smiljke, kot v reviziji rodu *Cerastium* na Balkanu predlaga Niketić (1999). Dinarska smiljka predstavlja (brez *C. hekuravense*) monofiletsko skupino znotraj predstavnikov rodu *Cerastium* na Balkanu.

Rezultati meritev relativne velikosti genoma dinarske smiljke jasno kažejo bimodalno razporeditev, pri čemer en vrh pripada severozahodni (SZ), drugi pa jugovzhodni (JV) skupini populacij. Razlika med skupinama je bila potrjena s sočasno meritvijo relativne velikosti genoma dveh osebkov iz različnih skupin. Enako filogeografsko ločitev močno podpirajo tudi rezultati analize profilov AFLP, ki poleg tega razkrivajo tudi genetsko podstrukturo znotraj teh dveh skupin. Pri obeh je opazna diferenciacija najsevernejše izmed populacij v pripadajoči skupini (Snežnik, Slovenija v SZ skupini in Prenj, BIH v JV skupini). Analize s programom STRUCTURE nakazujejo še močnejšo genetsko strukturiranost znotraj JV skupine. Znotraj dinarske smiljke sem z analizami zaznal 5 haplotipov plastidne DNA. Najpogostejši haplotip se pojavlja v petih populacijah na jugovzhodu, populaciji 3 (Vaganski vrh, Velebit) in 4 (Dinara) sta opredeljeni z istim haplotipom, za vsako od ostalih treh populacij pa je značilen svoj haplotip. Analize vmesnika ITS jedrnega ribosomalnega cistrona ne kažejo jasne genetske strukture, le diagram NeighbourNet za to zaporedje nakazuje na divergenco najsevernejših populacij iz vsake od skupin (Snežnik, Prenj).

Močna filogeografska ločitev, ki jo podpirata analiza profilov AFLP in meritve relativne velikosti genoma, sovпада z dolino reke Neretve, ki ji več študij rastlinskih in živalskih vrst pripisuje pomen močne biogeografske bariere na zahodnem Balkanu. Sinteza rezultatov različnih molekularskih označevalcev nakazuje, da je disjunktna razporeditev vrste znotraj severozahodne skupine najverjetneje rezultat preživetja v dveh glacialnih refugijih (Snežnik, Velebit-Dinara) in kasnejše širitve areala iz refugija na območju med Velebitom in Dinaro, ki pa mu je sledila fragmentacija areala, zaradi migracije vrste v višje nadmorske lege. Disjunktna razporeditev znotraj jugovzhodne skupine je najverjetneje rezultat preživetja v več glacialnih refugijih ali pa je opažen vzorec posledica izolacije populacij po poledenitvah. Znotrajvrstna variabilnost velikosti genoma je lahko pokazatelj taksonomske heterogenosti ali speciacije v teku, zato bi bilo treba s poskusi križanja med osebki iz severozahodne in jugovzhodne skupine ugotoviti, ali ti še vedno spadajo v isto biološko vrsto. Vsekakor pa dve divergentni evolucijski liniji predstavljata evolucijsko pomembni enoti, njuno prepoznavanje in varstvo pa pomembno izhodišče za načrtovanje varstvenih strategij vrste v prihodnosti.

