

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Klavdija BOGATAJ

**ANALIZA GENETSKE ČISTOSTI POPULACIJ AVTOHTONE
POTOČNE POSTRVI (*SALMO TRUTTA*) V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GENETIC ANALYSIS OF NATIVE BROWN TROUT (*SALMO
TRUTTA*) POPULATIONS IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Z diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstva-zootehnike. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Poskus je bil opravljen v genetskem laboratoriju Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Simono Sušnik Bajec, za somentorja pa dr. Aleša Snoja.

Recenzent: prof. dr. Jure Pohar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Simona SUŠNIK BAJEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Aleš SNOJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Jure POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana 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.

Klavdija Bogataj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 597.2/.5:575(043.2)=163.6
KG molekularna biologija/molekularna genetika/ribe/*Salmo trutta*/potočna postrvi/molekularni označevalci/mtDNK/mikrosateliti
KK AGRIS L10/8100
AV BOGATAJ, Klavdija
SA SUŠNIK BAJEC, Simona (mentorica)/SNOJ, Aleš (somentor)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2010
IN ANALIZA GENETSKE ČISTOSTI POPULACIJ AVTOHTONE POTOČNE
POSTRVI (*SALMO TRUTTA*) V SLOVENIJI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 61 str., 6 pregl., 28 sl., 62 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V Sloveniji za podporno vlaganje s potočnimi postrvimi (*Salmo trutta*) že več desetletij uporabljajo domesticirane neavtohtone potočne postrvi atlantske filogenetske linije. Te se uspešno križajo z avtohtonimi potočnicami donavske filogenetske linije, katerih genetska identiteta in fizični obstoj postajata zaradi tega ogrožena. Da bi identificirali genetsko čiste vire avtohtone potočnice in ocenili njeno splošno »onesnaženost« z neavtohtonimi geni, smo preučevali genetsko strukturo 52 populacij potočne postrvi v savskem in dravskem porečju v Sloveniji. Analizirali smo mitohondrijsko DNK, dva jedrna gena in pet mikrosatelitnih lokusov ter na osnovi dobljenih podatkov in statističnih analiz (pri tem smo uporabljali programe GENETIX, FSTAT, POPULATIONS in STRUCTURE) ugotovili, da je izmed vseh testiranih populacij le pet takih, ki so genetsko čiste, nadalje tri z zelo visokim avtohtonim genetskim deležem (nad 85 %), medtem ko so bile preostale populacije mešane (pri dveh so skoraj v celoti prevladovali neavtohtonimi geni). Vse preučevane čiste avtohtone populacije - praviloma smo jih našli v odročnih in izoliranih zgornjih tokovih -, imajo majhno efektivno velikost in so genetsko zelo homogene, medtem ko so med njimi genetske razlike velike. V mešanih populacijah nismo zasledili populacijskih substruktur, temveč dokaze o vsesplošnem križanju. Dobljeni rezultati kažejo na izrazito kritično situacijo avtohtone potočne postrvi v Sloveniji in za njeno ohranitev narekujejo takojšnje ukrepanje.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 597.2/.5:575(043.2)=163.6
CX molecular biology/molecular genetics/fish/*Salmo trutta*/brown trout/molecular markers/mtDNA/microsatellites
CC AGRIS L10/8100
AU BOGATAJ, Klavdija
AA SUŠNIK BAJEC, Simona (supervisor)/ SNOJ, Aleš (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2010
TI GENETIC ANALYSIS OF NATIVE BROWN TROUT (*SALMO TRUTTA*) POPULATIONS IN SLOVENIA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 61 p., 6 tab., 28 fig., 62 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Domestic brown trout (*Salmo trutta*) originating from Atlantic phylogenetic lineage has been for decades used for the supportive stocking in Slovenia. Stocked fish successfully hybridize with autochthonous brown trout of Danubian phylogenetic lineage. As a consequence, the identity and existence of autochthonous trout in Slovenia have become endangered. In order to identify genetically pure autochthonous brown trout populations and estimate the degree of introgression with Atlantic lineage, we analyzed genetic structure of 52 brown trout populations from Sava and Drava river systems. Genetic analysis was based on mitochondrial DNA, two nuclear coding regions and five microsatellite loci. Results were statistically analyzed with programs GENETIX, FSTAT, POPULATIONS and STRUCTURE. Among 52 tested populations only five were genetically pure. In addition, three populations were characterized with high autochthonous genetic background (>85%). All other populations were mixed; two of them were almost entirely composed of introduced domestic trout. All pure autochthonous populations were found in remote and isolated upper streams and were characterized by low genetic variability and small effective population size. No substructures were found in mixed populations, indicating general hybridization. Our results point to a very critical situation of autochthonous brown trout in Slovenia and dictate immediate actions for its conservation.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 SALMONIDI	2
2.2 POTOČNA POSTRV (<i>SALMO TRUTTA</i>) LINNAEUS 1758	3
2.2.1 Razpoznavne značilnosti	3
2.2.2 Življenjski prostor	4
2.2.3 Molekularno genetska struktura potočne postrvi	4
2.2.4 Problematika vnašanja tujerodnih ribjih vrst	6
2.2.5 Ogroženost potočne postrvi	7
2.2.6 Potočna postrv v Sloveniji	8
2.3 MOLEKULARNI OZNAČEVALCI	9
2.3.1 Mitohondrijska DNK	9
2.3.2 Enonukleotidne spremembe v jedrni DNK - SNP (= single nucleotide polymorphism)	9
2.3.3 Mikrosateliti	10
3 MATERIAL IN METODE	11
3.1 MATERIAL	11
3.2 METODE	16
3.2.1 Izolacija DNK	16
3.2.2 Elektroforeza na agaroznem gelu	16
3.2.3 PCR – Verižna reakcija s polimerazo	17

3.2.4	Restrikcijska analiza (RFLP)	19
3.2.5	Analiza mikrosatelitov	20
3.3	ANALIZA PODATKOV	22
4	REZULTATI	24
4.1	ANALIZA MITOHONDRIJSKE DNK	24
4.2	ANALIZA JEDRNE DNK	25
4.2.1	Somatolaktin	25
4.2.2	LDH	25
4.2.3	Rezultati restrikcijskih analiz	26
4.3	ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV	30
4.3.1	Povprečno število alelov po populacijah, povprečna heterozigotnost populacije in Fis vrednost populacije	30
4.3.2	Število alelov pri posameznih mikrosatelitnih lokusih	32
4.3.3	Filogenetsko drevo	36
4.3.4	Populacijske strukture	37
4.3.5	Sorodstveni odnosi med genetsko čistimi populacijami	41
4.4	FENOTIP POTOČNE POSTRVI V SLOVENIJI	43
5	RAZPRAVA IN SKLEP	46
5.1	RAZPRAVA	46
5.1.1	Analiza mtDNK, gena za somatolaktin in LDH	47
5.1.2	Analiza mikrosatelitov	48
5.1.3	Genetsko zanimive populacije	50
5.1.4	Potočna postrv v Evropskih državah	53
5.1.5	Opazovanje fenotipa	54
5.2	SKLEP	55
6	POVZETEK	56
7	VIRI	57
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Lokacije vzorčenja, število vzorcev na lokacijo ter pripadajoča ribiška družina.....	13
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov	21
Preglednica 3: Rezultati restrikcijskih analiz mtDNK, SL in LDH. »Da« pomeni haplotip oz. alel značilen za donavsko linijo postrvi, »At« haplotip oz. alel, značilen za atlantsko linijo in »He« heterozigot	27
Preglednica 4: Povprečno število alelov (A), povprečna heterozigotnost populacije (pričakovana He, opazovana Ho) in Fis vrednost populacije	30
Preglednica 5: Povprečni delež »donavske« (Da) in »atlantske« (At) skupine v posamezni populaciji glede na analizo s programom STRUCTURE. Označene so vrednosti, ki presegajo 80 %	39
Preglednica 6: Vrednost Fst parnih primerjav čistih in skoraj čistih donavskih populacij potočnih postrvi na osnovi 5ih mikrosatelitnih lokusov (pod diagonalo) in statistična značilnost vrednosti Fst (nad diagonalo; NS – statistično neznačilno; *** - statistično značilno $p < 0,001$).	41

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Lokacije vzorčenja	12
Slika 2: Restriktivna analiza mtDNK z encimom <i>SarI</i> . Analizirani vzorci iz ribogojnice Bled; za vzorce 13, 16 in 17 je značilen mtDNK haplotip atlantske linije	24
Slika 3: Restriktivna analiza gena za somatolaktin. Analizirani vzorci iz potoka Kobila. Homozigoti za alel atlantske linije: 1, 3, 10, 15, 17, homozigoti za alel donavske linije: 2, 4, 6, 7, 11, 14, 16, heterozigoti: 5, 8, 9, 12, 13	25
Slika 4: Restriktivna analiza gena za LDH. Vzorci iz potoka Spodnja Besnica. Homozigot za alel atlantske linije: 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 17, homozigot za alel donavske linije: 5, 13, heterozigoti: 1, 4, 8, 11, 14, 15, 16	26
Slika 5: Delež haplotipov mtDNK po populacijah. »At« pomeni haplotip značilen za atlantsko linijo in »Da« haplotip, značilen za donavsko linijo. Imena populacij po zaporednih številkah so zapisana v preglednici 3.	28
Slika 6: Delež alelov jedrnega gena za SL po populacijah. »At« pomeni alel značilen za atlantsko linijo, »Da« alel, značilen za donavsko linijo in »He« heterozigotne vzorce. Imena populacij po zaporednih številkah so zapisana v preglednici 3.	29
Slika 7: Delež alelov jedrnega gena za LDH po populacijah. »At« pomeni alel značilen za atlantsko linijo, »Da« alel, značilen za donavsko linijo in »He« heterozigotne vzorce. Imena populacij po zaporednih številkah so zapisana v preglednici 3.	29
Slika 8: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnem lokusu 10/2 po populacijah.....	32
Slika 9: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnem lokusu 10/2 pri čistih donavskih populacijah, mešani populaciji (11) in atlantski kontroli (12)	32
Slika 10: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnem lokusu SsoSL438 pri čistih donavskih populacijah, mešani populaciji (11) in atlantski kontroli (12)	33
Slika 11: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnem lokusu SsoSL417 pri čistih donavskih populacijah, mešani populaciji (11) in atlantski kontroli (12)	34

Slika 12: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnih lokusih Ssa408 in OMM1064 pri čistih donavskih populacijah, mešani populaciji (11) in atlantski kontroli (12)	35
Slika 13: Filogenetsko drevo, ki predstavlja sorodstvene odnose med analiziranimi populacijami potočne postrvi. Populacije so obarvane glede na glavne reke oz. lokacije.	36
Slika 14: Rezultati programa STRUCTURE za naslednje populacije: 1-Mahnečica, 2-Mošenik, 3-Radulja - Roje, 4-Golica, 5-Mislinja, 6-Suhadolnica, 7-Log, 8-Nemiljščica, 9-Pritok Nemiljščice, 10-Zgornja Založnica, 11-Povodje, 12-Danska, 13-Ribogojnica Bled, 14-Lipenjščica, 15-Cerkniščica	37
Slika 15: Rezultati programa STRUCTURE za naslednje populacije: 16-Suha, 17-Tržiška Bistrica, 18-Radovna, 19-Kolpa, 20-Spodnja Besnica, 21-Potok ob Savi Bohinjki, 22-Bela, 23-Ljubno, 24-Mrzlek, 25-Davča, 26-Plaznica, 27-Gebnov potok.....	38
Slika 16: Rezultati programa STRUCTURE za naslednje populacije: 28-Rašica-Črnučica, 29-Zgornja Ložnica, 30-Hruškarski potok, 31-Štrukeljski potok, 32-Krotnjek, 33-Češnjica, 34-Jahodnica, 35-Višnjica, 36-Podplečnica, 37-Pišnica, 38-Mošenik PB, 39-Mošenik PK, 40-Potok Suša, 41-Stranjščica.....	38
Slika 17: Rezultati programa STRUCTURE za naslednje populacije: 42-Gradiščica, 43-Rečica, 44-Sora, 45-Črna, 46-Bled-vlaganje, 47-Resniški potok, 48-Izvir Dravinje, 49-Kobilna, 50-Žlebe, 51-Potok Suha, 52-Glinščica, 53-Bršljinski potok, 54-Kapusov potok	38
Slika 18: Korespondenčna analiza genetsko čistih in skoraj čistih donavskih populacij	42
Slika 19: Atlantska postrv iz ribogojnice Ente Tutela Pesca v Italiji (Razpet in Snoj, 2007).....	43
Slika 20: Potočna postrv iz Mošenika (Tržič) - Donavska linija (MPB3; Database, 2010).....	43
Slika 21: Potočna postrv iz Mislinje - Donavska linija (MIS10; Database, 2010).....	44
Slika 22: Suhadolnica, Vernerca nad Suhim Dolom - Donavska linija (SUH7; Database, 2010).....	44

Slika 23: Izvir Dravinje – Donavska linija (DRA13; Database, 2010).....	44
Slika 24: Resniški potok – Donavska linija (Res10; Database, 2010).....	44
Slika 25: Potočna postrv iz Gradiščice (Cerknica) – Atlantska linija (GRA22; Database, 2010).....	45
Slika 26: Potočna postrv iz Davče (Železniki) – Križanec (DAV4; Database, 2010).....	45
Slika 27: Potočna postrv iz Tržiške Bistrice (Tržič) – Križanec (TRB6; Database, 2010).....	45
Slika 28: Lokacije vzorčenja: rdeče – genetsko čiste avtohtone populacije; rumene – pretežno čiste avtohtone populacije (< 85 % introgresije alohtonih genov); črne – genetsko mešane populacije	46

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DNK	dezoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilen diamin tetraacetat
mtDNK	mitohondrijska DNK
PCR	polymerase chain reaction
RD	ribiška družina
RFLP	restriction fragment length polymorphism
TBE	Tris-borat-EDTA pufer
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan (= 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol)
LDH	laktat hidrogenaza
SL	somatolaktin
SDS	sodium dodecyl sulphate

SLOVARČEK

Atlantska postrv – potočna postrv atlantskega tipa

Donavska postrv – potočna postrv donavskega tipa

Genetsko čista populacija – genetsko čista populacija donavskega tipa potočnih postrvi

Genetsko mešana populacija – populacija, ki vsebuje donavski in atlantski tip potočne postrvi in križance med njima

1 UVOD

Potočna postrv (*Salmo trutta* Linnaeus 1758), ki je avtohton v Sloveniji, pripada razvojni liniji postrvi, značilni za donavski rečni sistem (t.i. »donavska postrv«) in pri nas originalno naseljuje porečji Save in Drave. Zaradi uničevanja okolja in močnega ribolovnega pritiska so začeli s podpornim vlaganjem ribogojniško vzrejenih (domesticiranih) potočnih postrvi. Te večinoma izhajajo iz atlantske razvojne linije postrvi, zaradi česar se je za te ribe udomačilo ime »atlantska postrv«. Pri tem prihaja do križanja med vnesenimi in avtohtonimi potočnimi postrvmi. Križanci so plodni in se uspešno plodijo medsebojno kot tudi z avtohtonimi in vnesenimi ribami. V tujini poribljanje z domesticirano linijo postrvi že nadomeščajo s poribljanjem s potomci avtohtonih populacij, pri čemer preverjajo njihovo genetsko čistost, saj je križance po videzu včasih težko ali celo nemogoče ločiti od starševskih linij. V Sloveniji so dosedanje genetske analize, izvedene na omejenem številu populacij in z omejenim številom molekularnih označevalcev, pokazale, da je avtohton donavska linija postrvi zelo ogrožena in v vodotokih, v katere vlagajo podmladek, prevladuje atlantska linija postrvi in križanci.

Prvotni namen diplomske naloge je bil, da analiziramo čim več populacij in z večjim številom molekularnih označevalcev pregledamo potočne postrvi v Sloveniji. Drugi namen pa je bil poiskati genetsko čiste avtohtone populacije, ki bi lahko služile kot material za dopolnilno vlaganje.

Molekularni označevalci, ki smo jih uporabili so: kontrolno regijo mitohondrijske DNK (mtDNK), dve regiji jedrne DNK in pet mikrosatelitnih lokusov. Za omenjene molekularne označevalce smo se odločili zato, ker so se pokazali kot zelo informativni že v mnogih predhodnih podobnih študijah na postrvi in ker zaradi svoje razširjene uporabe omogočajo neposredno primerjavo rezultatov, dobljenih v različnih laboratorijih in na najrazličnejših populacijah potočnih postrvi.

Predvidevamo, da v večini slovenskih voda prevladujejo postrvi atlantske linije oz. križanci in da bo genetsko čiste avtohtone populacije moč najti le v potokih, kjer zaradi oteženega fizičnega dostopa vlaganja ni bilo in so hkrati z naravno oz. umetno pregrado ločeni od vodotokov, v katere vlagajo podmladek iz ribogojnic.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SALMONIDI

Družina salmonidov (*Salmonidae*) vključuje sladkovodne in anadromne vrste rib. V Sloveniji živijo predstavniki iz rodov *Salmo* in *Hucho*, ki sta avtohton slovenska rodova, in *Onchorhynchus* ter *Salvelinus*, ki sta bila prinešena. Značilnost te družine je tolščenka ali tolsta plavut, ki se nahaja med hrbtno in repno plavutjo. Naslednja značilnost je, da imajo telo pokrito z drobnimi luskami in velik gobec z močnimi zobmi. Spodnja čeljust odraslih samcev v fazi drsti je kavljasto zakriviljena čez zgornjo. Za to družino je značilno, da so ribe izredno spremenljive po videzu, načinu vedenja in razmnoževanja. Spremenljivost se še povečuje tudi zaradi sposobnosti medsebojnega križanja nekaterih vrst (Povž in Sket, 1990). Salmonidi imajo zelo dobre plavalne sposobnosti, kar jim omogoča hidrodinamična oblika telesa. So plenilci, saj se prehranjujejo z različnimi vodnimi živalmi (Nelson, 1984).

Salmonidi naseljujejo porečja severnega ledenega morja, severnega dela Pacifika in Atlantika ter morja in reke Evrope, Azije in severne Amerike (Lagler, 1977). Kljub temu, da so vsi rodovi fiziološko prilagojeni na življenje v morski vodi, živijo v morju le t.i. anadromne vrste ali oblike (npr. atlantski losos /*Salmo salar*/), katerih značilnost je, da prihajajo v sladko vodo le na drst (Vuković, 1982).

Taksonomija salmonidov še ni dorečena, saj so sorodstvena razmerja določena na osnovi morfologije, ki pa se ne ujema vedno z razmerji, določenimi na osnovi genetskih analiz (Phillips in Oakley, 1997).

Taksonomska razvrstitev predstnikov družine *Salmonidae*, temelječa na molekularnih izsledkih (Crespi in Fulton, 2004; Snoj in sod., 2002; Sušnik in sod., 2007):

- družina: *Salmonidae* (salmonidi)
 - poddružina: *Salmoninae*
 - rod: *Brachymystax* (lenoki)
 - rod: *Hucho* (sulci)
 - rod: *Salvelinus* (zlatovčice)

- rod: *Oncorhynchus* (pacifiški lososi in postrvi)
- rod: *Salmo* (atlantski losos in postrvi)
 - vrsta: *Salmo salar* (atlantski losos)
 - vrsta: *Salmo trutta* (potočna postrv)
 - vrsta: *Salmo marmoratus* (marmorirana /soška/ postrv)
 - vrsta: *Salmo obtusirostris* (mehkoustna postrv)
 - vrsta: *Salmo ohridanus* (ohridska belvica)

Vrsta *Salmo trutta* se pojavlja v treh oblikah, ki so odvisne od okolja, kjer ta vrsta živi: v tekočih vodah se razvije potočna oblika (*S. trutta* f. *fario*), v jezeru jezerska (*S. trutta* f. *lacustris*) in v morju morska (*S. trutta* f. *trutta*). Ker je pri nas najbolj pogosta potočna oblika, se ime »potočna postrv« uporablja kot vrstno ime, kar ni čisto točno.

V okviru potočne postrvi se predvsem na slabo raziskanih območjih (Balkan, severna Afrika) pa tudi na britanskem otočju pojavlja še precej morfološko in genetsko specifičnih populacij, ki jih nekateri opredeljujejo kot rase, podvrste ali celo samostojne vrste (npr. *S. letnica* /ohridska postrv/ (Sušnik in sod., 2007), *S. fariooides* /jadranska postrv/, *S. akairos* /pritlikava postrv/ v hribovju Atlas v Maroku (Delling in Doadrio, 2005), *S. ferox* na Irskem (Kottelat in Freyhof, 2007), itd...).

2.2 POTOČNA POSTRV (*SALMO TRUTTA*) LINNAEUS 1758

2.2.1 Razpoznavne značilnosti

Postrv ima podolgovato in valjasto telo, ki je ob straneh sploščeno. Gobec s številnimi, nekoliko ukrivljenimi zobmi ima razklan do oči. Samec se loči od samice po naprej premaknjeni, navzgor ukrivljeni konici spodnje čeljusti. Riba ima med hrbtno in ravno repno plavutjo tolsto plavut ali tolščenko brez plavutnic. Barvitost je odvisna od življenjskega okolja ter od naravnega ali umetnega križanja. Križanje je mogoče med vsemi oblikami vrste *Salmo trutta*. Čiste potočne postrvi so tiste, ki več generacij živijo v istem življenjskem okolju, brez križanja z drugimi oblikami potočnih postrvi ali vrstami

postrvi. Osnovne značilnosti so izrazite rdeče, svetlo obrobljene okrogle pege na bokih, ob pobočnici in pod njo. Tudi na tolščenki so opazne rdeče toda nepravilne in neobrobljene pege. Glavo, hrbet in hrbtno plavut ima potočna postrv posuto s temnimi pegami, ki se praviloma ujemajo z osnovno barvo hrbta. Tudi te pege so lahko svetlo obrobljene. Osnovna barva hrbta je svetlo rjava do temno zelena in je odvisna od barve okolja. Boke ima svetlejše, trebuh pa belkast, sivkast ali rumenkast. Mladice imajo ob bokih mladostne proge – pokončne temnejše lise, ki so značilne za vse salmonoide. Mlade postrvi imajo 6-9 prog. Luske so majhne in pokrite s sluzjo. Donavska potočna postrv redko zraste nad 50 cm (1 kg). Večje so atlantske potočne postrvi in križanke med njimi ali križanke z jezersko postrvjo ter ribe v izrazito ugodnem življenjskem okolju. Drsti se od novembra do marca, najpogosteje decembra in januarja in sicer v hitri in nizki prodnati vodi. Samica izkoplje drstno jamico, v katero na kilogram lastne teže odloži 1000 do 3000 iker velikosti 4-5 mm (Svetina in Pavšič, 1987).

2.2.2 Življenjski prostor

Potočna postrv naseljuje hladne, s kisikom bogate zgornje tokove skoraj vseh evropskih voda. Živi tako v gorskih kot nižinskih potokih, le da so dovolj nasičeni s kisikom, kar je odvisno od pretoka in temperature vode (Svetina in Pavšič, 1987; Povž in Sket, 1990).

Potočna postrv kot avtohtonata salmonidna vrsta naseljuje porečja Evrazije in severne Afrike. Na severu jo najdemo od severne Norveške in severo-vzhodnega dela severne Rusije do pogorja Atlas v severni Afriki na jugu. Na zahodu od Islandije do Aralskega morja na vzhodu (Behnke, 1986; Snoj, 2004). Potočna postrv je bila vložena tudi v vode na drugih kontinentih, kot na primer v severni in južni Amerika in Avstraliji.

2.2.3 Molekularno genetska struktura potočne postrvi

Potočna postrv je ena izmed biološko najbolj pestrih vrst med vretenčarji (Allendorf in Leary, 1988). Tako ima skoraj vsaka geografsko izolirana populacija potočne postrvi svoje fenotipske značilnosti. Ta pestrost v veliki meri izhaja iz genetsko pogojenih razlik med posameznimi populacijami, ki se kažejo npr. v času drsti, času zrelosti, toleranci na okolje itd. in so pomembne za uspešno prilagajanje na različna okolja (Laikre, 1999). Fenotipske razlike pa pogojuje tudi različno okolje, ki ga potočna postrv naseljuje. Zaradi te velike

fenotipske raznolikosti obstaja v taksonomiji potočne postrvi velika zmeda, saj so mnogi avtorji okoljske oblike in geografsko ločene populacije s specifičnim zunanjim videzom opisovali kot samostojne vrste ali podvrste (Snoj, 2004). V zadnjih desetletjih so začeli izvajati različne molekularne analize, kar je vodilo do boljšega razumevanja genetskih razlik med populacijami in oblikami postrvi. S preučevanjem mitohondrijske DNK (mtDNK) so opredelili filogenetsko povezavo med morfološko različnimi in geografsko oddaljenimi populacijami potočne postrvi. Določili so razlike nukleotidnih zaporedij v odseku mitohondrijske kontrolne regije, ki je zelo variabilna. Na osnovi variabilnih mest je Bernatchez (2001) potočno postrv razdelil v naslednje filogenetske linije, ki naj bi naseljevale odgovarjajoče rečne sisteme oz. bazene:

- sredozemska linija — zahodni del sredozemskega bazena
- jadranska linija – vzhodni del sredozemskega bazena z jadranskim povodjem
- donavska linija – bazeni Črnega, Kaspijskega, Aralskega morja
- atlantska linija – atlantski bazen
- linija *marmoratus* – (soška postrv) – porečji Pada in Soče

Območja naseljevanja so značilna predvsem za atlantsko in donavsko linijo, medtem ko so v kasnejših raziskavah sredozemsko linijo našli tudi v jadranskem bazenu, jadransko linijo pa v sredozemskih rekah pirenejskega polotoka. Linijo *marmoratus* so najprej našli le pri soških postrvih (od tod tudi ime) v Sloveniji in Italiji, kasneje pa se je pokazalo, da te genetske variante, ki določajo *marmoratus* linijo, niso značilne le za soške postrvi ampak tudi za nekatere linije potočne postrvi v sredozemskem bazenu. Po drugi strani pa se za južne populacije soške postrvi (=glavatice; v BiH in Črni Gori) pokazale kot značilne jadranske genetske variante. Soške postrvi torej na osnovi mtDNK ni mogoče opredeljevati kot samostojno filogenetsko linijo (Bernatchez, 2001).

Na osnovi razlik med mitohondrijskimi haplotipi in oceni molekularne ure sklepajo, da so se linije potočne postrvi ločile pred najmanj 700.000 leti (poledenitve v pleistocenu). Donavsko linijo poledenitev ni tako prizadela, nastala je pred 300.000-150.000 leti. Atlantska linija je nastala pred 26.000-13.000 leti, po času zadnje poledenitve in je najmlajša, saj je bil atlantski bazen najbolj izpostavljen poledenitvam (Bernatchez in sod., 1992; Bernatchez, 2001). Ugotavlja, da se je izolacija vseh skupin zgodila ob približno

enakem času z razcepom v ločena porečja in kasnejšim omejenim mešanjem (Bernatchez in sod., 1992; Apostolidis in sod., 1997).

2.2.4 Problematika vnašanja tujerodnih ribjih vrst

Na področju severnega Sredozemlja je znanih 70 vloženih ribjih vrst iz drugih evropskih porečij ali iz drugih kontinentov (eksotične vrste). Od tega je bilo kar 60 % vrst vloženih v zadnjih 40-ih letih. Razlogov je več (Crivelli, 1995):

- povečanje donosa komercialnih ribogojnic,
- večja uspešnost ribolova, posledično več prodanih ribolovnih dovolilnic,
- naključje (pobeg živih vab, akvarijskih rib in rib iz ribogojnic),
- omejevanje razmnoževanja komarjev in
- upravljanje mokrišč.

Možna posledica vnašanja tujerodnih populacij je njihovo križanje z avtohtonimi populacijami, kar predstavlja grožnjo za njihov obstoj. Večina vloženih rib sicer propade, tiste, ki se uspejo drstiti, pa svoje gene zanesajo v avtohtono populacijo, ki na tak način slabí in izgublja svojo lastno genetsko identiteto (Hansen in Loeschcke, 1994). Na primer, domesticirana atlantska linija potočne postrvi odraža značilen zunanji videz, ki je genetsko pogojen in lahko skozi proces križanja popači izvirno podobo avtohtone populacije.

Izguba genetske pestrosti avtohtonih populacij je posledica več dejavnikov: majhna velikost populacij, efekt ozkega grla, naključen tok alelov, parjenje v sorodu, selekcija na ribogojniško okolje in dolgotrajno mešanje z genetsko neustreznimi ribogojniškimi linijami. Vse to povzroča homozigotnost, izgubo polimorfizma in povečano izražanje recessivnih alelov, kar vpliva na manjšo sposobnost preživetja. To lahko preprečimo s primernim upravljanjem ribjih populacij, kar vključuje spremeljanje genetske strukture naravnih in gojenih populacij, uporabljanje večjega števila starševskih živali za gojenje, selektivno parjenje, čim krajši čas zadrževanja mladic v ujetništvu in ločeno vzdrževanje genetsko različnih linij oz. populacij. Ko enkrat posežemo v ekosistem, je zelo pomembno spremeljanje populacij preko statistike ribolova in z genetskimi analizami, predvsem ko gre za ohranjanje ogrožene vrste (Maitland, 1995). Ribe, ki so gojene z namenom ohranjanja

specifičnih populacij, morajo biti vzrejene z morfološkimi, vedenjskimi in genetskimi lastnostmi populacije, ki jo želimo rešiti. Upoštevati moramo, da morajo gojene ribe imeti sposobnost prilagoditve naravnemu okolju, kamor so vložene (Philippart, 1995).

2.2.5 Ogroženost potočne postrvi

Velikost populacij postrvi se je v mnogih državah zelo zmanjšala. V Evropi je potočna postrv ogrožena predvsem zaradi uničevanja naravnega okolja, regulacije strug, gradnje jezov, onesnaženja rek in kislega dežja. Ponekod so krivec naravnih procesov, velikokrat pa tudi človeška aktivnost. Potočna postrv ogroža ribolov, ki povzroča zmanjšanje naravnih populacij in s tem tudi zmanjšanje intra- in interpopulacijskega polimorfizma (Hansen, 2002; Jug in sod., 2005; Almodovar in sod., 2006).

Potočna postrv predstavlja eno najbolj genetsko strukturiranih ribjih vrst. Tudi populacije znotraj posameznih skupin so genetsko zelo pestre. Izjema so potočne postrvi severno-atlantske skupine, ki ne kažejo velike genetske raznolikosti, kar je verjetno rezultat tamkajšnjih geoloških dogajanj v času zadnje poledenitve. Takrat je bila večina severne Evrope prekrita z ledeniki in današnja populacija se je razvila iz redkih preživelih posameznikov (Apostolidis in sod., 1997; Snoj, 2004).

Ker je prišlo do velikega uničenja naravnih habitatov, se je razmnoževanje avtohtonih populacij zelo zmanjšalo. Da bi povečal številčnost populacij, je človek vnesel v reke potočne postrvi, vzrejene v ribogojnici. Te postrvi pa izvirajo iz severno-atlantske linije, ki v ribogojniških razmerah dobro uspeva, vendar pa ji njena majhna genetska variabilnost, ki je posledica majhne efektivne velikosti populacije, mnogih ozkih gril in parjenja v sorodstvu, ne dopušča uspešnega prilagajanja na druga okolja. Ocenjujejo, da je stopnja preživelosti po vnosu v reke manjša od 10 %. Imajo pa tudi zmanjšano sposobnost razmnoževanja (Weiss in Schmutz, 1999). Poribljanje z domesticirano linijo pa je zelo intenzivno in nekaterim osebkom uspe preživeti in se razmnoževati. Prihaja do hibridizacije med domačimi avtohtonimi in vnesenimi postrvmi. Križanci so plodni in predstavljajo reproduktijski most med obema linijama. Po nekaj generacijah nastane hibridna populacija in avtohtona dokončno izgine (Allendorf in sod., 2001). Skozi proces križanja se spremeni tudi originalna podoba avtohtone populacije. Avtohtona populacija s

križanjem izgubi svojo morfološko in genetsko identiteto (Largiader in Scholl, 1996; Allendorf in sod., 2001; Arlinghaus in sod., 2002; Snoj, 2004; Barić in sod., 2009).

Problem izgubljanja avtohtone populacije potočne postrvi in majhne preživelosti rib se da rešiti s t.i. dopolnilnim vlaganjem, pri katerem za vlaganje uporabljamo avtohtoni material. Ta način upošteva različnost populacij in zagotavlja genetsko raznolikost.

2.2.6 Potočna postrv v Sloveniji

Kot v mnogih državah tako tudi v Sloveniji številčnost potočnih postrvi naglo upada zaradi uničenja okolja in močnega ribolovnega pritiska. Primanjkljaj že skoraj tri desetletja nadomeščajo z vlaganjem ribogojniško vzrejenih (domesticiranih) postrvi, ki večinoma izhajajo iz danskih ribogojnic (Hansen in Loeschke, 1994). Iz opravljenih preliminarnih analiz na mtDNK je razvidno, da je razširjenost neavtohtonih linij postrvi v slovenskih vodah velika, vendar neenakomerno razporejena in, da povsod tam, kjer aktivno gospodarijo z vodotoki, prevladujejo križanci (Razpet in Snoj, 2007; Jug in sod., 2005). Presenetljivo je, da je bila atlantska linija najdena tudi na nekaterih lokacijah, s katerimi ne gospodarijo že več deset let in kamor selitev rib iz spodnjega toka zaradi neprehodnih zaprek ni mogoča. Mogoče je, da je to posledica vlaganja potočnih postrvi v slovenske vode v času po 1. sv. vojni, ko so material za poribljanje uvažali iz Italije, kjer vzrejajo atlantsko ribogojniško linijo že okoli 200 let.

V Sloveniji je za postrvi donavske linije značilno sedem različnih haplotipov, medtem ko so pri atlantski liniji zabeležili le en haplotip (At1), kar kaže na njen izrazito majhen genetski polimorfizem (Snoj, 2004).

Jug in sod. (2005) so na potočni postrvi na omejenem številu (10) populacij opravili analizo na petih mikrosatelitnih lokusih (BFRO001: Snoj in sod., 1997; 10/2: Sušnik in sod., 1997; BFRO003: Snoj in sod., 1997; Str85INRA: Presa in Guyomard, 1996; Ssa197: O'Reilly in sod., 1996) in potrdili izrazito prisotnost atlantske postrvi v slovenskih vodotokih. Še posebno visok delež atlantske postrvi so našli v ribogojnici Povodje pa tudi v rekah Krka in Obrh. Od desetih analiziranih populacij je bila glede na mikrosatelitno analizo genetsko čista le ena avtohtona populacija (i.e., iz reke Ribnice pri Bohinju).

2.3 MOLEKULARNI OZNAČEVALCI

2.3.1 Mitohondrijska DNK

Mitohondrijski genom je eden izmed najuporabnejših modelov DNK za ugotavljanje genetske strukture populacij, opredelitev filogenetskih odnosov, križanja in introgresije ter procesa nastajanja novih vrst (Avise in sod., 1987). Za ugotavljanje variabilnosti mtDNA je najbolj praktična restrikcijska analiza fragmentov, lahko pa variabilnost ugotavljamo neposredno z določanjem nukleotidnih zaporedij (sekvenciranje) (Gyllensten in Wilson, 1988). Kot zelo pomemben genski označevalcev se je mtDNA uveljavila zaradi svojih štirih specifičnih lastnosti: enostavna organizacija, maternalno dedovanje, odsotnost rekombinacije in razmeroma visoka mutacijska stopnja.

MtDNA je sestavljena iz 37 genov in kontrolne regije, ki je dolga približno 1000 bp. Kontrolna regija vsebuje mesto za začetek replikacije težje verige in cis-delujoča regularna področja za replikacijo in transkripcijo obeh verig (Clayton, 1982). Zelo pomembna lastnost kontrolne regije je visoka stopnja mutacije, saj je pri mtDNA vretenčarjev povprečno za 10 krat večja, kot pri kromosomalni DNK (Brown in sod., 1982). Mutacije nastanejo v bolj ali manj enakomernih časovnih presledkih, zaradi česar je kontrolna regija mtDNA uporabna za približno določitev časovnega obdobja. Na osnovi mutacij prepoznavamo in opredeljujemo različne genetske variante, ki jih imenujemo haplotipi. S primerjavo različnih haplotipov med seboj prepoznavamo njihove skupne značilnosti in razlike ter tako ocenjujemo filogenetsko sorodnost osebkov ter sklepamo na njihov izvor in filogeografsko strukturo populacije, ki ji pripadajo. Problem pa nastane, ko imamo opravka tudi s križanci in ne samo s čistimi linijami, kajti zaradi maternalnega dedovanja na osnovi mtDNA, križancev ne moremo razlikovati od čistih linij. Rezultati mtDNA nam povedo le delež posameznih haplotipov v neki populaciji in ne razmerja med križanci in čistimi osebki (Snoj, 2004).

2.3.2 Enonukleotidne spremembe v jedrni DNK - SNP (= single nucleotide polymorphism)

Enonukleotidne spremembe v jedrni DNK (SNP, ang. single nucleotide polymorphisms) predstavljajo najpogostejsi tip spremembe DNK v genomu vretenčarjev. SNP so točkovne

mutacije. Večinoma so to nukleotidne zamenjave (substitucije), redkeje insercije ali delecije. Alele določamo s pomočjo specifičnih endonukleaz, ki različne genotipe po PCR razrežejo v različne restrikcijske profile (RFLP, ang. restriction fragment lenght polymorphism) ali pa z ugotavljanjem nukleotidnega zaporedja (Kruglyak in Nickerson, 2001). SNP so priljubljeni genetski označevalci, ki jih uporablja v populacijski genetiki, v številnih študijah molekularne ekologije in za namen ohranjanja naravnih populacij. Za potočne postrvi je do sedaj odkritih in uporabljenih le manjše število SNP genetskih označevalcev. Najbolj poznan je SNP gen, ki kodira laktat dehidrogenazo - LDH (McMeel in sod., 2001) in na osnovi katerega lahko ločujemo med aleлом, značilnim za domesticirano atlantsko linijo postrvi in aleлом, ki označuje preostale linije postrvi (Lucentini in sod., 2006; Schoffmann in sod., 2007; Chat in sod., 2008).

2.3.3 Mikrosateliti

Mikrosateliti ali preproste tandemske ponovitve so kratki segmenti DNK in so sestavljeni iz kratkih ponavljajočih se nukleotidnih motivov iz 1 – 6 baznih parov. Nahajajo se po celotnem evkariontskem genomu, manj jih je le v kodogenih regijah in na telomerah. So zelo polimorfni in zato uporabni kot genetski označevalci (Goldstein in Schlötterer, 1999). V populacijskih študijah uporabljam mikrosatelite z variabilnim številom zaporednih ponovitev, da jih lahko ločimo med seboj po dolžini (Nakamura in sod., 1987). S pomočjo mikrosatelitov ocenjujemo genetsko strukturo populacij, preučujemo dogodke, ki so vplivali na današnjo strukturo populacije, kot na primer parjenje v sorodstvu, križanje; ter odkrivamo ozka grla (Goldstein in Schlötterer, 1999; Razpet in sod., 2007; Sušnik in sod., 2007; Snoj in sod., 2010). Mikrosatelitni genetski označevalci predstavljajo zelo hiter, učinkovit in zanesljiv sistem za pridobivanje genetskih podatkov.