7 VIRI

- Alvarez I., Wendel J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417–434
- Arrigo N., Tuszynski J. W., Ehrich D., Gerdes T., Alvarez N. 2009. Evaluating the impact of scoring parameters on the structure of intra-specific genetic variation using RawGeno, an R package for automating AFLP scoring. *BMC Bioinformatics* 10: 33
- Ascherson P., Kanitz A. 1877. *Catalogus Cormophytorum Et Anthophytorum: Serbiae, Bosniae, Hercegovinae, Montis Scodri, Albaniae – Hucusque Cognitorum* (compilaverunt). Claudiopoli, Typ. Nic. K. Papp.: 108 str.
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, MA, Harvard University Press: 447 str.
- Bačič T., Jogan N. 2004. *Cerastium dinaricum* G. Beck & Szysz. – dinarska smiljka V: NATURA 2000 v Sloveniji. Rastline. Čušin B., Jogan N., Leskovar I., Kaligarič M., Surina B. (ur.). Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU: 67-70
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., Donoghue, M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82, 247–277
- Barnaud A., Houliston G. J. 2010. Population genetics of the threatened tree daisy *Olearia gardneri* (Asteraceae), conservation of a critically endangered species. *Conservation Genetics* 11:1515–1522
- Beardsley P. M., Yen A., Olmstead R. G. 2003. AFLP phylogeny of *Mimulus* section *Erythranthe* and the evolution of hummingbird pollination. *Evolution* 57(6): 1397-410

- Beck G. 1906. Flora Bosne, Hercegovine i Novipazarskog Sandžaka II. (3) dio. Glasnik Zemaljskoga Muzeja Bosne i Hercegovine 18(4): 469-496
- Beck G., Szyszyłowich I. 1888. Plantae a Dre Ign. Szyszyłowich in itinere per Cernagoram et in Albania adjacente anno 1886 lectae. Krakow, Universitatis Jagellonicae: 85 str.
- Bonin A., Bellemain E., Eidesen P. B., Popanon F., Brochmann C., Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Molecular Ecology* 13:3261–3273
- Bonin A., Nicole F., Pompanon F., Miaud C., Taberlet P. 2007. Population Adaptive Index: a New Method to Help Measure Intraspecific Genetic Diversity and Prioritize Populations for Conservation. *Conservation Biology* 21, 3: 697-708
- Bryant D., Moulton V. 2004. Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Molecular Biology and Evolution* 21(2):255–265
- Brysting A. K., Oxelman B., Huber K. T., Moulton V., Brochmann C. 2007. Untangling Complex Histories of Genome Mergings in High Polyploids. *Systematic biology*, 56, 3: 467-476
- Clement M., Posada D., Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660
- Comes P.H., Kadereit J.W. 1998. The effects of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* 3: 432–438
- Degen A., Janchen E., Watzl B. 1908. Ein Beitrag zur Kenntnis der Flora der Dinarischen Alpen. *Österreichische botanische Zeitschrift* 58 (4): 161–174

Despres L., Gielly L., Redoutet B., Taberlet P. 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically ~~div~~fixed plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 185-196

DIREKTIVA SVETA 92/43/EGS z dne 21. maja 1992 o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst. 2007. Ur. l. EU 1992L0043 —SL — 01.01.2007 — 005.001
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1992L0043:20070101:SL:PDF> (18. apr. 2011)

DNeasy Plant Handbook. 2006. Qiagen: 23 str.

Doležel J., Greilhuber J., Suda J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2(9): 2233-2244

Dostálek T. Münzbergová Z. Plačková I. 2010. Genetic diversity and its effect on fitness in an endangered plant species, *Dracocephalum austriacum* L. *Conservation Genetics*, 11: 773-783

Drummond A. J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M., Heled J., Kearse M., Markowitz S., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T., Wilson A. 2010. Geneious v5.5 <http://www.geneious.com> (10. mar 2012)

Dyer R.J. 2009. GeneticStudio: a suite of programs for spatial analysis of genetic-marker data. *Molecular Ecology Resources*, 9: 110–113

Dyer R. J., Nason J. D. 2004. Population graphs: the graph theoretic shape of genetic structure. *Molecular Ecology*, 13: 1713–1727

Duchesne P., Bernatchez L. 2002. AFLPOP: A computer program for simulated and real population allocation based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 3: 380-383