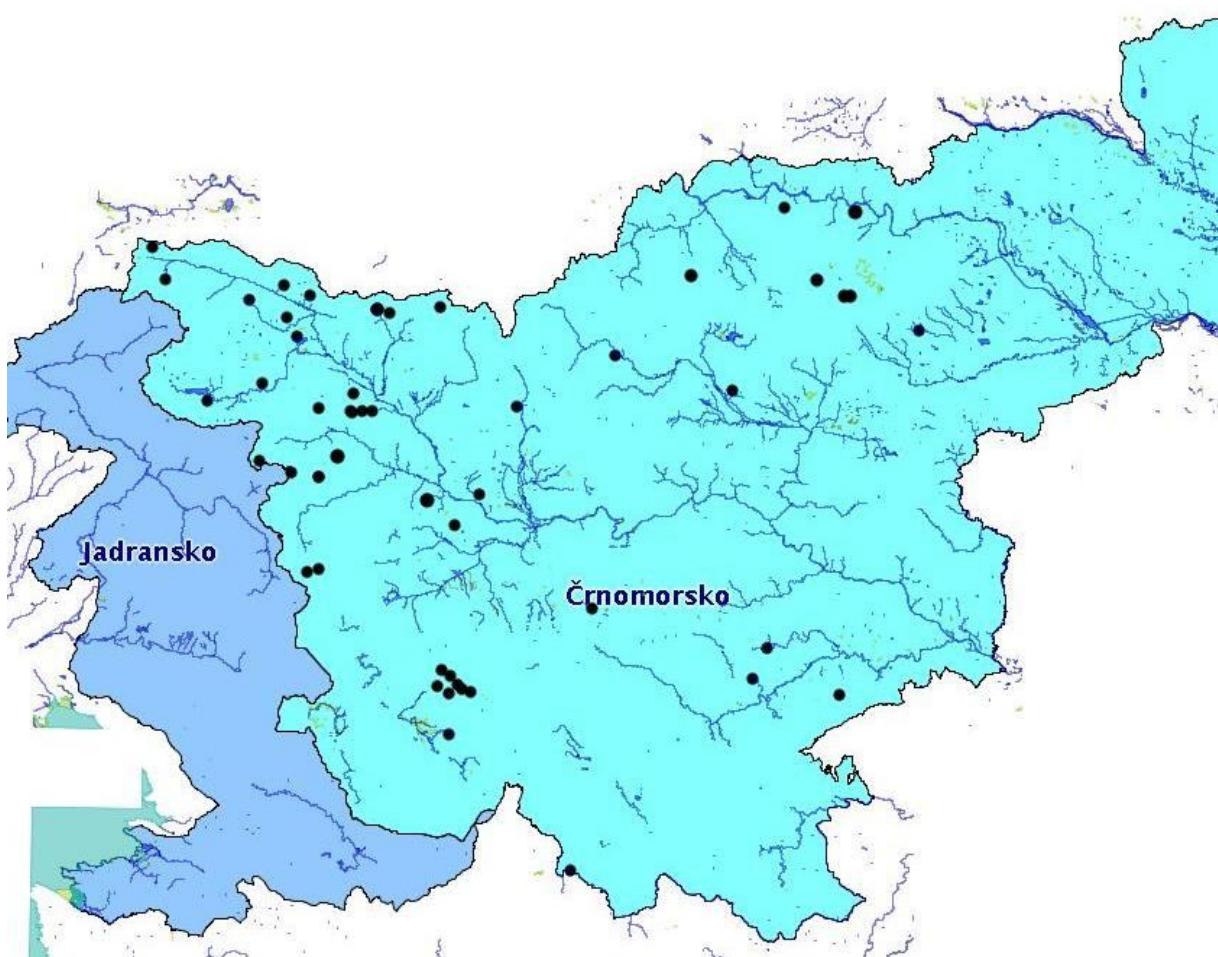
3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Vzorce smo zbirali med leti 2008 in 2010. V raziskavo je bilo vključenih 52 lokacij po celotnem območju donavskega porečja v Sloveniji. Skupno smo pregledali 1233 rib. Kot primerjalni skupini smo v analizo vključili tudi postrvi iz ribogojnice Povodje ter čisto atlantsko potočno postrv iz danske ribogojnice in iz norveške reke Otre.

Ribe smo polovili s pomočjo elektro-agregata in jih nato omamili z narkotikom. Vse postrvi smo fotografirali, izmerili in stehtali ter jim odvzeli košček predrepne plavuti za genetsko analizo in ga shranili v 96 % etanolu. Ribe smo nato vrnili v potok.

Lokacije vzorčenja so bile dveh tipov: (1) tiste, za katere smo lahko predvidevali, da jih naseljujejo čiste avtohtone potočnice (npr. predeli potokov, za katere ni podatkov o poribljanju ali kamor ni dostopa z avtomobilom ali se nahajajo nad naravno ali umetno pregrado, ki preprečuje migracijo rib proti toku) (2) glavni tokovi rek, kjer poteka intenzivno poribljanje. Iz vsakega potoka smo vzeli vzorce 20 do 30 postrvem ali več. V nekaterih potokih je bila populacija rib zelo majhna in smo uspeli odvzeti vzorce le nekaj primerkom. Na sliki 1 so lokacije označene na zemljevidu. Preglednica 1 pa lokacije podrobneje opisuje.



Slika 1: Lokacije vzorčenja

Preglednica 1: Lokacije vzorčenja, število vzorcev na lokacijo ter pripadajoča ribiška družina

	Potok / Reka	Glavna reka	Lokacija	Št. rib	Ribiška družina
1	Mahnečica	Cerkniščica	10 km iz Cerknice	30	Cerknica
2	Mošenik	Tržiška Bistrica	Tržič – Podljubelj (nad HE)	30	Tržič
3	Radulja - Roje	Krka	Roje pri Trebelnjem	11	Novo Mesto
4	Golica	Sava Dolinka	Potok pri planini pod Golicom	30	Jesenice
5	Mislinja	Mislinja	Zgornji tok nad zadnjo elektrarno Vernerca nad Suhim dolom	25	Koroška
6	Suhadolnica	Mislinja	Vernerca nad Suhim dolom	25	Koroška
7	Log	Sava	Kranj - Besnica	20	Tržič
8	Nemiljščica	Sava	Kranj - Besnica	23	Tržič
9	Pritok Nemiljščice	Sava	Kranj - Besnica	6	Tržič
10	Zgornja Založnica	Savinja	Ložnica - Zgornje Založe	5	Šempeter
11	Ribogojnica Bled	Sava Bohinjka	Bled	56	Bled
12	Lipenjščica	Cerkniško jezero	5 km od Lipsenja pod mlinom	24	ZZRS
13	Cerkniščica	Rakov Škocjan	Lovranovo - Cerknica	30	Cerknica
14	Suha	Sava Bohinjka	5 km vzhodno od Bohinjskega jezera	43	Bohinj
15	Tržiška Bistrica	Tržiška Bistrica	Tržič - Medvodje	10	Tržič
16	Radovna	Sava Dolinka	1 km nad jezerom Kreda	32	ZZRS
17	Kolpa	Kolpa	Osilnica	52	Kočevje
18	Spodnja Besnica	Sava	Kranj - Besnica	30	Tržič
19	Potok ob Savi Bohinjki	Sava Bohinjka	V višini vasi Nomenj	30	ZZRS
20	Bela	Sava Dolinka	Pritok Save pod Jesenicami	30	Jesenice
21	Ljubno	Savinja	Ribogojnica Ljubno ob Savinji	21	Ljubno ob Savinji
22	Mrzlek	Cerkniščica	Cerknica	22	Cerknica
23	Davča	Selška Sora	Davča pod slapovi	19	Železniki

se nadaljuje

nadaljevanje

	Potok / Reka	Glavna reka	Lokacija	Št. rib	Ribiška družina
24	Plaznica	Sava	Kranj - Besnica	3	Tržič
25	Gebnov potok	Tržiška Bistrica	Tržič, Podljubelj-pritok Mošenika	12	Tržič
26	Rašica - Črnučica	Sava	Rašica – Sp. Gameljne	17	Straža - Sava
27	Zgornja Ložnica	Dravinja	Ložnica, Zg. Ložnica	20	Slovenska Bistrica
28	Hruškarski potok	Cerkniščica	Hruškarje - Cerknica	28	Cerknica
29	Štrukeljski potok	Cerkniščica	Štrukljeva vas, Cerknica	28	Cerknica
30	Krotnjek	Sava Dolinka	Podkoren - Kranjska gora	30	Jesenice
31	Češnjica	Selška Sora	Rudno - Železniki	30	Železniki
32	Jahodnica	Selška Sora	Črnovški potok – Dolenja vas	30	Železniki
33	Višnjica	Krka	Železniška postaja Polževo	24	Grosuplje
34	Podplečnica	Poljanska Sora	Kopačnica - Gorenja vas	30	Visoko
35	Pišnica	Sava Dolinka	Kranjska Gora	15	Jesenice
36	Mošenik PB	Tržiška Bistrica	Tržič, Podljubelj-pod zajetjem BPT	8	Tržič
37	Mošenik PK	Tržiška Bistrica	Tržič, Podljubelj – pod HE Kališnik	13	Tržič
38	Potok Suša	Poljanska Sora	Hotavlje - Gorenja vas	30	Visoko
39	Stranjščica	Kamniška Bistrica	Zagorica nad Kamnikom	19	Bistrica-Domžale
40	Gradiščica	Cerkniščica	Gradiško	30	Cerknica
41	Rečica	Radovna	Spodnje Gorja - Bled	30	ZZRS
42	Sora	Poljanska Sora (Sovra)	Hleviše – Žiri	28	Žiri
43	Črna	Poljanska Sora	Podklanec, Žiri	30	Žiri
44	Bled-vlaganje	Sava Bohinjka	Ribogojnica Bled	21	Bled
45	Resniški potok	Dravinja	Resnik, Rogla	20	Slovenska Bistrica
46	Izvir Dravinje	Dravinja	Rogla	20	Slovenska Bistrica

se nadaljuje

nadaljevanje

	Potok / Reka	Glavna reka	Lokacija	Št. rib	Ribiška družina
47	Kobila	Krka	Mihovo, Šentjernej	20	Novo Mesto
48	Bršljinski potok	Krka	Hudo, Novo Mesto	15	Novo Mesto
49	Žlebe	Sava	Medvode	14	Medvode
50	Potok Suha	Drava	Radlje ob Dravi	19	Radlje
51	Kapusov potok	Drava	Lovrenc na Pohorju	25	Radlje
52	Glinščica	Ljubljanica	Podutik	20	Dolomiti

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija DNK

DNK smo izolirali iz predrepne plavuti. V epico smo dali majhen delček plavuti (2-4 mm²) in dodali 600 µl ekstrakcijskega pufra (0,5 M Tris, 0,1 M EDTA, 2 % SDS, pH 8,8) in 5 µl proteinaze K. Vsebino smo pretresli in inkubirali v kopeli 3 ure pri 55°C. Ko se je plavut razgradila, smo suspenzijo ohladili na ledu in dodali 350 µl 5 M amonijevega acetata, ki je oboril proteine. Vsebino smo dobro pretresli in centrifugirali (centrifuga 5417C Eppendorf, Nemčija) pri 13000 rpm 15 minut. Ob centrifugiranju se proteini usedejo na dno, v tekočini pa ostane DNK. Tekočino smo odlili v novo epico in ji dodali 600 µl izopropanola, ki obori DNK. Suspenzijo smo za najmanj 30 minut postavili v zamrzovalno skrinjo na -20°C. Sledilo je ponovno centrifugiranje, 5 minut pri maksimalni hitrosti (164000 rpm), ob katerem nastane usedlina DNK. Previdno smo odlili tekočino in dodali 300 µl 70 % etanola, ki z DNK spere soli. Suspenzijo smo 5 minut centrifugirali pri maksimalni hitrosti. Previdno smo s pipeto odstranili tekočino in pazili, da nismo odstranili DNK. DNK smo posušili z vakuumsko centrifugo (Eppendorf, Nemčija) ali pa smo epice položili v ležeči položaj in jih pustili na zraku pol ure. V oborino DNK smo dodali 20 µl vode in pustili v hladilniku čez noč, da se je raztopila. Za delovno raztopino smo DNK redčili še z vodo v razmerju 1:5.

3.2.2 Elektroforeza na agaroznem gelu

Elektroforeza na agaroznem gelu je metoda za ločevanje DNK po velikosti. V našem primeru smo jo uporabili za dokazovanje učinkovitosti izolacije DNK, uspešnost metode PCR in uspešnost analize z restriktionskimi encimi.

Agarozni gel smo pripravili s segrevanjem agaroze (FMC, ZDA) v 0,5 x TBE pufru (0,5 M Tris baza, 0,5 M borna kislina, 10 mM EDTA (pH 8,3)). Koncentracija gela je odvisna od namena uporabe. Za opazovanje izolirane DNK smo uporabili 1 % gel, za produkte PCR 1,5 % in za opazovanje produktov restrikcije 2 oz. 2,5 % agarozni gel. V gel smo dodali barvilo SYBRSafe (Invitrogen, ZDA). To barvilo ob vezavi na DNK luminiscira pri UV svetlobi. Elektroforeza je potekala v horizontalni elektroforezni enoti (Pharmacia,

Švedska). Vzorcem smo pred nanosom na gel dodali aplikacijski pufer (0,25 % brom-fenol modro, 0,25 % ksilen cianol, 30 % glicerol v vodi) v razmerju 1:10. V žepke smo odpipetirali 5 µl vzorca izolirane DNK in produktov PCR in po 10 µl produkta restrikcije. Na gel smo dodali ustrezen velikostni standard 1 kb (Fermentas, Litva) ali 100 bp (Fermentas, Litva) in s tem ocenili velikost fragmenta. Elektroforeza je tekla pri 100 V pri sobni temperaturi. Agarozni gel smo slikali s sistemom za slikanje gelov (U:Geinus, Syngene, ZDA).

3.2.3 PCR – Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo – PCR (ang. polymerase chain reaction) je metoda za pomnoževanje DNK.

Za 20 µl reakcijo smo potrebovali naslednje sestavine:

- 0,5 µM začetnega oligonukleotida F
- 0,5 µM začetnega oligonukleotida R
- 0,2 µM deoksinukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 1,5 µM MgCl₂
- 2 µl 10 x *Taq* pufer
- 0,1 U *Taq* DNK polimeraze
- 50 ng genomske DNK
- bidestilirano vodo do končnega volumna

Za pomnoževanje kontrolne regije mtDNA smo uporabili naslednja začetna oligonukleotida:

28-R 5'-CACCCCTTAACCTCCAAAGCTAAG-3' (Snoj in sod., 2000)

cytR 5'-GTGTTATGCTTAGTTAACGC-3' (Bernatchez in Danzmann, 1993)

Za pomnoževanje dela jedrnega gena za somatolaktin (SL) smo uporabili naslednja začetna oligonukleotida (Ford, 2000):

SL piraF 5'-TGGCCCGTTGAATCCATATAAAG-3'

SL piraR 5'-ACTGTGAAACACTAACGCTCTCCA-3'

Za pomnoževanje dela jedrnega gena za laktat dehidrogenazo (LDH) smo uporabili naslednja začetna oligonukleotida (McMeel in sod., 2001):

LDH-F 5'-GGCAGCCTCTCCTCAAAACGCCA-3'

LDH-R 5'-GGGTACTCCCAGGATTCAATCAGG-3'

PCR je potekala v cikličnem termostatu GeneAmp PCR 2400 (PE Applied Biosystem) s sledečimi temperaturnimi profili:

Program 1 (mtDNK):

- Začetna denaturacija DNK: 94°C, 3 min
- 32 ciklov s profilom:
 - Denaturacija: 94°C, 45 s
 - Vezava začetnih oligonukleotidov: 55°C, 30 s
 - Sinteza komplementarne verige: 72°C, 1 min
- Končna sinteza: 72°C, 3 min

Program 2 (SL):

- Začetna denaturacija DNK: 94°C, 3 min
- 35 ciklov s profilom:
 - Denaturacija: 94°C, 30 s
 - Vezava začetnih oligonukleotidov: 60°C, 20 s
 - Sinteza komplimentarne verige: 72°C, 20 s
- Končna sinteza: 72°C, 2 min

Program 3 (LDH):

- Začetna denaturacija DNK: 94°C, 3 min
- 35 ciklov s profilom:
 - Denaturacija: 94°C, 30 s
 - Vezava začetnih oligonukleotidov: 62°C, 20 s

- Sinteza komplementarne verige: 72°C, 30 s
- Končna sinteza: 72°C, 2 min

Od 20 µl PCR produkta smo odvzeli 5 µl, mu dodali 1 µl aplikacijskega pufra in nanesli na 1,5 % agarozni gel. Na konec vrstice na gelu smo dodali velikostni standard 1 kb. Elektroforeza je potekala pri 100 V, 15 minut.

3.2.4 Restriktivna analiza (RFLP)

Pripravili smo 20 µl restriktivne mešanice, ki je vsebovala:

- 10 µl produkta PCR
- 2 µl 10 x ustreznega restriktivnega pufra
- 10 enot ustreznega restriktivnega encima
- bidestilirano vodo do končnega volumna

Uporabili smo 3 endonukleaze, ki so bile izbrane glede na nukleotidno zaporedje tako, da režejo različne mtDNK haplotipe in alele jedrnih lokusov. Restriktivni pufer in ustrezen temperaturo inkubacije uporabimo po priporočilih proizvajalca encima.

Za restriktivno analizo mtDNK smo uporabili encim *SatI*. Prepoznavno mesto za encim *SatI* je GC^{NGC}. Spodaj je prikazan del sekvene, kjer je prišlo do enonukleotidne zamenjave, značilne za razlikovanje med haplotipom At1, značilnim za ribogojniško linijo atlantskih postrvi in donavskimi haplotipi.

Da.....ATGGTCAGGGACAGATATCGTATTAGGTCGCATCTCGTGAATTATTCCTGGCATTGGTT

At1.....ATGGTCAGGGACAGATATCGTATTAGGCTGCATCTCGTGAATTATTCCTGGCATTGGTT

Za restriktivno analizo gena za LDH smo uporabili encim *BseLI*. Prepoznavno mesto za encim *BseLI* je CCNNNNN^{NNGG}. Spodaj je prikazan del sekvene, kjer je prišlo do enonukleotidne zamenjave, značilne za razlikovanje med atlantsko specifičnim aleлом in aleлом, specifičnim za donavsko linijo potočne postrvi.

Da AGTCTGACCGTGGAGAA

AT AGCCTGACCGTGGAGAA

Za restriktivno analizo gena za SL smo uporabili encim *Hpa*II. Prepoznavno mesto za encim *Hpa*II je C⁺CGG. Spodaj je prikazan del sekvene, kjer je prišlo do enonukleotidne zamenjave, značilne za razlikovanje med atlantsko specifičnim alegom in aleom, specifičnim za donavsko linijo potočne postrvi.

Da CTCTGTCGGCGCCGGAAAGTACAATACCATTACTAGAAAGATATTGGACGC

At CTCTGTCGGCGCTGGAAGTACAATACCATTACTAGAAAGATATTGGACGC

Vsebino restriktivne reakcije smo pretresli, centrifugirali in postavili v inkubator (Tehnica, Slovenija) na primerno temperaturo za najmanj 3 ure. Ko je bila reakcija končana, smo v epice dodali 1 µl aplikacijskega pufra. Dobro smo premešali in 10 µl mešanice nanesli na 2 % ali 2,5 % agarozni gel. V zadnji žepek na gelu smo dodali velikostni standard 1 kb ali 100 bp.

3.2.5 Analiza mikrosatelitov

Pri analizi mikrosatelitov smo PCR reakcijo naredili po standardnem zgoraj opisanem receptu. Analizirali smo 5 mikrosatelitnih lokusov (Preglednica 2), ki smo jih pomnoževali v dveh reakcijah PCR: (1) lokus 10/2 in OMM1064, (2) lokus Saa408, SsoSL417 in SsoSL438.