- Ehrich, D. 2006. AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data. *Molecular Ecology Notes* 6: 603-604
- Eidesen P. B., Alsos I. G., Popp M., Stensrud Ø., Suda J., Brochmann C. 2007. Nuclear vs. plastid data: complex Pleistocene history of a circumpolar key species. *Molecular Ecology* 16: 3902-3925
- Enciklopedija Slovenije II, Ce-Ed. 1988. Ljubljana, Mladinska knjiga: 416 str.
- Excoffier L., Smouse P., Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50
- Excoffier L., Foll M., Petit R. J. 2009. Genetic Consequences of Range Expansions. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 481–501
- Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578
- Felsenstein J. 1989. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164–166.
- Forest F., Grenyer R., Rouget M., Davies T. J., Cowling R. M., Faith D. P., Balmford A., Manning J. C., Proches S., van der Bank M., Reeves G., Hedderson T. A. J., Savolainen V. 2007. Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature* 445: 757–760

- Frajman B., Oxelman B. 2007. Reticulate phylogenetics and phylogeographical structure of *Heliosperma* (Sileneae, Caryophyllaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43:140–155
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe, D. A. 2009. Introduction to conservation genetics. 2nd edition. Cambridge, Cambridge University Press: 642 str.
http://books.google.si/books?id=vLZKnsCk89wC&dq=frankham+conservation+genetics&hl=sl&source=gbs_navlinks_s (30. maj 2012)
- Fraser D. J., Bernatchez L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular ecology*, 10: 2741-2752
- Freeland J. R., Kirk H., Petersen S. D. 2011. *Molecular Ecology*. 2nd edition. Chichester, Wiley-Blackwell: 449 str.
- Garrick R., Nason J., Meadows C., Dyer R. 2009. Not just vicariance: phylogeography of a Sonoran Desert euphorb indicates a major role of range expansion along the Baja peninsula. *Molecular Ecology* 18: 1916–1931
- Greilhuber, J., Ebert I. 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome* 37: 646–655
- Google Inc. 2012. Google Earth 6.2.1.6014 (beta) [programska oprema].
<http://www.google.com/earth/index.html> (27. marec 2012)
- Gregory T. R. 2005. The C-value Enigma in Plants and Animals: A Review of Parallels and an Appeal for Partnership. *Annals of Botany* 95: 133–146
- Gottfried M., Pauli H., Futschik A. et al. 2012. Continent-wide response of mountain vegetation to climate change. *Nature Climate Change* 2: 111–115

- Gugerli F., Englisch T., Niklfeld H., Tribsch A., Mirek Z., Ronikier M., Zimmermann N.E., Holderegger R., Taberlet P., IntraBioDiv Consortium. 2008. Relationships among levels of biodiversity and the relevance of intraspecific diversity in conservation – a project synopsis. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 10: 259–281
- Hargreaves S., Maxted N., Hirano R., Abberton M., Skøt L., Ford-Lloyd B. V. Islands as refugia of *Trifolium repens* genetic diversity. *Conservation Genetics* 11:1317–1326
- Hayek A. 1927. *Prodromus Florae Peninsulae balcanicae*. Band 1. Pteridophyta, Gymnospermae, Dicotyledoneae (Apetale et Choripetale), Dahlem bei Berlin, Verlag des Repertoriums: 320 str.
- Henry R. J (urednik). 2006. *Plant Conservation Genetics*. Binghamton, NY, The Haworth Press: 180 str.
http://books.google.si/books?id=or7HzNliM7kC&hl=sl&source=gbs_navlinks_s (30. maj 2012)
- Hewitt G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in pace and time. *Molecular ecology*, 10: 537-549
- Hewitt G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 359: 183–195
- Holsinger K. E. Weir. B. S. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10: 639-650
- Huson D. H., Bryant D. *Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies*. 2006. *Molecular Bioogy and Evoution*. 23(2): 254-267