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje mikrosatelitnih lokusov

Oznaka	Sekvence oligonukleotidov	Dolžina (bp) produkta PCR	Referenca
10/2 F	ATGTTTTGACTGCACATGTATTG	116-128	Sušnik in sod., 1997
10/2 R	GGAGATAAGAGTCACCGAGGC	116-128	Sušnik in sod., 1997
OMM1064 F	AGAATGCTACTGGTGGCTGTATTGTGA	163-286	Lerceteau-Köhler in Weiss, 2006
OMM1064 R	TCTGAAAGACAGGTGGATGGTTCC	163-286	Lerceteau-Köhler in Weiss, 2006
Ssa408 F	AATGGATTACGGGTACGTTAGACA	205-305	Lerceteau-Köhler in Weiss, 2006
Ssa408 R	CTCTTGCGAGGTTCTTCATCTGT	205-305	Lerceteau-Köhler in Weiss, 2006
SsoSL417 F	TTGTTCAGTGTATATGTGTCCCAT	169-195	Lerceteau-Köhler in Weiss, 2006
SsoSL417 R	GATCTTCACTGCCACCTTATGACC	169-195	Lerceteau-Köhler in Weiss, 2006
SsoSL438 F	GACAACACACAAACCAAGGCAC	89-109	Lerceteau-Köhler in Weiss, 2006
SsoSL438 R	TTATGCTAGGTCTTATGCATTGT	89-109	Lerceteau-Köhler in Weiss, 2006

Za obe PCR reakciji smo uporabili program 4.

Program 4:

- Začetna denaturacija DNK: 94°C, 3 min
- 35 ciklov s profilom:
 - Denaturacija: 94°C, 45 s
 - Vezava začetnih oligonukleotidov: 57°C, 1min 30 s
 - Sinteza komplementarne verige: 65°C, 1 min
- Končna sinteza: 60°C 30 min

Po 4 µl produkta PCR smo prenesli v reagenčno posodo za ABI. Dodali smo 10 µl formamida in 0,4 µl označevalca velikosti ROX350 (vsebuje fragmente, označene s fluorescentno skupino ROX, ki so dolgi 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340

in 350 bp (Applied Biosystems, ZDA). Posodico smo nato denaturirali v cikličnem termostatu GeneAmp PCR 2400 (Applied Biosystem, ZDA) pri 95°C 3 minute. Nato smo jo pokrili z gumijastim pokrovčkom in jo ohladili na ledu. Mikrosatelite smo analizirali s pomočjo kapilarne elektroforeze ABI Prism 3110 (Applied Biosystems, ZDA), kjer je ločevanje fragmentov potekalo na principu kapilarne elektroforeze. Genotipe smo določili s pomočjo programa GeneMapper (Applied Biosystems, ZDA).

3.3 ANALIZA PODATKOV

Statistično analizo mikrosatelitnih podatkov smo izvedli z računalniškimi programi GENETIX 4.05 (Belkhir in sod., 1996), FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001), POPULATIONS (Langella, 2002) in STRUCTURE (Pritchard in sod., 2000).

Stopnjo polimorfizma znotraj posamezne populacije smo določili preko števila alelov in heterozigotnosti. V programu FSTAT smo tudi preverili, če so populacije v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Za ugotavljanje ravnotežja znotraj populacije smo uporabili F-statistiko, ki ocenjuje odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnotežja. Panmiksijo smo merili s parametrom Fis (Weir in Cockerham, 1984). Negativna Fis vrednost pomeni, da je v populaciji opažena heterozigotnost večja od pričakovane, pozitivna Fis vrednost pa, da je v populaciji opažena heterozigotnost manjša od pričakovane.

Sorodstvene odnose med populacijami pa smo predstavili v obliki nekoreninjenega filogenetskega drevesa s pomočjo programa POPULATIONS. Za distančno matriko smo izbrali distanco D_{AS} , ki temelji na deležu skupnih alelov med dvema populacijama.

S programom STRUCTURE smo ovrednotili število populacijskih struktur oz. genetskih skupin znotraj vseh analiziranih vzorcev. Število skupin smo določili preko izračuna verjetnosti, da vzorci tvorijo eno do dvanajst skupin ($K = 1-12$). Za izračun števila skupin smo uporabili model po Evannu (Evanno in sod., 2005). Za vsako simulacijo smo uporabili 20000 MCMC ponovitev, pri čemer je bilo dodatnih začetnih 20000 ponovitev izločenih iz analize (burn in).

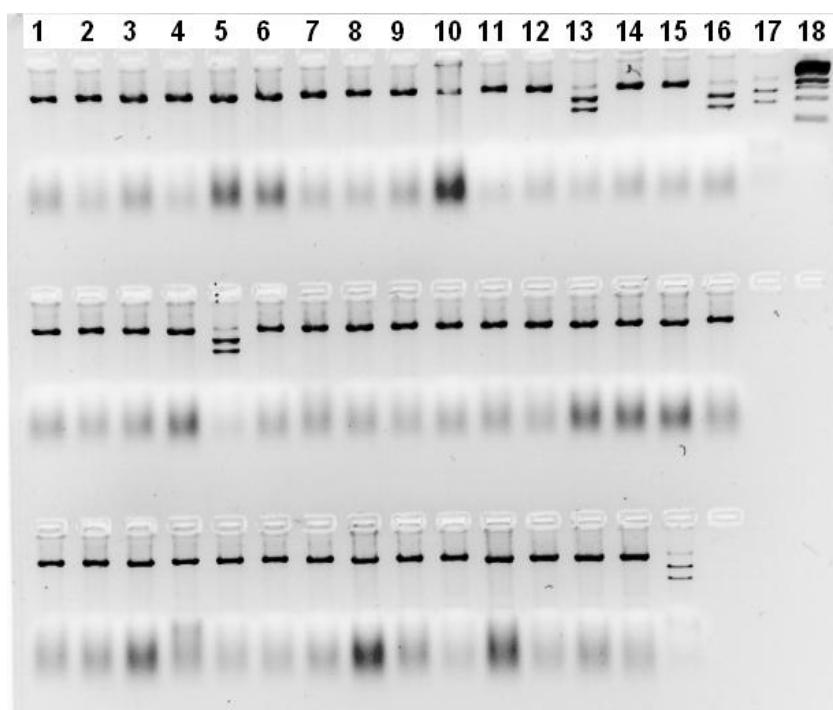
Preko parametra Fst smo proučevali odnose med genetsko čistimi populacijami in določili, katere populacije so statistično značilno različne med sabo. Fst je prilagojena za majhne in neenako velike populacije ali majhno število populacij (Weir in Cockerham, 1984).

Sorodstvene odnose med posameznimi vzorci genetsko čistih populacij smo predstavili s korespondenčno analizo (program GENETIX 4.05).

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA MITOHONDRIJSKE DNK

Rezultate restrikcijske analize mtDNK smo opazovali na 2 % gelu. Restrikcijski encim *SatI* je rezal mtDNK atlantskih haplotipov, nerezana mtDNK pa predstavlja haplotipe donavske linije (Slika 2). V zadnji žepki na gelu (17) smo vedno dali kontrolo atlantske linije, da smo se prepričali o pravilnem delovanju restrikcije.



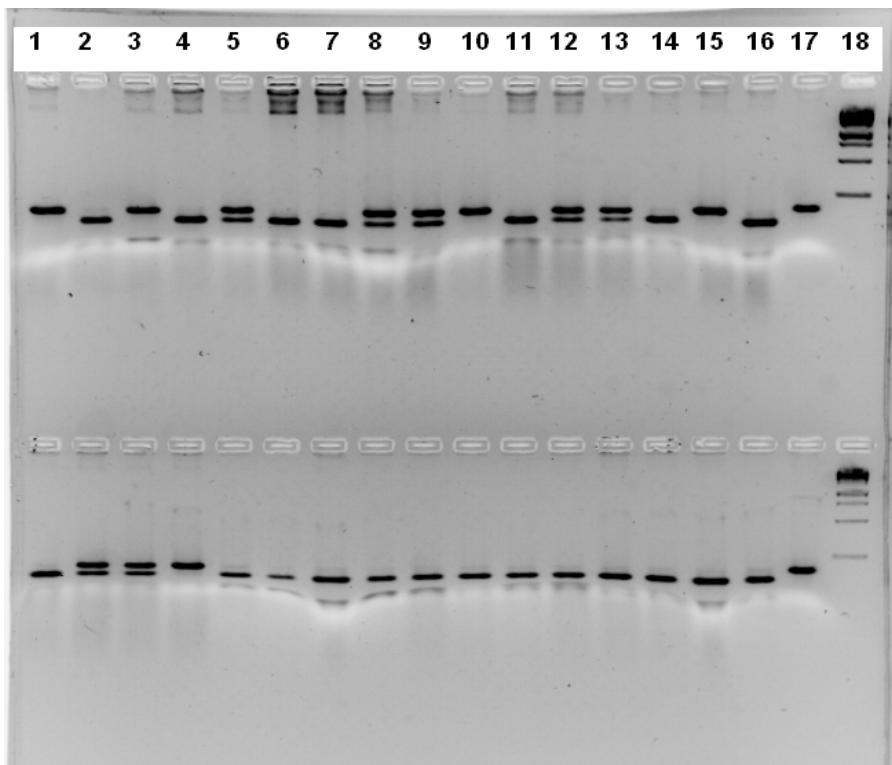
Slika 2: Restrikcijska analiza mtDNK z encimom *SatI*. Analizirani vzorci iz ribogojnice Bled; za vzorce 13, 16 in 17 je značilen mtDNK haplotip atlantske linije

Rezultati restrikcijske analize mtDNK so podani v preglednici 3.

4.2 ANALIZA JEDRNE DNK

4.2.1 Somatolaktin

Restriktijski encim *Hpa*II je rezal alel gena za somatolaktin, ki je značilen za donavsko linijo postrvi (Slika 3, Vzorec 2), nerezan alel pa predstavlja alel, značilen za atlantsko linijo postrvi (Slika 3, Vzorec 1). V primeru, da postrv vsebuje tako alel za donavsko kot za atlantsko postrv (heterozigot), kot rezultat na gelu dobimo dva različno velika fragmenta (Slika 3, vzorci št. 5, 8, 9, 12, 13).



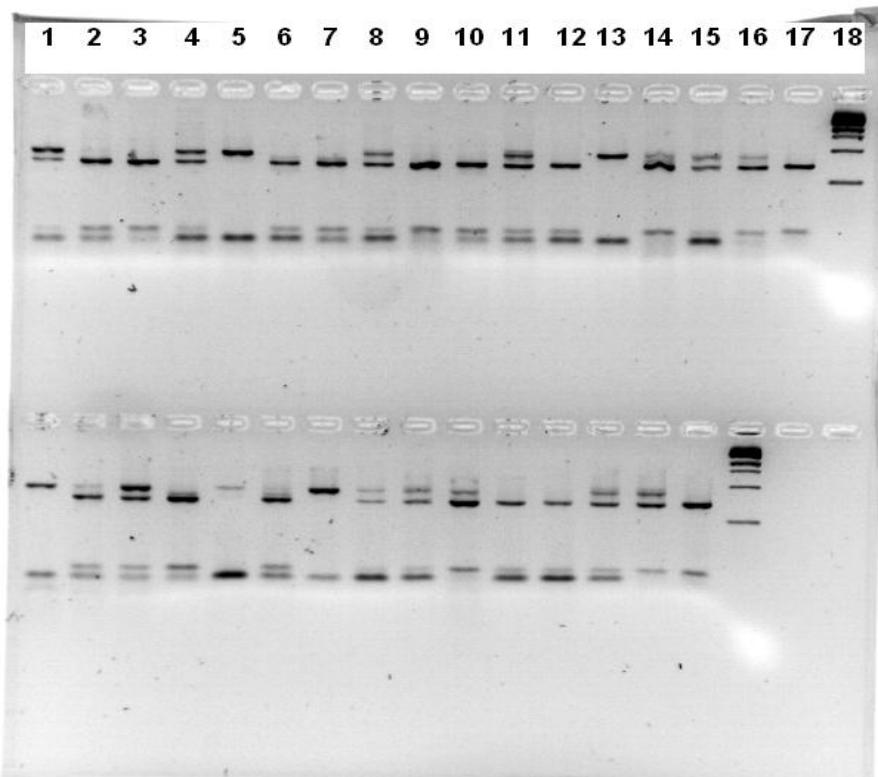
Slika 3: Restriktijska analiza gena za somatolaktin. Analizirani vzorci iz potoka Kobila.
Homozigoti za alel atlanstke linije: 1, 3, 10, 15, 17, homozigoti za alel donavske
linije: 2, 4, 6, 7, 11, 14, 16, heterozigoti: 5, 8, 9, 12, 13

Rezultati restriktijske analize gena za somatolaktin so podani v preglednici 3.

4.2.2 LDH

Restriktijski encim *Bse*LI je rezal alel gena za LDH, ki je značilen za atlantsko linijo postrvi (Slika 4, vzorec 2), nerezan alel pa predstavlja alel, značilen za donavsko linijo

postrvi (Slika 4, vzorec 5). V primeru, da postrv vsebuje tako alel za donavsko kot za atlantsko postrv (heterozigot) kot rezultat na gelu dobimo dva različno velika fragmenta (Slika 4, vzorci št. 1, 4, 8, 11, 15, 16).



Slika 4: Restriktionska analiza gena za LDH. Vzorci iz potoka Spodnja Besnica. Homozigot za alel atlantske linije: 2, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 17, homozigot za alel donavske linije: 5, 13, heterozigoti: 1, 4, 8, 11, 14, 15, 16

Rezultati restriktionske analize gena za LDH so podani v preglednici 3.

4.2.3 Rezultati restriktionskih analiz

Preglednica 3 prikazuje rezultate tipizacij mtDNK, gena za SL in LDH pri vseh analiziranih populacijah potočne postrvi. Delež posameznih haplotipov oz. alelov smo predstavili tudi grafično (Slika 5, Slika 6, Slika 7).

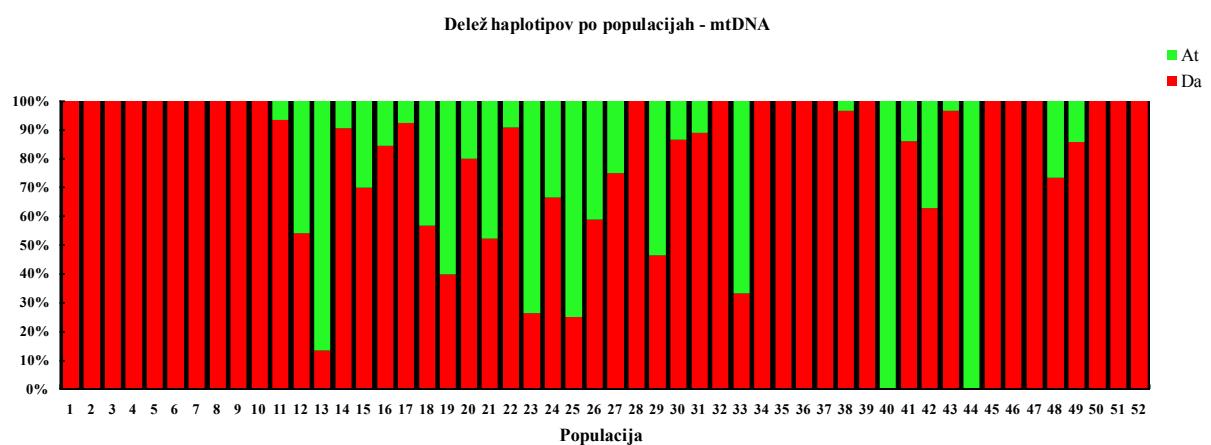
Preglednica 3: Rezultati restrikcijskih analiz mtDNK, SL in LDH. »Da« pomeni haplotip oz. alel značilen za donavsko linijo postrvi, »At« haplotip oz. alel, značilen za atlantsko linijo in »He« heterozigot.

	Potok / Reka	mtDNK		SL			LDH		
		Da	At	Da	At	He	Da	At	He
1	Mahnečica	30		11		19	15	2	13
2	Mošenik	30		30			30		
3	Radulja - Roje	11			7	4		8	3
4	Golica	30		13	5	12	28		2
5	Mislinja	25		25			25		
6	Suhadolnica	25		25			25		
7	Log	20		10	1	9	8	2	9
8	Nemiljščica	23		14		9	21		2
9	Pritok Nemiljščice	6			3	3		1	5
10	Zgornja Založnica	5			4	1	2	2	1
11	Ribogojnica Bled	43	3	17	6	23	38	3	5
12	Lipenjščica	13	11	1	19	4	1	20	2
13	Cerkniščica	4	26		23	7		24	6
14	Suha	39	4	37	1	5	32		11
15	Tržiška Bistrica	7	3	2	1	7		5	5
16	Radovna	27	5	13	6	13	13	3	15
17	Kolpa	48	4	43	3	6	44	2	6
18	Spodnja Besnica	17	13	6	14	10	4	13	13
	Potok ob Savi	12	18	8	5	17	22	1	7
19	Bohinjki								
20	Bela	24	6	7	8	15	12	8	10
21	Ljubno	11	10	2	5	14	5	5	10
22	Mrzlek	20	2	3	7	12	3	7	10
23	Davča	5	14	11	1	7	13	1	5
24	Plaznica	2	1	3					3
25	Gebnov potok	3	9	1	4	7	1	1	10
26	Rašica - Črnučica	10	7	1	5	11	7	4	5
27	Zgornja Ložnica	15	5	3	9	8	5	4	11
28	Hruškarski potok	28		20	2	6	22		6
29	Štrukeljski potok	13	15	1	1	26	9	8	10
30	Krotnjek	26	4	14	1	15	25		4
31	Češnjica	24	3	26		4	20	3	7
32	Jahodnica	29		29			4	16	8
33	Višnjica	8	16		18	6	3	10	11
34	Podplečnica	28		18	2	10	27	1	2
35	Pišnica	15		12		3	13		
36	Mošenik PB	8		8			8		
37	Mošenik PK	12		13			13		

se nadaljuje

nadaljevanje

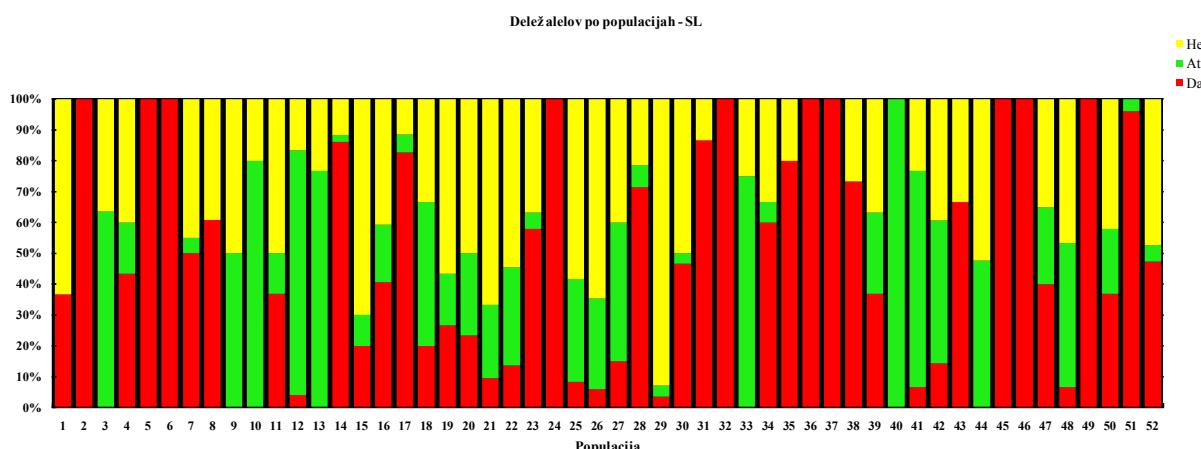
	Potok / Reka	mtDNK		SL			LDH		
		Da	At	Da	At	He	Da	At	He
38	Potok Suša	28	1	22		8	28		2
39	Stranjščica	19		7	5	7	10	5	4
40	Gradiščica		27		30			29	1
41	Rečica	25	4	2	21	7	1	27	2
42	Sora	17	10	4	13	11	9	13	6
43	Črna	28	1	20		10	18	9	3
44	Bled - vlaganje		21		10	11	1	13	7
45	Resniški potok	20		20			19		
46	Izvir Dravinje	20		20			16		
47	Kobilna	20		8	5	7	12	2	4
48	Bršljinski potok	11	4	1	7	7	5	6	2
49	Žlebe	12	2	14			13		
50	Potok Suha	19		7	4	8	10		4
51	Kapusov potok	25		24	1		24		
52	Glinščica	20		9	1	9	7	4	3



Slika 5: Delež haplotipov mtDNK po populacijah. »At« pomeni haplotip značilen za atlantsko linijo in »Da« haplotip, značilen za donavsko linijo. Imena populacij po zaporednih številkah so zapisana v preglednici 3.