- Jacquemyn H., Isabel Roldán-Ruiz I., Honnay O. 2010. Evidence for demographic bottlenecks and limited gene flow leading to low genetic diversity in a rare thistle. *Conservation genetics* 11:1979–1987
- Jalas J. 1993. *Cerastium* L. (perennial species). V: *Flora Europaea* 1. Tutin T. G., Burges N. A., Chater O. A., Edmondson J. R., Heywood V. H., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A. (ur.). Cambridge, University Press: 164-171
- Javorka S. 1921. Uj adatok Albániá florájához (Novitates florae Albaniae). *Botanikai Közlemények* 19: 17-30
- Karkkainen K., Løe G., Ågren J. 2004. Population structure in *Arabidopsis lyrata*: evidence for divergent selection on trichome production. *Evolution* 58 (12): . 2831–2836
- Koopman M. M., Carstens B. C. 2010. Conservation genetic inferences in the carnivorous pitcher plant *Sarracenia alata* (Sarraceniaceae). *Conservation Genetics* 11:2027–2038
- Kron P., Suda J., Husband B. C. 2007. Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 847-76
- Kryštufek B., Buzan E.V., Hutchinson W.F., Hänfling B. 2007. Phylogeography of the rare Balkan endemic Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, reveals strong differentiation within the western Balkan Peninsula. *Molecular Ecology* 16:1221–1232
- Kryštufek, B., Reed, J.M., 2004. Pattern and process in Balkan biodiversity – an overview V: *Balkan Biodiversity – Pattern and Process in the European Hotspot*. Griffiths H.I., Kryštufek B., Reed J.M. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.: 1-8

- Kučera J., Tremetsberger K., Vojta J., Marhold K. 2008. Molecular study of the *Cardamine maritima* group (Brassicaceae) from the Balkan and Apennine Peninsulas based on amplified fragment length polymorphism. *Plant Systematics and Evolution* 275:193–207
- Kuo D. C., Lin C. C., Ho K. C., Cheng Y. P., Hwang S. Y., Lin T. P. 2010. Two genetic divergence centers revealed by chloroplastic DNA variation in populations of *Cinnamomum kanehirae* Hay. *Conservation Genetics* 11:803–812
- Lomolino M. V., Riddle B. R., Whittaker R. J., Brown J. H. 2010. *Biogeography*. 4th edition. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.: 878 str.
- Marchelli P., Baier C., Mengel C., Ziegenhagen B., Gallo L. A. 2010. Biogeographic history of the threatened species *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch and implications for conservation: a case study with organelle DNA markers. *Conservation Genetics* 11: 951–963
- Mijnsbrugge K. V., De Cock K., Cox K., Breyne P. 2010. Conservation measures for *Rosa arvensis* Huds. in Flanders (Belgium) based on congruent genetic and phenotypic population differentiation. *Conservation Genetics* 11:2243–2253
- Moritz, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* 51: 238–254
- Murray B. G. 2005. When does Intraspecific C-value Variation become Taxonomically Significant? *Annals of Botany* 95: 119–125
- Neel M.C., Cummings M.P. 2003. Effectiveness of conservation targets in capturing genetic diversity. *Conservation Biology*, 17: 219–229

- Nei M., Li W.-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 5269–5273
- Niketić M. 2004. Geobotanička studija podsekcije *Cerastium* roda *Cerastium* L. (Caryophyllaceae) na Balkanskem poluostrvu. Magistrska teza. Beograd, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet: 143 str.
- Niketić M. 2010. »Seznam pričakovanih nahajališč dinarske smiljke« Beograd, Srbija (osebni vir, julij 2010)
- Nordborg M., Hu T.T., Ishino Y., Jhaveri J., Toomajian C., Zheng H. G., Bakker E., Calabrese P., Gladstone J., Goyal R., Jakobsson M., Kim S., Morozov Y., Padhukasahasram B., Plagnol V., Rosenberg N. A., Shah C., Wall J.D., Wang J., Zhao K.Y., Kalbfleisch T., Schulz V., Kreitman M., Bergelson J. 2005. The pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology* 3: 1289–1299
- Pančić J. 1875. *Elenchus plantarum vascularium quae eastate a. 1873 in Crna Gora legit* Dr. J. Pančić. Belgradi, Societas Erudita Serbica: 106 str.
- Pax F., Hoffmann K. 1934. *Caryophyllaceae V: Die Natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten, insbesondere den Nutzpflanzen*. Engler A., Harms H. (ur.). Leipzig, Verlag von Wilhelm Engelmann: 275-364
- Pearse D. E., Crandall K. A. 2004. Beyond F_{ST} : Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, 5: 585-602
- Petit R. J., el Mousadik A., Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844–855
- Petit R.J., Aguinalde I., de Beaulieu J.-L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Müller-Starck G., Demesure-