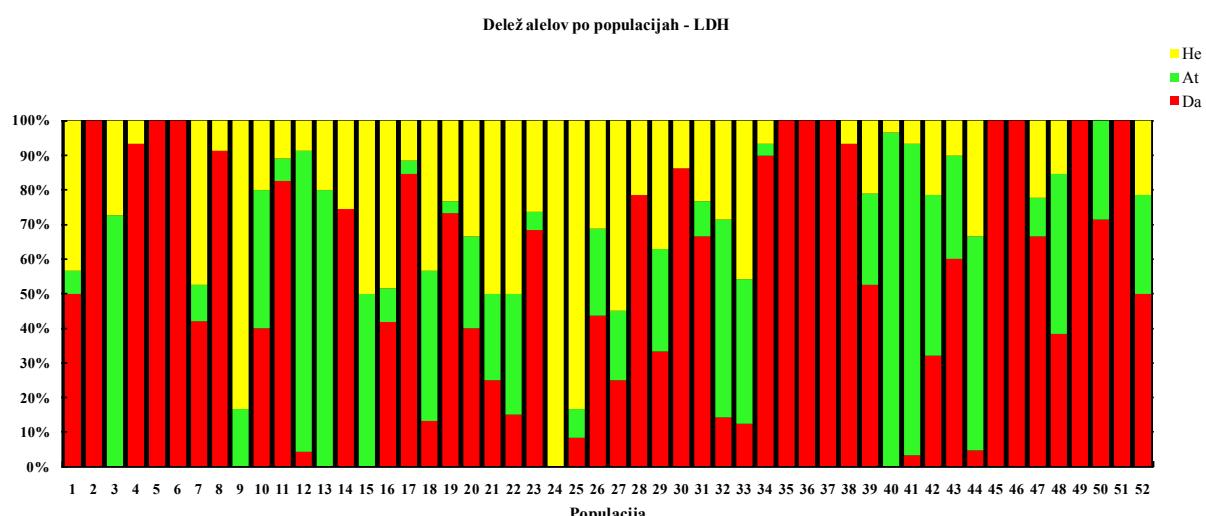
Analiza mtDNK je pokazala (Slika 5), da je med 52 analiziranimi populacijami 23 populacij takšnih, v katerih imajo vse ribe haplotip značilen za donavsko linijo. V ribogojnici Bled (št. 11 v sliki 5) ima večina potočnih postrvi v izolirani jati donavski haplotip, vendar za vlaganje uporabljajo postrvi, ki imajo haplotip značilen za atlantsko

linijo (št. 44 v sliki 5). Prav tako imajo vse ribe iz Gradiščice atlantski haplotip. Pri ostalih 29 populacijah pa smo odkrili oba haplotipa.



Slika 6: Delež alelov jedrnega gena za SL po populacijah. »At« pomeni alel značilen za atlantsko linijo, »Da« alel, značilen za donavsko linijo in »He« heterozigotne vzorce. Imena populacij po zaporednih številkah so zapisana v preglednici 3.

Pri analizi jedrnega gena za SL smo ugotovili (Slika 6), da imajo v 10-ih populacijah vse ribe le alel značilen za donavsko linijo. Za ribe iz Gradiščice je značilen le atlantski alel. Ostalih 41 populacij je mešanih. Med njimi je zanimiv Kapusov potok z osebki, ki imajo alele značilne za donavsko linijo, le en osebek pa ima atlantski alel.



Slika 7: Delež alelov jedrnega gena za LDH po populacijah. »At« pomeni alel značilen za atlantsko linijo, »Da« alel, značilen za donavsko linijo in »He« heterozigotne vzorce. Imena populacij po zaporednih številkah so zapisana v preglednici 3.

Pri analizi jedrnega gena za LDH smo ugotovili (Slika 7), da imajo vse ribe iz 10-ih populacij alel značilen za donavsko linijo. Nobena populacija ni čista atlantska. Imena populacij po zaporednih številkah so zapisana v preglednici 3.

4.3 ANALIZA MIKROSATELITNIH LOKUSOV

4.3.1 Povprečno število alelov po populacijah, povprečna heterozigotnost populacije in Fis vrednost populacije

V preglednici 4 je prikazano povprečno število alelov po populacijah (A), povprečna heterozigotnost populacije (pričakovana He, opazovana Ho) in Fis vrednost populacije.

Preglednica 4: Povprečno število alelov (A), povprečna heterozigotnost populacije (pričakovana He, opazovana Ho) in Fis vrednost populacije

	Populacija	A	He	Ho	Fis
1	Mahnečica	6	0,6184	0,6184	0,017
2	Mošenik	3,4	0,3932	0,4651	-0,166
3	Radulja - Roje	4,8	0,5843	0,5455	0,114
4	Golica	4,8	0,6284	0,6784	-0,063
5	Mislinja	5,2	0,5462	0,5280	0,054
6	Suhadolnica	2,8	0,4006	0,3650	0,109
7	Log	6,6	0,7206	0,8214	-0,110
8	Nemiljščica	3,2	0,5321	0,6323	-0,164
9	Pritok Nemiljščice	5	0,7170	0,8933	-0,150
10	Zgornja Založnica	5,2	0,7236	0,8133	0,014
11	Povodje	4,4	0,6000	0,6300	0,076
12	Danska	6,2	0,6339	0,7356	-0,105
13	Ribogojnica Bled	5,4	0,4938	0,5304	-0,063
14	Lipenjščica	8	0,7197	0,6750	0,084
15	Cerkniščica	6,2	0,6373	0,6228	0,042
16	Suha	5,2	0,4571	0,4010	0,136
17	Tržiška Bistrica	6,8	0,7636	0,7978	0,010
18	Radovna	11	0,7803	0,7775	0,020
19	Kolpa	11,2	0,6337	0,5796	0,095
20	Spodnja Besnica	9,8	0,7489	0,7478	0,020
21	Potok ob Savi Bohinjki	6,6	0,7540	0,7727	-0,007
22	Bela	11,4	0,7667	0,7357	0,058
23	Ljubno	10,8	0,7763	0,8214	-0,032
24	Mrzlek	11,2	0,7817	0,7496	0,066

se nadaljuje

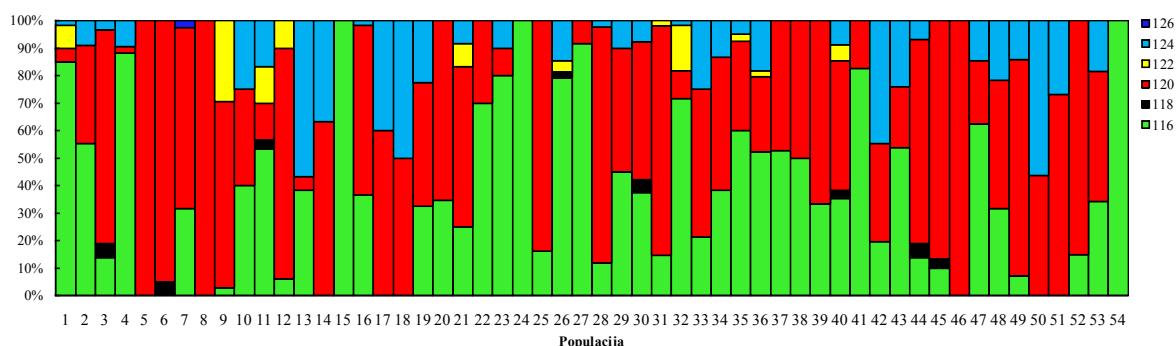
nadaljevanje

	Populacija	A	He	Ho	Fis
25	Davča	6,2	0,6068	0,6487	-0,041
26	Plaznica	2,2	0,4667	0,5333	0,059
27	Gebnov potok	4,4	0,6188	0,7767	-0,212
28	Rašica - Črnučica	11,2	0,7650	0,8353	-0,061
29	Zgornja Ložnica	8,4	0,6977	0,7100	0,008
30	Hruškarski potok	7	0,5476	0,5416	0,030
31	Štrukeljski potok	9,4	0,7816	0,8439	-0,061
32	Krotnjek	8,6	0,6997	0,7288	-0,023
33	Češnjica	8	0,5582	0,5591	0,015
34	Jahodnica	1,6	0,0666	0,0740	-0,094
35	Višnjica	11,6	0,7959	0,8405	-0,034
36	Podplečnica	5,6	0,6357	0,7200	-0,116
37	Pišnica	5,6	0,5552	0,5814	-0,005
38	Mošenik PB	3,2	0,4484	0,5000	-0,049
39	Mošenik PK	2,8	0,3976	0,4154	-0,005
40	Potok Suša	4,8	0,5019	0,5267	-0,032
41	Stranjsčica	6,2	0,7349	0,8105	-0,076
42	Gradiščica	4,8	0,5811	0,6097	-0,032
43	Rečica	8,6	0,7085	0,7120	0,012
44	Sora	13,2	0,8099	0,8275	-0,003
45	Črna	9,2	0,5877	0,5324	0,111
46	Bled - vlaganje	9,4	0,7060	0,7410	-0,025
47	Resniški potok	2,6	0,3331	0,3358	0,018
48	Izvir Dravinje	1,4	0,0913	0,0737	0,218
49	Kobilna	6,4	0,6667	0,6825	0,004
50	Žlebe	1,4	0,1599	0,2256	-0,376
51	Potok Suha	4,4	0,5265	0,5399	0,003
52	Glinščica	6,2	0,6257	0,7415	-0,158
53	Bršljinski potok	9	0,8008	0,8814	-0,063
54	Kapusov potok	5,4	0,4923	0,4553	0,096

Povprečno število alelov (A) v posamezni populaciji se je gibalo od 1,4 (Žlebe, Izvir Dravinje) do 13,2 (Sora). Povprečna heterozigotnost (Ho) v posamezni populaciji je bila od 0,0737 (Izvir Dravinje) do 0,8933 (Pritok Nemiljsčice), povprečna Fis vrednost populacije pa je bila od -0,376 (Žlebe) do 0,218 (Izvir Dravinje). Nobena analizirana populacija statistično signifikantno ne odstopa od Hardy-Weinbergovega ravnotežja. Veliko populacij ima negativno vrednost Fis, kar kaže na pomanjkanje heterozigotov v populaciji. Pozitivna vrednost Fis pa nam pove, da vsebuje populacija večje število heterozigotov od pričakovanega. Tu ni razlik med čistimi in mešanimi populacijami (Preglednica 4).

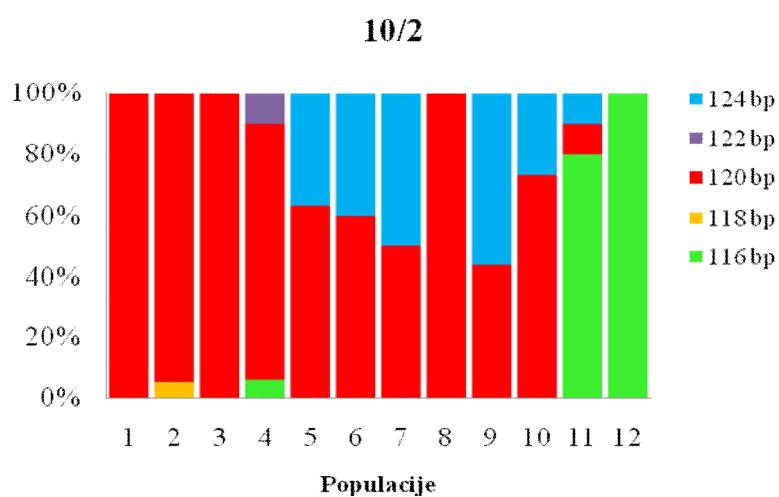
4.3.2 Število alelov pri posameznih mikrosatelitnih lokusih

Pri mikrosatelitnem lokusu 10/2 smo našli 6 različnih alelov (dolžin 116–126 bp), pri OMM1064 smo našli 54 alelov (164-339 bp), pri Ssa408 37 alelov (200-326 bp), pri lokusu SsoSL417 18 alelov (147-197 bp) in pri lokusu SsoSL438 12 alelov (93-124 bp).



*1 Račica, 2 Sora, 3 Črna, 4 Bled-vlaganje, 5 Resniški p., 6 Izvir Dravinje, 7 Kobila, 8 Žlebe, 9 Potok Suha, 10 Glinščica, 11 Bršljinjski p., 12 Kapusov p., 13 Mahnečica, 14 Mošenik, 15 Roje, 16 Golica, 17 Mislinja, 18 Suhadolnica, 19 Log, 20 Nemiljščica, 21 Pritok Nemiljščice, 22 Zg. Založe, 23 Povodje, 24 Danska, 25 Bled potomci, 26 Lipsenjščica, 27 Cerkniščica, 28 Suha Bohinj, 29 Tržiška B., 30 Radovna, 31 Kolpa Osilnica, 32 Sp. Besnica, 33 Sava Bohinjka, 34 Bela, 35 Ljubno, 36 Mrzlek, 37 Davča, 38 Plaznica, 39 Gebnov p., 40 Rašiški p., 41 Zg. Ložnica, 42 Hruškovski p., 43 Štrukeljski p., 44 Krotnjek, 45 Češnjica, 46 Jahodnica, 47 Višnjica, 48 Podplečnica, 49 Pišnica, 50 MPB, 51 MPK, 52 Potok Suša, 53 Stranjščica, 54 Gradiščica

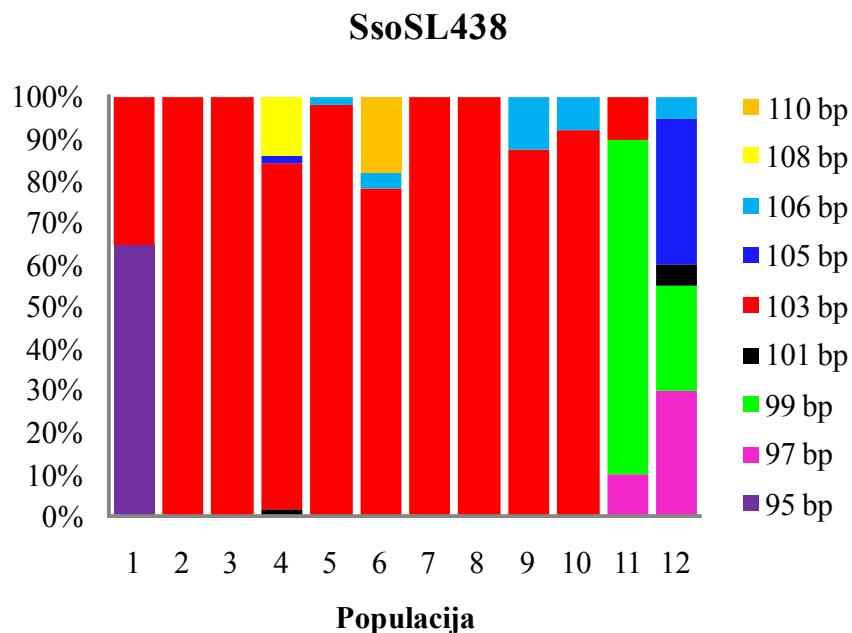
Slika 8: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnem lokusu 10/2 po populacijah



*1 Resniški p., 2 Izvir Dravinje, 3 Žlebe, 4 Kapusov p., 5 Mošenik, 6 Mislinja, 7 Suhadolnica, 8 Jahodnica, 9 MPB, 10 MPK, 11 Povodje, 12 Danska

Slika 9: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnem lokusu 10/2 pri čistih donavskih populacijah, mešani populaciji (11) in atlantski kontroli (12)

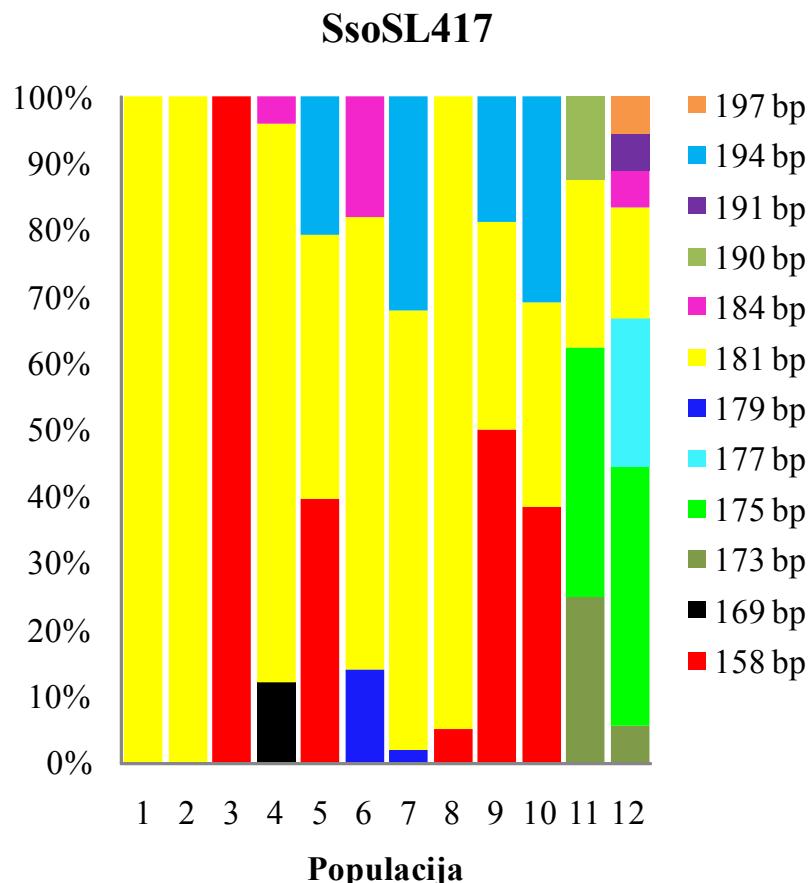
Najpogosteji alel mikrosatelita 10/2 je velik 120 bp in je značilen za donavsko linijo, prav tako pogost je alel 116 bp, ki pa je značilen za atlantsko linijo. Veliko populacij, tudi čiste donavske pa vsebuje alel velik 124 bp (Slika 9).