- Musch B., Palme A., Martin J.P., Rendell S., Vendramin G.G. 2003. Glacial Refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563–1565
- Petit R. J., Duminil J., Fineschi S., Hampe A., Salvini D., Vendramin G. G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689–701
- Petit R. J., Vendramin G.G. 2007. Plant phylogeography based on organelle genes: an introduction V: Phylogeography of Southern European Refugia. Weiss S., Ferrand N. (ur.). Dordrecht, Springer: 386 str.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959
- Podnar M., Mayer W. Tvrtković N. 2004 Mitochondrial phylogeography of the Dalmatian wall lizard, *Podarcis melisellensis* (Lacertidae). *Organisms, Diversity and Evolution* 4: 307–317
- Polunin O. 1997. *Flowers of Greece and the Balkans*. Oxford-New York-Tokyo, Oxford University Press.: 592. str.
- Popp M., Oxelman B. 2001. Inferring the history of the polyploid *Silene aegaea* (Caryophyllaceae) using plastid and homoeologous nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20:474-481
- Prinz K., Weising K., Hensen I. 2010. Genetic structure of coastal and inland populations of *Spergularia media* (L.) C. Presl (Caryophyllaceae) in Central Europe. *Conservation Genetics* 11:2169–2177
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
<http://www.R-project.org> (13. mar 2012)

- Reed J. M., Kryštufek B., Eastwood W. J., 2004. The physical geography of the Balkans and nomenclature of place names V: Balkan Biodiversity – Pattern and Process in the European Hotspot. Griffiths H.I., Kryštufek B., Reed J.M. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.: 9–22
- Rdeči seznam praprotnic in semen. V: Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. Ur. l. RS št. 82, 24. 9. 2002
- Rosenberg N. A., Pritchard J. K., Weber J. L., Cann H. M., Kidd K. K., Zhivotovsky L. A., Feldman M. W., 2002. The genetic structure of human populations. *Science* 298: 2381–2385
- Scheen A., Brochmann C., Brysting A. K., Elven R., Morris A., Soltis D. A., Soltis P. S., Albert V. A. 2004. Northern hemisphere biogeography of *Cerastium* (Caryophyllaceae): insights from phylogenetic analysis of noncoding plastid nucleotide sequences. *American Journal of Botany*, 91, 6: 943-952
- Schirone B., Ferreira R. C., Vessella F., Schirone A., Piredda R., Simeone M. C. 2010. *Taxus baccata* in the Azores: a relict form at risk of imminent extinction. *Biodiversity and Conservation* 19: 1547–1565
- Schönswetter P., Tribsch A. 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon* 54: 725–732
- Shanjani P. S., Vendramin G. G., Calagari M. 2010. Genetic diversity and differentiation of *Fagus orientalis* Lipsky in Hyrcanian forests revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Conservation genetics* 11:2321–2331
- Shaw J., Lickey E., Beck J. T., Farmer S. B., Liu W., Miller J., Siripun K. C., Winder C. T., Schilling E. E., Small R. L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142–166