*1 Resniški p ,2 Izvir Dravinje, 3 Žlebe, 4 Kapusov p, 5 Mošenik, 6 Mislinja, 7 Suhadolnica, 8 Jahodnica, 9 MPB, 10 MPK, 11 Povodje, 12 Danska

Slika 10: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnem lokusu SsoSL438 pri čistih donavskih populacijah, mešani populaciji (11) in atlantski kontroli (12)

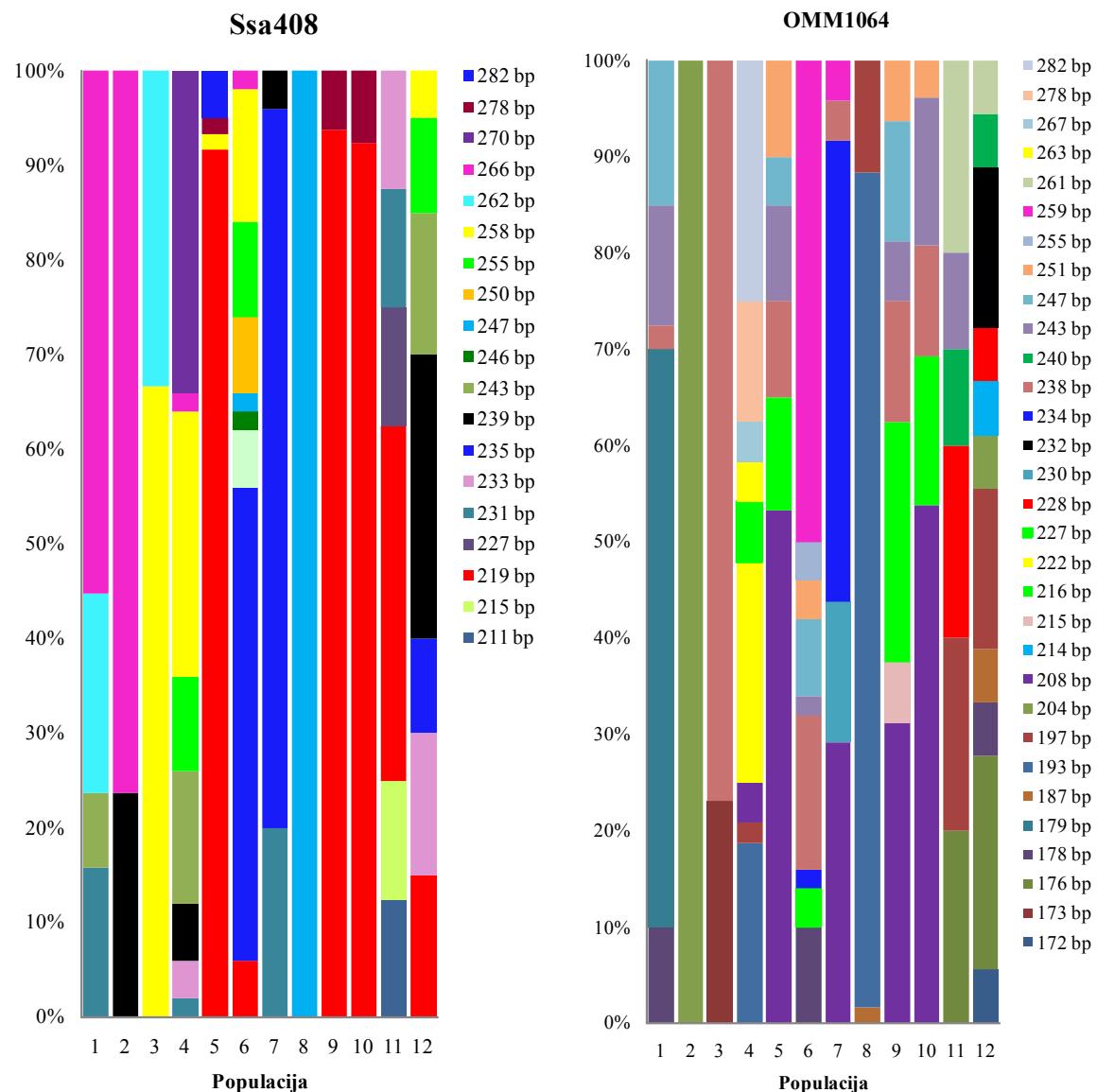
Najpogosteji alel mikrosatelita SsoSL438 pri čistih donavskih populacijah je dolg 103 bp, pri atlantskih pa 99 bp, 105 bp, 97 bp (Slika 10).



*1 Resniški p ,2 Izvir Dravinje, 3 Žlebe, 4 Kapusov p, 5 Mošenik, 6 Mislinja, 7 Suhadolnica, 8 Jahodnica, 9 MPB, 10 MPK, 11 Povodje, 12 Danska

Slika 11: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnem lokusu SsoSL417 pri čistih donavskih populacijah, mešani populaciji (11) in atlantski kontroli (12)

Alel dolg 181 bp je najpogosteji alel na lokusu SsoSL417 pri čistih donavskih populacijah, vendar je v skoraj 20 % prisoten tudi pri vzorcih iz danske ribogojnice. Aleli 173 bp, 175 bp, 177 bp, 191 bp in 197 bp se pojavlja samo pri atlantskih populacijah. Alela 158 in 194 se pojavljata samo v donavski populaciji (Slika 11).



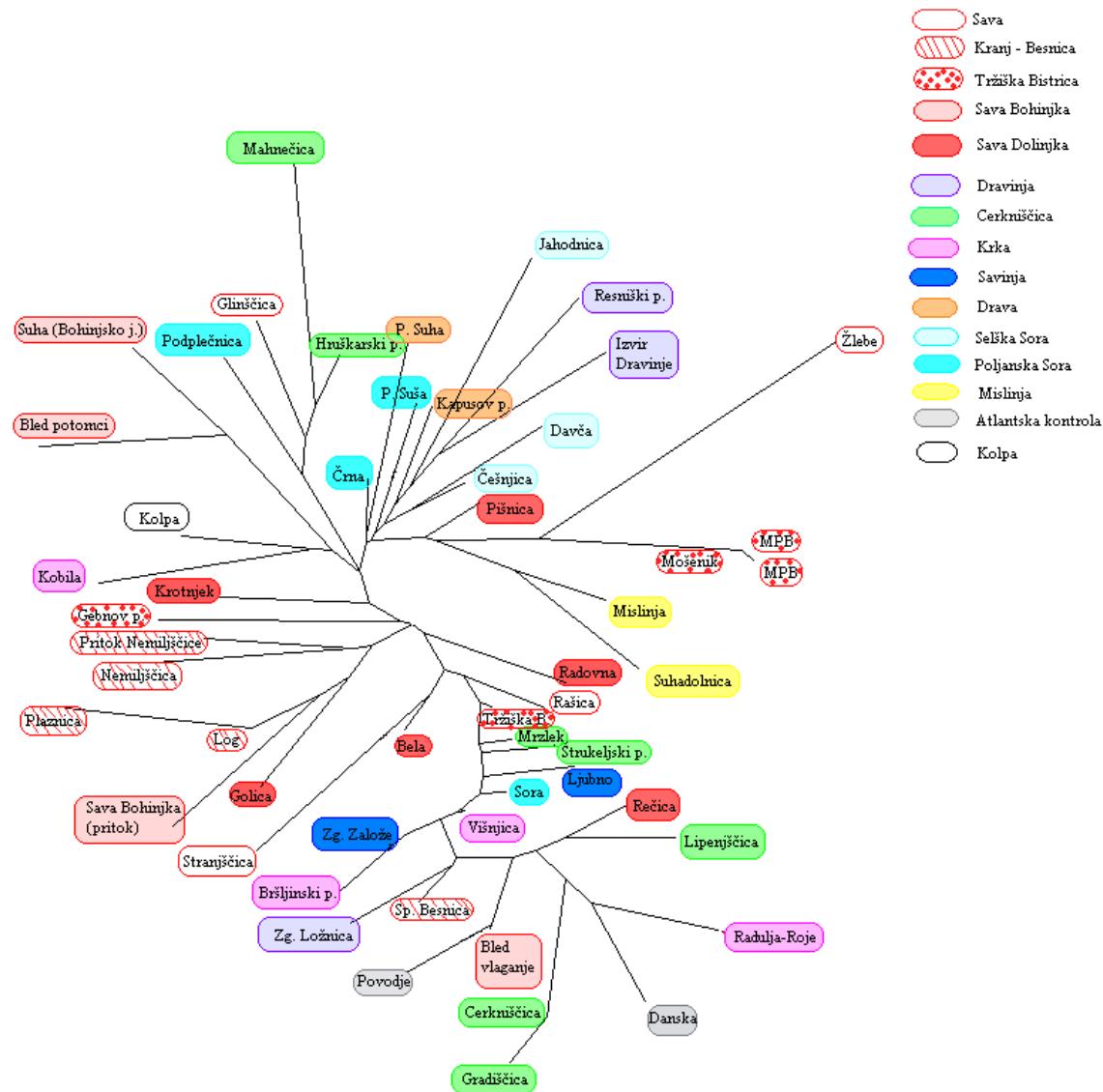
*1 Resniški p ,2 Izvir Dravinje, 3 Žlebe, 4 Kapusov p, 5 Mošenik, 6 Mislinja, 7 Suhadolnica, 8 Jahodnica, 9 MPB, 10 MPK, 11 Povodje, 12 Danska

Slika 12: Delež in dolžina alelov na mikrosatelitnih lokusih Ssa408 in OMM1064 pri čistih donavskih populacijah, mešani populaciji (11) in atlantski kontroli (12)

Veliko število alelov na mikrosatelitnih lokusih Ssa408 in OMM1064 kaže na to, da sta lokusa zelo polimorfna (Slika 12), zaradi česar ni mogoče določiti značilnega alela za posamezno linijo.

4.3.3 Filogenetsko drevo

Sorodstvene odnose med populacijami predstavljamo v obliki nekoreninjenega filogenetskega drevesa (Slika 13).

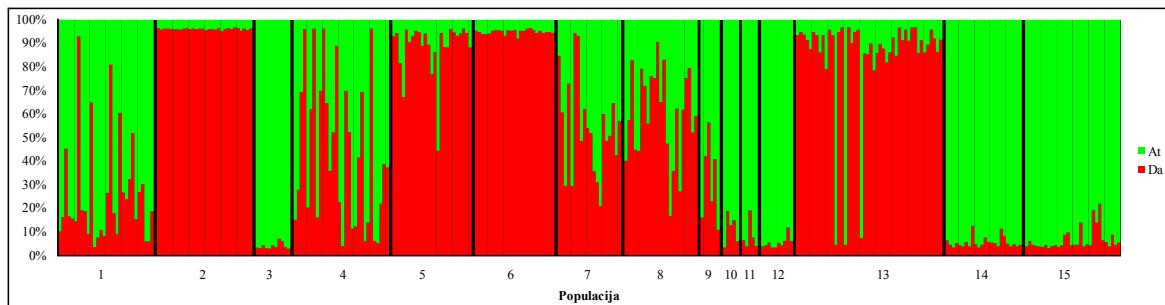


Slika 13: Filogenetsko drevo, ki predstavlja sorodstvene odnose med analiziranimi populacijami potočne postrvi. Populacije so obarvane glede na glavne reke oz. lokacije.

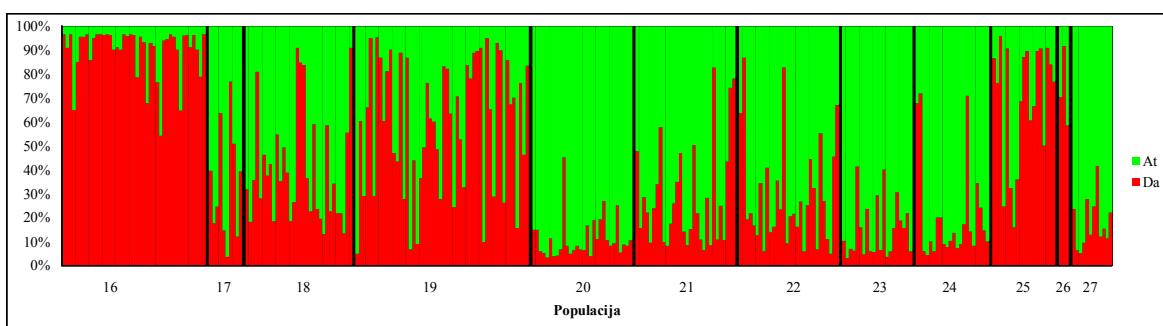
Iz filogenetskega drevesa (Slika 13) je razvidno, da so si populacije, za katero so bili značilni donavski mtDNK haplotip in donavski aleli na jedrnih označevalcih, sorodne. Na drugi strani pa skupno klado tvorijo referenčne atlantske populacije in nekaj divjih populacij potočne postrvi, za katere so bili značilni haplotipi in aleli atlantskega izvora. Razporeditev populacij na filogenetskem drevesu ni odvisna od geografske povezanosti populacij (Preglednica 1, Slika 28).

4.3.4 Populacijske strukture

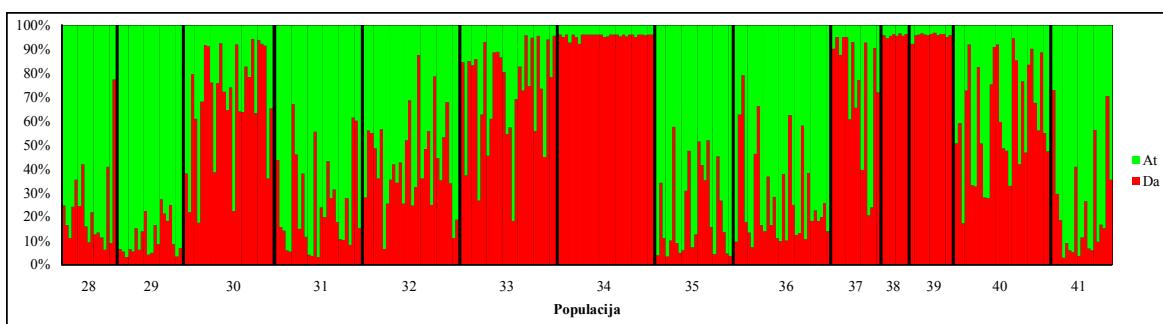
S programom STRUCTURE smo ovrednotili število populacijskih struktur, oz. genetskih skupin znotraj vseh analiziranih vzorcev. Najverjetnejše število skupin med analiziranimi vzorci je dve ($K=2$). Prva skupina predstavlja genetsko čiste donavske postrvi (na sliki rdeče), druga genetsko enotna skupina pa predstavlja vložene potočne postrvi (na sliki zelene) (Slika 14, 15, 16 in 17). Večina populacij je mešanih, kar pomeni, da je pri večini osebkov del genetskega materiala avtohtonega, del pa od vloženih postrvi atlantskega izvora (Preglednica 5).



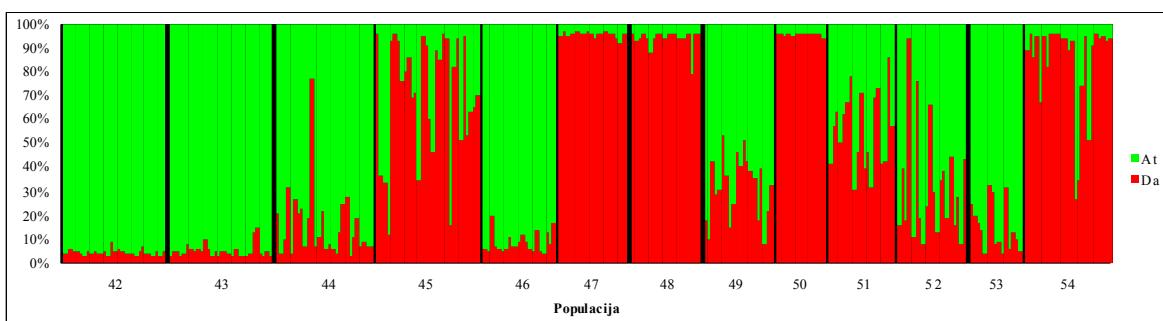
Slika 14: Rezultati programa STRUCTURE za naslednje populacije: 1-Mahnečica, 2-Mošenik, 3-Radulja - Roje, 4-Golica, 5-Mislinja, 6-Suhadolnica, 7-Log, 8-Nemiljščica, 9-Pritok Nemiljščice, 10-Zgornja Založnica, 11-Povodje, 12-Danska, 13-Ribogojnica Bled, 14-Lipenjščica, 15-Cerkniščica



Slika 15: Rezultati programa STRUCTURE za naslednje populacije: 16-Suha, 17-Tržiška Bistrica, 18-Radovna, 19-Kolpa, 20-Spodnja Besnica, 21-Potok ob Savi Bohinjki, 22-Bela, 23-Ljubno, 24-Mrzlek, 25-Davča, 26-Plaznica, 27-Gebnov potok



Slika 16: Rezultati programa STRUCTURE za naslednje populacije: 28-Rašica-Črnučica, 29-Zgornja Ložnica, 30-Hruškarski potok, 31-Štrukeljski potok, 32-Krotnjek, 33-Češnjica, 34-Jahodnica, 35-Višnjica, 36-Podplečnica, 37-Pišnica, 38-Mošenik PB, 39-Mošenik PK, 40-Potok Suša, 41-Stranjščica



Slika 17: Rezultati programa STRUCTURE za naslednje populacije: 42-Gradiščica, 43-Rečica, 44-Sora, 45-Črna, 46-Bled-vlaganje, 47-Resniški potok, 48-Izvir Dravinje, 49-Kobila, 50-Žlebe, 51-Potok Suha, 52-Glinščica, 53-Bršljinski potok, 54-Kapusov potok

Med analiziranimi populacijami so se kot genetsko čiste izkazale naslednje: 2-Mošenik, 38-Mošenik PB, 39-Mošenik PK, 5-Mislinja, 6-Suhadolnica, 16-Suha, 34-Jahodnica, 48-Izvir Dravinje, 47-Resniški potok, 50-Žlebe in 54-Kapusov potok. Poleg 11-Povodje (mešana populacija) in 12-Danska (atlantska populacija), ki sta kontrolni populaciji, smo v

Sloveniji našli tudi populacije, za katere je značilna le genetska struktura atlantskega izvora. Te populacije so: 3-Radulja-Roje, 10-Zgornja Založnica, 14-Lipenjščica, 15-Cerkniščica, 42-Gradiščica, 43-Rečica, 46-Bled-vlaganje.

V preglednici 5 predstavljamo povprečni delež »donavske« in »atlantske« genetske strukture v posamezni populaciji.

Preglednica 5: Povprečni delež »donavske« (Da) in »atlantske« (At) skupine v posamezni populaciji glede na analizo s programom STRUCTURE. Označene so vrednosti, ki presegajo 80 %.

	Populacija	Da	At
1	Mahnečica	0,26	0,74
2	Mošenik	0,96	0,04
3	Radulja-Roje	0,04	0,96
4	Golica	0,44	0,56
5	Mislinja	0,88	0,12
6	Suhadolnica	0,95	0,05
7	Log	0,55	0,45
8	Nemiljščica	0,60	0,40
9	Pritok Nemiljščice	0,32	0,68
10	Zg. Založnica	0,11	0,89
11	Povodje	0,08	0,92
12	Danska	0,05	0,95
13	Ribogojnica Bled	0,85	0,15
14	Lipenjščica	0,05	0,95
15	Cerkniščica	0,07	0,93
16	Suha	0,90	0,10
17	Tržiška Bistrica	0,34	0,66
18	Radovna	0,41	0,59
19	Kolpa	0,60	0,40
20	Sp. Besnica	0,12	0,88
21	Potok ob Savi Bohinjki	0,29	0,71
22	Bela	0,30	0,70
23	Ljubno	0,15	0,85
24	Mrzlek	0,21	0,79
25	Davča	0,69	0,31
26	Plaznica	0,74	0,26

se nadaljuje

nadaljevanje

	Populacija	Da	At
27	Gebnov potok	0,18	0,82
28	Rašica-Črnučica	0,23	0,77
29	Zg. Ložnica	0,12	0,88
30	Hruškarski potok	0,68	0,32
31	Štrukeljski potok	0,26	0,74
32	Krotnjek	0,42	0,58
33	Češnjica	0,72	0,28
34	Jahodnica	0,96	0,04
35	Višnjica	0,22	0,78
36	Podplečnica	0,28	0,72
37	Pišnica	0,73	0,27
38	Mošenik-PB	0,96	0,04
39	Mošenik-PK	0,96	0,04
40	Potok Suša	0,61	0,39
41	Stranjščica	0,23	0,77
42	Gradiščica	0,05	0,95
43	Rečica	0,05	0,95
44	Sora	0,15	0,85
45	Črna	0,71	0,29
46	Bled-vlaganje	0,09	0,91
47	Resniški potok	0,96	0,04
48	Izvir Dravinje	0,94	0,06
49	Kobila	0,32	0,68
50	Žlebe	0,96	0,04
51	Potok Suha	0,56	0,44
52	Glinščica	0,32	0,68
53	Bršljinski potok	0,15	0,85
54	Kapusov potok	0,85	0,16
<i>Povprečje</i>		0,46	0,54

Če določimo 80 % delež pripadnosti eni od genetskih skupin kot mejo, da populacijo uvrstimo med genetsko čiste donavske oz. atlantske, v donavsko skupino spada 11 populacij, v atlantsko pa 13 (brez Povodja in Danske) (Preglednica 5).