- Shaw J., Lickey E. B., Schilling E. E., Small R. L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94 (3): 275–288
- Skoberne P. 2004. Kaj je Natura 2000? V: NATURA 2000 v Sloveniji. Rastline. Čušin B., Jogan N., Leskovar I., Kaligarič M., Surina B. (ur.). Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU: 15
- Smith R. J., Waldren S. 2010. Patterns of genetic variation in *Colchicum autumnale* L. and its conservation status in Ireland: a broader perspective on local plant conservation. *Conservation Genetics* 11:1351–1361
- Sotiropoulos K., Eleftherakos K., Dzukic G., Kalezic M.L., Legakis A., Polymeni R.M. 2007. Phylogeny and biogeography of the alpine newt *Mesotriton alpestris* (Salamandridae, Caudata), inferred from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45(1): 211–226
- Suda J., Trávníček P. 2006. Estimation of Relative Nuclear DNA Content in Dehydrated Plant Tissues by Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry* 7.30.1-7.30.14
- Sun Y., Skinner D. Z., Liang G. H., Hulbert S. H. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32
- Surina B., Schönswetter P., Schneeweiss G. M. 2011. Quaternary range dynamics of ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, Campanulaceae) within the Balkan refugium. *Journal of Biogeography*: 38 (7): 1381-1393
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109
- Trinajstić I. 1967. Rod *Cerastium* L. V: Analitička flora Jugoslavije. Svezak prvi. Broj 4. Trinajstić I. (ur.). Zagreb, Sveučilnišna naklada Liber: 555-581
- Turrill, W.B., 1929. The Plantlife of the Balkan peninsula. A Phytogeographical Study. Oxford, Clarendon Press: 22 str.
- Tvrtković N. Veen P. (ur.) 2006. The Dinaric Alps Rare Habitats and Species Conservation Project in Croatia. Zagreb, Hrvatski prirodoslovni muzej, (CNHM), Royal Dutch Society for Nature Conservation (KNNV): 67 str.
- Tzedakis P.C. 2004. The Balkan as prime glacial refugial territory of European temperate trees. V: *Balkan Biodiversity – Pattern and Process in the European Hotspot*. Griffiths H.I., Kryštufek B., Reed J.M. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.: 49-68
- Van de Peer Y., De Wachter R. 1997. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. *Computer Applications in the Biosciences* 13: 227–230
- Vos, P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M, van de Lee T., Hornes M., Frijters A, Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414
- Winkler M., Tribsch A., Paun O., Englisch Th., Intrabiodiv Consortium, Schönswetter P. 2010. Pleistocene Distribution Range Shifts Were Accompanied By Breeding System Divergence Within *Hornungia Alpina* (Brassicaceae) In The Alps. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 571–582

Wraber T. 1995. *Cerastium dinaricum* G. Beck & Szysz. – a new species in the flora of Slovenia. *Hladnikia*, 4: 11-18

ZAHVALA

Hvala mentorju doc. dr. Božu Frajmanu za vse ideje, napotke in usmeritve tekom izdelave mojega diplomskega dela, za kritične popravke besedila in prijateljsko podporo. Velika zahvala tudi prof. dr. Petru Schönswetteru za vso posredovano znanje in ideje.

Hvala recenzentki doc. dr. Simoni Strgulc Krajšek in predsednici komisije za zagovor diplomskega dela doc. dr. Martini Bačič za hiter in temeljit pregled diplomskega dela.

Marianne Magauer in Danieli Pirkebner hvala za vso pomoč v laboratoriju in izven njega za zanimivo preživete urice v Innsbrucku.

Manueli Winkler za izvedbo sekvenciranja poslanih vzorcev.

Ivani Rešetnik, Sandru Bogdanoviću, Antunu Alegru in Marjanu Niketiću zahvala za nabrane vzorce.

Vsem sošolcem in prijateljem, ki so naredili študijska leta še bolj zanimiva in zabavna.

Domačim za vso podporo in vzpodbudo tekom študija in prej.