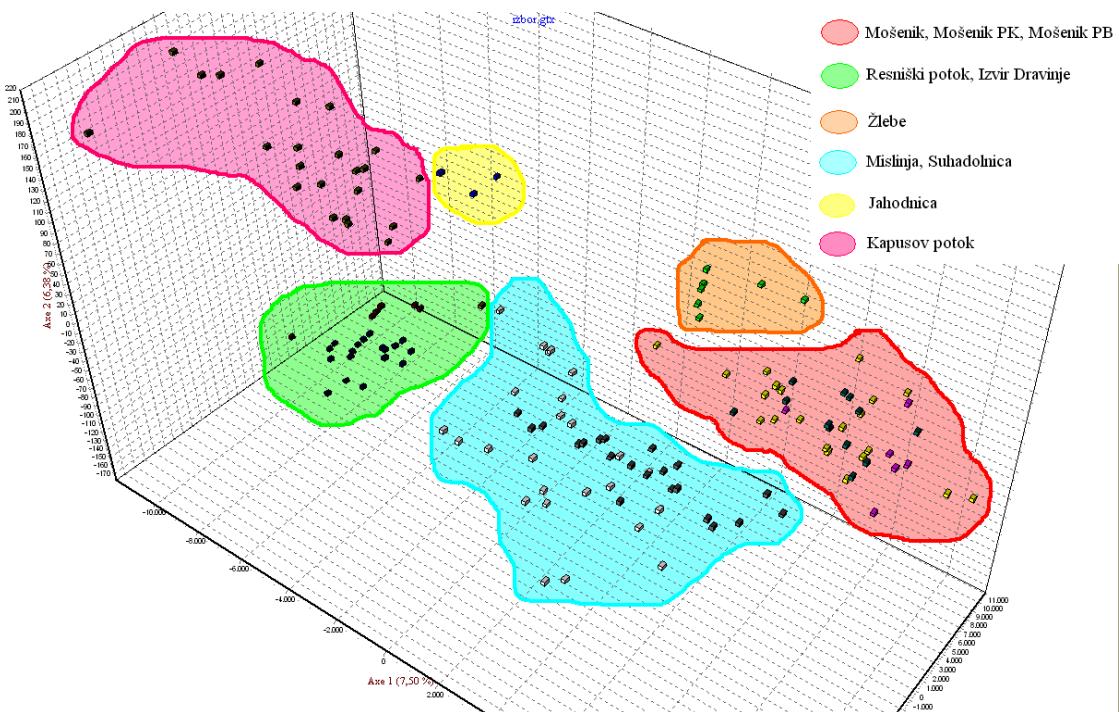
4.3.5 Sorodstveni odnosi med genetsko čistimi populacijami

Preko parametra Fst smo proučevali odnose med genetsko čistimi populacijami (Preglednica 6). Fst vrednosti so od 0,0092 do 0,8329. Najnižje vrednosti so med Mošenikom in MPK, saj gre praktično za en potok, najvišje Fst vrednosti ob primerjavi z drugimi populacijami ima Jahodnica. Vse populacije se paroma statistično signifikantno razlikujejo, razen populacij Mošenik, MPK in MBK, ki vse izhajajo iz geografsko zelo omejenega območja. Povprečna Fst vrednost med čistimi populacijami je 0,4408.

Preglednica 6: Vrednost Fst parnih primerjav čistih in skoraj čistih donavskih populacij potočnih postrvi na osnovi 5ih mikrosatelitnih lokusov (pod diagonalo) in statistična značilnost vrednosti Fst (nad diagonalo; NS – statistično neznačilno, *** - statistično značilno $p < 0,001$.).

	Mošenik	Mislinja	Suhadol nica	Jahod nica	MPB	MPK	Resniški p	Izvir Dravinje	Žlebe	Kapusov p
Mošenik	0,0000	***	***	***	NS	NS	***	***	***	***
Mislinja	0,2903	0,0000	***	***	***	***	***	***	***	***
Suhadol nica	0,3334	0,1514	0,0000	***	***	***	***	***	***	***
Jahod nica	0,6093	0,4886	0,6014	0,0000	***	***	***	***	***	***
MPB	0,0147	0,2545	0,3291	0,7304	0,0000	NS	***	***	**	***
MPK	0,0092	0,2832	0,3387	0,6833	0,0175	0,0000	***	***	***	***
Resniški p	0,4828	0,3314	0,4534	0,6564	0,4971	0,4830	0,0000	***	***	***
Izvir Dravinje	0,5621	0,4258	0,5406	0,8127	0,6646	0,6226	0,5194	0,0000	***	***
Žlebe	0,4768	0,4260	0,5540	0,8329	0,5216	0,5011	0,6262	0,7968	0,0000	***
Kapusov p	0,3201	0,1753	0,2836	0,4181	0,3213	0,3074	0,2918	0,3847	0,4295	0,0000

Sorodstvene odnose med posameznimi vzorci genetsko čistih populacij predstavljamo s korespondenčno analizo (Slika 18).



Slika 18: Korespondenčna analiza genetsko čistih in skoraj čistih donavskih populacij

Slika 18 nam pokaže, da so si populacije, ki so geografsko blizu, tudi genetsko sorodne.

4.4 FENOTIP POTOČNE POSTRVI V SLOVENIJI

Domesticirana atlantska postrv (Slika 19) v večini primerov nima rdečih pik, lahko pa se v manjšem številu pojavljajo po bokih pod pobočnico. Boke in hrbet ima srebrno-rjavosive barve in gosto posejane s črnimi pegami. Stransko stran trebuha imajo rumeno do rožnato. Za domesticirane in divje atlantske postrvi je značilna bela obroba analne in trebušnih plavuti (Slika 25). Divje atlantske postrvi so čisto drugačne od ribogojniške linije, populacije se močno razlikujejo med seboj, odvisno od okolja v katerem živijo. Donavski tip postrvi v Sloveniji pa ima značilne izrazite rdeče pike, ki so enakomerno porazdeljene nad in pod pobočnico, črne pike pa prevladujejo na hrbtu. Pike so belo obrobljene. Imajo rumenkasto-zeleno-rjav hrbet in boke (Slika 20, Slika 21, Slika 22, Slika 23, Slika 24). Križanci so zelo različni po videzu in imajo značilnosti obeh tipov (Slika 26, Slika 27).



Slika 19: Atlantska postrv iz ribogojnice Ente Tutela Pesca v Italiji (Razpet in Snoj, 2007)



Slika 20: Potočna postrv iz Mošenika (Tržič) - Donavska linija (MPB3; Database, 2010)



Slika 21: Potočna postrv iz Mislinje - Donavská linija (MIS10; Database, 2010)



Slika 22: Suhadolnica, Vernerca nad Suhim Dolom - Donavská linija (SUH7; Database, 2010)



Slika 23: Izvir Dravinje – Donavská linija (DRA13; Database, 2010)



Slika 24: Resniški potok – Donavská linija (Res10; Database, 2010)



Slika 25: Potočna postrv iz Gradiščice (Cerknica) – Atlantska linija (GRA22; Database, 2010)



Slika 26: Potočna postrv iz Davče (Železniki) – Križanec (DAV4; Database, 2010)

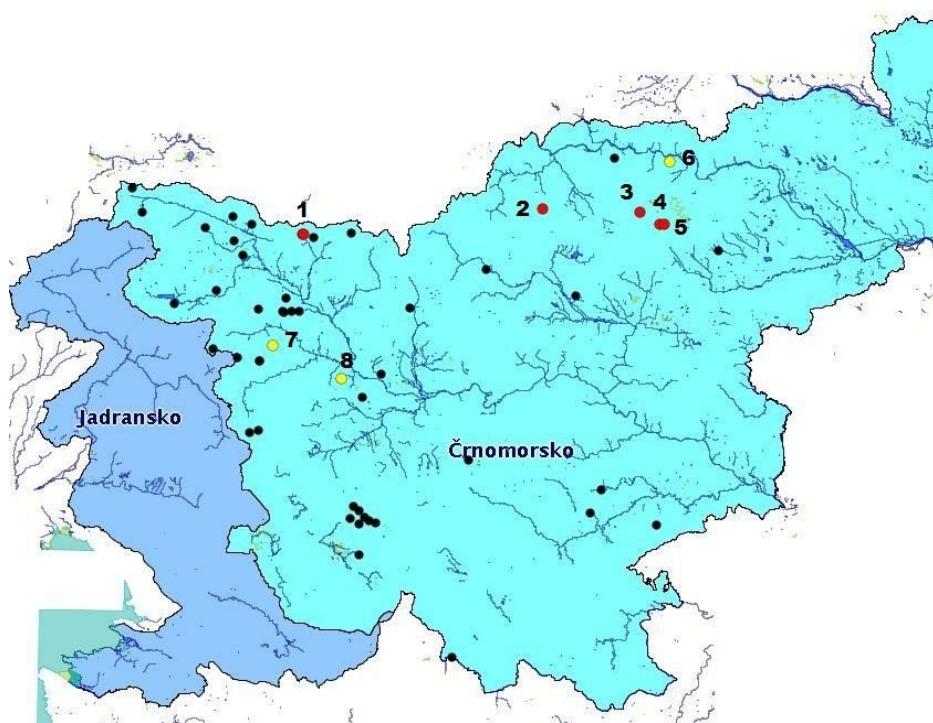


Slika 27: Potočna postrv iz Tržiške Bistrice (Tržič) – Križanec (TRB6; Database, 2010)

5 RAZPRAVA IN SKLEP

5.1 RAZPRAVA

Rezultati diplomske naloge kažejo, da je avtohtona potočna postrv v Sloveniji zelo ogrožena. V vseh rekah in potokih, kjer so in še vlagajo domesticirane ribogojniške potočne postrvi atlantskega tipa, je prišlo do križanja le teh z avtohtonimi potočnimi postrvmi. Čiste avtohtone donavske populacije potočne postrvi smo našli le v višje ležečih potokih, ki so z umetno ali naravno pregrado ločeni od potokov, v katerih se izvaja vlaganje. Čiste populacije donavskih postrvi so: Mošenik (tri lokacije, ki so ločene s hidroelektrarnami) kot edina čista populacija na Gorenjskem, ter Mislinja, Suhadolnica, Resniški potok in Izvir Dravinje na Štajerskem. Med čiste populacije smo uvrstili tudi populacije Žlebe, Jahodnica in Kapusov potok, čeprav smo pri posameznih osebkih na enem lokusu našli alel, značilen za domesticirano atlantsko postrv (Slika 28).



*1-Mošenik, 2- Suhadolnica, 3-Mislinja, 4-Izvir Dravinje, 5-Resniški potok, 6- Kapusov potok, 7-Jahodnica, 8-Žlebe

Slika 28: Lokacije vzorčenja: rdeče – genetsko čiste avtohtone populacije; rumene – pretežno genetsko čiste avtohtone populacije (< 85 % introgresije alohtonih genov); črne – genetsko mešane populacije

5.1.1 Analiza mtDNK, gena za somatolaktin in LDH

Rezultati analize mtDNK so kazali v prid donavski liniji; za skoraj polovico populacij je namreč značilno, da imajo vsi osebki donavski mtDNK haplotip. Ko pa smo rezultatom analize mtDNK dodali rezultate analize dveh jedrnih genov (SL in LDH), se je število populacij, za katere so značilni izključno donavski haplotipi oz. aleli, zelo zmanjšalo. Glede na te tri analizirane lokuse so genetsko čiste populacije: Mošenik, Mislinja, Suhadolnica, Resniški potok in Izvir Dravinje (Preglednica 3). Glede na majhen delež atlantskih alelov, ki se pojavljajo le na enem od teh treh lokusov, smo med tako imenovane čiste donavske populacije potočne postrvi uvrstili še populacije Jahodnica, Žlebe in Kapusov potok.

Ker se mtDNK deduje samo po materini liniji, jedrna pa po obeh spolih, naj bi pri mtDNK haplotipih štirikrat hitreje prihajalo do fiksacije oz. izgube haplotipa kot pri alelih jadrne DNK. Naši rezultati kažejo, da se v nekaterih genetsko mešanih populacijah, pri katerih smo na jadrni DNK našli pretežno atlantske alele (to je jasno razvidno iz rezultatov analiz SL in LDH), ohranja donavski haplotip mtDNK v visoki frekvenci ali je celo fiksiran. Očitno gre v teh primerih za omejen doprinos gamet ženskih vloženih domesticiranih osebkov.

Vzrok za to je lahko več: (1) material, s katerim poribljajo, je nastal kot posledica oplojevanja iker avtohtonih samic z »atlantskimi« samci, (2) obstaja selekcija naravnega okolja, ki deluje močneje na vložene neavtohtone samice kot na vložene neavtohtone samce; ribogojniško vzrejene potočne postrvi imajo v splošnem slabši fitnes v naravnem okolju v primerjavi z divjimi avtohtonimi postrvmi in za uspešno drst potrebujejo bistveno več prilagajanja na novo okolje, zato predpostavlja, da imajo ribogojniški samci v naravi več možnosti prenesti svoje gene v naslednjo generacijo kot ribogojniške samice (Hansen, 2002; Wills, 2006), (3) efekt ozkega grla; ta je možen, če gre za majhno genetsko mešano populacijo, v kateri so kot posledica drastičnega padca njene efektivne velikosti od samic preživele le avtohtone, od samcev pa prevladujoče neavtohtoni osebki.

5.1.2 Analiza mikrosatelitov

V analizo smo vključili pet mikrosatelitnih lokusov, le za enega od njih (lokus 10/2) pa je bilo predhodno znano, da vključuje alel (alel 116 bp), ki je v okviru donavske in atlantske linije postrvi značilen le za atlantsko (Slika 8, Slika 9). V pričujoči diplomski nalogi smo tudi na vseh preostalih lokusih našli alele, ki so bili značilni za atlantsko linijo postrvi. Zaradi manjšega števila referenčnih atlantskih vzorcev ne moremo privzeti, da so to za atlantsko linijo strogo diagnostični aleli, so pa diagnostični v okviru naše študije.

Ob primerjavi populacij čistih donavskih postrvi in referenčnih atlantskih vzorcev smo lahko določili tudi alele, ki so diagnostični za donavsko linijo postrvi v Sloveniji. Alel 103 bp na lokusu SsoSL438 je prisoten v vseh čistih donavskih populacijah in to kot prevladujoč alel; pri populacijah Izvir Dravinje, Žlebe, Suhadolnica in Jahodnica je ta alel fiksiran. Resniški potok v 65 % vsebuje alel 105 bp, ki ga ne najdemo v nobeni drugi populaciji. Prav tako je privatni alel značilen tudi za Mislinjo (alel 110 bp v 20 %) in Kapusov potok (alel 108 bp v 15 %) (Slika 10). Za populacijo Izvir Dravinje je na lokusu OMM1064 značilen alel 204 bp (fiksiran alel v tej populaciji) (Slika 12). Populaciji, ki sta glede diagnostičnih alelov skoraj popolnoma atlantskega izvora, sta Radulja – Roje in Gradiščica.

Zelo visok delež atlantskega genetskega ozadja (nad 80 % glede na STRUCTURE analizo) pa imajo še populacije: Zgornja Založnica, Lipenjščica, Cerkniščica, Spodnja Besnica, Ljubno, Gebnov potok, Zgornja Ložnica, Rečica, Sora, Bled-vlaganje in Bršljinski potok. Nad 80 % delež donavskega genetskega ozadja glede na STRUCTURE analizo imata poleg čistih in skoraj čistih populacij še populaciji iz Ribogojnice Bled in Suha.

Zanimivo je, da smo pri velikem številu populacij na lokusu 10/2 našli alel 124 bp, ki pa se je pokazal kot značilen za soško postrv. Raziskava Jug in sod. (2005) je vključevala manjše število populacij donavskega porečja, pri katerih so avtorji odkrili tudi alel 124 bp, vendar so sklepali, da je pri teh populacijah prišlo do introgresije soške postrvi. Ugotovimo lahko, da alel 124 bp ni diagnostičen alel za soško postrv, temveč se pojavlja tudi pri potočni postrvi in verjetno predstavlja prednisko obliko ali je produkt vzporedne evolucije.

Iz rezultatov je razvidno, da so čiste populacije manj polimorfne kot mešane. Povprečna heterozigotnost v posamezni populaciji je bila zelo visoka (Preglednica 4). Pod 0,5 so imele le genetsko čiste populacije, kar kaže na to, da so populacije majhne, izolirane in ni prišlo do križanja z alohtonimi postrvimi, ki bi v populacijo vneslo nove alele in s tem tudi višjo heterozigotnost. Vse populacije, tudi mešane, so v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (nobena statistično značilno ne odstopa od Hardy-Weinbergovega ravnotežja). To pomeni, da v populacijah ni podstruktur (npr. vložene in domače postrvi) in da med vsemi vzorci v populaciji poteka naključno parjenje.

S programom STRUCTURE smo analizirali rezultate analize mikrosatelitov (Slika 14 - 17). Kot najbolj verjetno se je izkazalo, da sta v celotni zbirki vzorcev prisotni dve genetsko različni skupini; ena je ustrezala genetsko čistim populacijam donavskih postrvi, druga pa referenčnim atlantskim vzorcem. Ker pa populacije iz danske ribogojnice nismo mogli določiti kot referenčne atlantske skupine - glede na naše kriterije, je le-ta imela namreč 95-odstotni delež atlantskih genov - nobena populacija teoretično ni mogla 100-odstotno pripadati le eni skupini, ampak največ v 96-ih odstotkih. Glede na naša analizo v povprečju v Sloveniji potočna postrv pripada donavski populaciji v 46-ih procentih, atlantski pa v 54-ih (Preglednica 5). Večina populacij potočne postrvi v Sloveniji je torej mešanih, kar se je odražalo tako v okviru posameznih populacij, kot tudi na ravni posameznih vzorcev; slednja ugotovitev ponovno potrjuje, da prihaja do križanja med avtohtonimi in vnesenimi osebkami. To je razvidno tudi iz filogenetskega drevesa (Slika 13), na katerem so čiste donavske populacije ločene od ostalih, se pa med seboj razlikujejo. Atlantske populacije so locirane na nasprotnem koncu drevesa, mešane pa so razprtene nekje vmes.

Fst vrednosti med populacijami potočne postrvi v Sloveniji so zelo visoke, med čistimi populacijami segajo tudi preko 0,8, kar kaže na to, da je variabilnost med slovenskimi populacijami postrvi zelo velika (Preglednica 6). Ker so pregledane genetsko čiste populacije zelo majhne, je možno, da je zaradi tega pri njih prišlo hitro do fiksacije oz. izginotja določenih alelov, kar bistveno doprinese k genetski različnosti med populacijami in k visokim Fst vrednostim.

Že iz filogenetskega drevesa in korespondenčne analize (Slika 18) je razvidno, da se čiste donavske populacije precej razlikujejo med sabo, sorodnejše so populacije z geografsko bližnjih lokacij. Tako npr. Resniški potok in izvir Dravinje vsebujejo genetsko zelo podobne osebke, tudi geografsko sta si blizu, prav tako Mislinja in Suhadolnica. Vzorci postrvi v posameznem potoku pa so si genetsko zelo podobni, na kar kaže nizko število alelov na posameznem mikrosatelitnem lokusu, kot tudi nizka heterozigotnost.

5.1.3 Genetsko zanimive populacije

Populacije **Mošenik**, **MPK**, **MPB** so populacije enega pritoka potoka Mošenik v Podljubelju, Tržič. Med seboj jih ločujejo hidroelektrarne in so ločene od gojitvenih potokov. Po vseh analizah je Mošenik genetsko čista donavska populacija (Preglednica 4). Povprečno število alelov v populacijah je 3,4, 2,8, 3,2, kar je dokaj nizko vendar pričakovano za majhno populacijo. Povprečna heterozigotnost je 0,6184, 0,4154 in 0,50, kar je dokaj visoka vrednost glede na to, da je populacija majhna in izolirana. Fst vrednosti med temi populacijami so zelo nizke, paroma se populacije statistično značilno ne razlikujejo. Našteta opažanja lahko razložimo s predpostavko, da med njimi prihaja do migracij in pretoka genov. Če vse tri populacije obravnavamo kot eno samo, je Fis vrednost -0,104 in statistično značilno ni različna od nič, torej so tudi vse tri populacije skupaj v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. Povprečno število alelov za vse tri populacije skupaj pa je 3,6. Vse tri populacije torej lahko vrednotimo kot eno genetsko homogeno populacijo.

Populaciji **Mislinja** in **Suhadolnica** sta lokacijsko dokaj blizu. Vse analize kažejo, da sta čisti donavski populaciji. Povprečno število alelov v populaciji Mislinje je 5,2, kar je zelo visoko ob primerjavi z drugimi čistimi populacijami, pri Suhadolnici pa 2,8. Povprečno heterozigotnost ima Mislinja 0,5280, Suhadolnica pa 0,3650. Te vrednosti kažejo na to, da je čista populacija iz Mislinje bolj polimorfna in ima verjetno tudi večjo efektivno velikost kot Suhadolnica. Fst vrednost med njima je dokaj nizka 0,1514, vendar statistično značilna. Glede na strukturo mikrosatelitnih alelov lahko ugotovimo, da populaciji nista dolgo ločeni, pa vendar ju ne moremo vrednotiti kot eno samo.

Tudi populaciji **Izvir Dravinje** in **Resniški potok** sta geografsko blizu skupaj in sta po vseh analizah genetsko čisti. Povprečno število alelov v populaciji Izvir Dravinje je 1,4, kar je zelo nizko, v Resniškem potoku pa 2,6. Izvir Dravinje ima povprečno heterozigotnost zelo nizko 0,0737, Resniški potok pa je bolj raznolik (povprečna heterozigotnost 0,3358). Populaciji sta si zelo različni, saj je Fst vrednost med njima 0,5194 in je visoko statistično značilna. Zaradi geografske bližine je vzrok za njuno genetsko različnost bolj verjetno to, da sta populaciji zelo majhni in je predvsem pri populaciji Izvir Dravinje zaradi naključnega toka alelov, parjenja v sorodstvu in morebitnih ozkih grl prišlo do fiksacije alelov na večini mikrosatelitnih lokusov, kot pa da sta populaciji že dolgo časa ločeni.

Jahodnica je domače ime za Črnovski potok in je pritok Selške Sore. Analize so pokazale, da je Jahodnica po mtDNK, SL in mikrosatelitih čista donavska populacija, analiza LDH pa kaže, da so v populaciji tudi aleli, ki so sicer značilni za atlantsko linijo postrvi. Zanimivo je, da je populacija po mikrosatelitih zelo enotna, kar je razvidno iz korespondenčne analize in nizkega povprečja števila alelov v populaciji, ki je 1,6. Tudi povprečna heterozigotnost je zelo nizka 0,0740; Fst vrednosti med čistimi populacijami pa kažejo, da je zelo različna od drugih. Glede na te rezultate lahko sklepamo, da je populacija že dolgo časa izolirana in da je nekoč prišlo do močnega zmanjšanja števila osebkov (ozko grlo: naravne katastrofe), kar je vplivalo na zmanjšanje variabilnosti znotraj populacije. Ozko grlo po morebitnem križanju z vneseno linijo atlantske postrvi in naključna fiksacija oz. zmanjšanje frekvence posameznih alelov ob tem bi lahko tudi bil vzrok za prisotnost atlantskega alela na lokusa za LDH. Pa vendar težko razložimo, kako je prišlo do izločitve atlantsko specifičnih alelov na vseh drugih lokusih in tudi atlantskega mtDNK haplotipa. Bolj verjetna je možnost, da je pri tej populaciji prišlo do mutacije na lokusu za LDH, ki je povzročila spremembo restrikcijskega mesta.

Žlebe so vas pri Medvodah, pravo ime potoka je Zakonjščica. Ta potok je čisti donavski po vseh analizah razen po mtDNK, po kateri sta dva osebka od 14-ih atlantska. Ker analizirani vzorci prihajajo iz odseka potoka, ki je od svojega spodnjega dela ločen z neprehodnim slapom, lahko verjamemo, da do migracije hibridne populacije, ki se nahaja nizvodno od slапu, ni moglo priti. Povprečno število alelov je 1,4, povprečna

heterozigotnost je 0,2256, kar je dokaj nizka glede na ostale populacije. Iz korespondenčne analize je razvidno, da je populacija enotna in izolirana. Prisotnost At haplotipa pri dveh vzorcih lahko razložimo tako, da je v preteklosti v populacijo bila vnešena samica, ki je imela atlantski mtDNK haplotip. Glede na to, da drugih atlantsko specifičnih alelov nismo našli, je ta samica verjetno že bila križanec. Ob križanju z avtohtonimi samci in ob predpostavki, da je populacija majhna (naključni tok alelov, ozko grlo, ...), so iz populacije v nekaj generacijah lahko popolnoma izginili aleli, specifični za atlantsko linijo, medtem ko se je mtDNK haplotip prav tako po naključju ohranil.

Kapusov potok je v bližini Lovrenca na Pohorju in spada v porečje Drave. Ta populacija je po vseh kriterijih čista avtohtona populacija z izjemo gena za SL, katerega »atlantski« alel se v populaciji pojavlja v 4-ih % (1 osebek od 25-ih), ter mikrosatelitnega lokusa 10/2 s frekvenco »atlantskega« alela 6 %. Povprečna heterozigotnost je 0,4553, povprečno število alelov pa 5,4, kar je relativno visoko. Fst vrednosti z drugimi čistimi populacijami so majhne, kar pomeni, da se ne razlikuje močno od drugih populacij. To kaže tudi graf korespondenčne analize, na katerem so vzorci iz populacije Kapusov potok dokaj razpršeni in niso tako enotni, kot vzorci ostalih čistih populacij. Populacija je variabilna, kar kaže, da je velika in da ni prišlo do zmanjšanja števila osebkov. Prisotnost atlantskih alelov je zelo nizka in le v jedrni DNK. To lahko razložimo s tem, da je v populacijo prišel atlantski ali mešani samček in prispeval svoje gene.

Radulja – Roje spada v porečje Krke in je skoraj atlantska populacija, ki pa je po mitohondrijski DNK 100 % donavska. Jedrna označevalca pa kažeta, da vsebuje pretežno atlantske ali križane osebke in nobenega donavskega. Povprečna heterozigotnost je 0,5455, povprečno število alelov pa 4,8. Program Strukture pa nam je pokazal, da pripada v povprečju kar v 96-ih % atlantski skupini. Tudi filogenetska analiza jo uvršča v atlantsko vejo, blizu postrvi iz Danske. Razlagamo si lahko, da ima ta populacija v celoti mitohondrijski haplotip značilen za donavsko postrv zato, ker se atlantske samice niso bile sposobne razmnoževati ali pa je populacija v celoti vložena. V ribogojnici pogosto formirajo matično jato iz avtohtonih samic, ki imajo torej donavski haplotip, samci pa so atlantskega izvora. Donavski haplotip mtDNK se tako ohranja v visoki frekvenci ali pa je

celo fiksiran, po drugi strani pa imajo pri ribogojniških linijah omejen doprinos gamete ženskih domesticiranih osebkov (glej tudi razlago na str. 47).

Gradiščica je pritok Cerkniščice, ki skoraj v celoti vsebuje atlantske postrvi. Po mtDNK in SL je populacija v celoti atlantska. Le en osebek od 30 je po LDH heterozigot. Analize mikrosatelitov kažejo, da je populacija kar v 95 % atlantska. To je videti v filogenetskem drevesu, saj je locirana na atlantskem področju, na isti veji kot populacija iz Cerkniščice. Povprečno število alelov v populaciji je 4,8, povprečna heterozigotnost pa 0,6097. Lahko sklepamo, da so v nenaseljen potok vložili le domesticirano linijo atlantske postrvi. Tej populaciji mora biti onemogočen stik z drugimi populacijami.

5.1.4 Potočna postrv v Evropskih državah

Avstrijski vodotoki so pretežno del donavskega porečja, vendar so dosedanje raziskave pokazale, da obstaja le nekaj gensko čistih, avtohtonih populacij, ki pripadajo donavskemu tipu potočne postrvi. Večinoma so križane z atlantskim tipom potočne postrvi, ki so jih več desetletij na veliko vlagali v reke na tem območju. Barić in sod. (2009) so vzorce pridobili iz gorskih potokov, ki so z naravno ali umetno pregrado ločeni od rek, v katere vlagajo gojeno potočno postrv. Izbrani potoki so pritoki rek Inn, Salzach in Drave, ki pripadajo donavskem porečju. Vzorce so dobili tudi iz dveh visokogorskih alpskih jezer, v katere so bile vložene potočne postrvi atlantskega tipa v 16. in 19. stoletju in ne vsebujejo donavskega haplotipa. Analizo so opravili na mitohondrijski DNK in na 10 mikrosatelitskih lokusih in ugotovili, da je na takoj majhnem območju zelo visoka stopnja haplotipske raznolikosti. Sedem populacij od 15ih je bilo 100 % donavskih, kar so opredelili kot avtohtoni genski material. Povprečno število alelov se je gibalo od 1,5 pri čisti populaciji do 8,1 pri mešani. Pri nas pa od 1,4 (Žlebe, Izvir Dravinje) do 13,2 (Sora) (Preglednica 4), kar kaže na to, da so postrvi v slovenskih rekah genetsko približno enako raznolike kot v Avstriji. Povprečna pričakovana heterozigotnost (He) je bila 0,042 do 0,915, kar je tudi primerljivo z vrednostmi v Sloveniji (He od 0,067 (Jahodnica) do 0,81 (Sora)). Povprečna vrednost Fst med populacijami, ki imajo donavski haplotip je bila 0,406, pri nas pa 0,44. Rezultati so si zelo podobni. Weiss in sod. (2001) na drugi strani pravijo, da obstaja možnost, da je tudi atlantska linija v Avstriji avtohtona, ker sta Atlantsko in Donavsko porečje zelo blizu. Do združitve naj bi prišlo po obdobju zadnje

poledenitve in zato imajo lahko donavske linije atlantske alele. Našli so redek atlantski haplotip v zgornjem toku Donave. Ugotovili so, da je frekvenca atlantskega haplotipa (46 %) na severu Donave večja kot na jugu (32 %), kar kaže na to, da je prišlo do naravne kolonizacije v pleistocenu. Vendar Barić in sod. (2009) dvomijo v to teorijo, saj je bila napisana na podlagi analize mtDNK, ki pa ne pokaže genetske integritete in introgresije pri križancih. Poleg tega so v Barićevi raziskavi našli gensko čist potok z donavsko linijo blizu atlantskega porečja, kar nakazuje, da sta liniji ločeni in je vzrok prisotnosti atlantskih alelov le človek. V Franciji so naredili analizo SNPjev v rekah na območju Pirenejev in odkrili, da je vlaganje atlantske linije pustilo velik pečat. Njihova avtohtonata potočna postrv je mediteranska linija. Stopnja introgresije atlantskih alelov je bila 0 – 77 %, saj so bili višjeležeči potoki popolnoma čisti, spodnji deli rek pa so bili mešani (Berrebi in sod, 2000). Podobne raziskave so opravili po vsej Evropi in povsod so prišli do podobnih rezultatov kot pri nas, da so avtohtone populacije zaradi vlaganja domesticiranih linij potočnih postrvi zelo ogrožene.

5.1.5 Opazovanje fenotipa

Postrvi donavskega porečja se zaradi raznolikega okolja, v katerem živijo, med seboj zelo razlikujejo po svojem videzu. Zaradi vnašanja atlantskih postrvi v donavsko porečje, ki v zahodni Evropi traja že več kot stoletje, pri nas pa se je z vso močjo razmahnilo v zadnjih dvajsetih letih, so se v donavskem porečju pojavili križanci, ki jih je po videzu včasih težko razlikovati od avtohtonih in vnesenih postrvi.

V okviru diplomske naloge smo pregledali preko 1000 fotografij postrvi. V rezultatih navedene značilnosti donavske in atlantske linije postrvi lahko potrdimo. Opazili smo, da imajo postrvi atlantske linije pri strani rumen trebuh, donavske pa belega do sivega. Opaziti je tudi, da imajo atlantske postrvi (Slika 25) bolj gosto posejane pike. Če pogledamo celotno populacijo v enem potoku, opazimo, da so si ribe iz genetsko čistih populacij po videzu zelo podobne (Slika 20, Slika 21, Slika 22, Slika 23, Slika 24). Od genetsko čistih populacij izstopa le Izvir Dravinje (Slika 23), v katerem imajo ribe zelo izrazite in številčne rdeče pike. V genetsko mešanih populacijah pa so postrvi zelo različne; razlikujejo se po barvi celotnega telesa, ter obliki, barvi, številu in razporejenosti pik (Slika 26, Slika 27).

5.2 SKLEP

V raziskavi smo na podlagi različnih molekularnih označevalcev našli pet genetsko čistih donavskih populacij potočne postrvi in tri populacije, ki so skoraj čiste. Dve populaciji sta skoraj popolnoma atlantski, ostale pa so več ali manj mešane. Čiste populacije so med seboj zelo različne in jih je potrebno ohraniti, saj je vsaka zase edinstven in zelo dragocen genetski material. Vse skupaj predstavljajo ključni material, katerega uporaba bi lahko doprinesla k izboljšanju katastrofalne situacije, v kateri se je znašla avtohtonata potočna postrv v Sloveniji. V Sloveniji bi bilo potrebno namesto podpornega vlaganja, ki vključuje poribljanje z ribogojniško vzrejenim ribjim materialom, v potokih, kjer živi genetsko čista donavska postrv, izvajati tako imenovano dopolnilno vlaganje, kar pomeni, da za material, s katerim nameravamo poribljati, pridobimo neposredno preko smukanja avtohtonih divjih potočnih postrvi, na kar oplojene ikre ali mladice vložimo v isti rečni sistem. Druga možnost pa je podporno vlaganje, za katerega je seveda potrebno uporabljati primeren plemenski material iz genetsko čiste populacije, z lokalnimi posebnostmi čistih donavskih postrvi in mora zato biti geografsko omejen. Praksa, ki temelji na poribljanju vseh salmonidnih voda v Sloveniji zgolj na omejenem številu ribogojniško vzrejenih potočnih postrvi je izrazito škodljiva tako v naravovarstvenem kot tudi ekonomskem smislu: s tem bi namreč okrnili genetsko pestrost potočnih postrvi, ki je v Sloveniji zelo velika. Poleg tega so specifične populacije prilagojene na določeno okolje in se verjetno ne bi dobro prilagodile v drugem okolju; preživetvena sposobnost, rast in razmnoževanje tako ne bi bili optimalni, zaradi česar posledično tudi ne bi bili izpolnjeni pričakovani cilji poribljanja.

6 POVZETEK

V Slovenskem donavskem porečju je avtohtona donavska potočna postrv. Zaradi množičnega ribolova, naravnih katastrof in uničevanja narave je velikost populacij postrvi začela upadati, zato v zadnjih desetletjih vršijo dopolnilno vlaganje. Za podporno vlaganje s potočnimi postrvimi uporabljajo domesticirane neavtohtone potočne postrvi atlantske filogenetske linije. Te se uspešno križajo z avtohtonimi potočnicami, ki pripadajo donavski filogenetski liniji in katerih genetska identiteta ter fizični obstoj postajata zaradi tega ogrožena. Že predhodne genetske raziskave so pokazale, da je donavska potočna postrv v Sloveniji zelo ogrožena in da slovenske reke naseljujejo križanci in atlantske postrvi.

Da bi identificirali genetsko čiste vire avtohtone potočnice in ocenili njeno splošno »onesnaženost« z neavtohtonimi geni, smo preučevali genetsko strukturo 52 populacij potočne postrvi v savskem in dravskem porečju v Sloveniji. Analizirali smo mitohondrijsko DNK, dva jedrna gena (gena za somatolaktin in LDH) in pet mikrosatelitnih lokusov (10/2, OMM1064, Ssa408, SsoSL417, SsoSL438). Na osnovi dobljenih podatkov in statističnih analiz (pri tem smo uporabljali programe GENETIX, FSTAT, POPULATIONS in STRUCTURE) smo ugotovili, da je izmed vseh testiranih populacij le pet takih, ki so genetsko čiste (Mošenik, Izvir Dravinje, Resniški potok, Mislinja in Suhadolnica), tri populacije imajo zelo visok avtohton genetski delež (nad 85 %; Žlebe, Jahodnica in Kapusov potok), medtem ko je bilo večina populacij mešanih, pri nekaterih pa so celo skoraj v celoti prevladovali neavtohtoni geni atlantskega izvora. Vse preučevane čiste avtohtone populacije, ki smo jih praviloma našli v odročnih in izoliranih zgornjih tokovih, so genetsko zelo homogene, medtem ko so med njimi genetske razlike velike. V mešanih populacijah nismo zasledili populacijskih substruktur, temveč dokaze o vsesplošnem križanju. Dobljeni rezultati kažejo, da ima vlaganje ribogojniških atlantskih postrvi velik vpliv na avtohtono populacijo ter da je stanje avtohtone potočne postrvi v Sloveniji izrazito kritično. Da bi ohranili avtohtone genetsko čiste populacije potočne postrvi in izboljšali stanje v genetsko mešanih populacijah, bi bilo potrebno takoj prenehati z vlaganjem podmladka atlantske linije postrvi in začeti s podpornim ali dopolnilnim vlaganjem, ki bi temeljilo na vlaganju potomcev iz genetsko čistih populacij na geografsko omejenem območju.

7 VIRI

- Allendorf F.W., Leary R.F. 1988. Conservation and distribution of genetic variation in a polytypic species, the cutthroat trout. *Conservation Biology*, 2: 170-184
- Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 613-622
- Almodóvar A., Nicola G.G., Elvira B., García-Marín J.L. 2006. Introgression variability among Iberian brown trout Evolutionary Significant Units: the influence of local management and environmental features. *Freshwater Biology*, 51, 6: 1175-1187
- Apostolidis A.P., Triantaphyllidis C., Kouvatzi A., Economidis P.S. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology*, 6: 531-542
- Arlinghaus R., Mehner T., Cowx I.G. 2002. Reconciling traditional inland fisheries management and sustainability in industrialized countries, with emphasis on Europe. *Fish and Fisheries*, 3: 261-316
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunders R.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA and bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522
- Barić S., Riedl A., Meraner A., Medgyesy N., Lackner R., Pelster, B., Dalla Via J. 2009. Alpine headwater streams as reservoirs of remnant populations of the Danubian clade of brown trout. *Freshwater Biology*, 55, 4: 866-880
- Behnke R.J. 1986. Brown Trout. *Trout*, 27: 42-47
- Belkhir K., Borsig P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. 1996–2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Montpellier: Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II. <http://www.univ-montp2.fr/genetix> (8. avg. 2010)
- Bernatchez L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55, 2: 351-379
- Bernatchez L., Danzmann R.G. 1993. Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Molecular Biology and Evolution*, 10: 1002-1014
- Bernatchez L., Guyomard R., Bonhomme F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1: 161-173

- Berrebi P., Poteaux C., Fissier M., Cattaneo-Berrebi G., 2000. Stocking impact and allozyme diversity in brown trout from Mediterranean southern France. *Journal of Fish Biology*, 56: 949-960
- Brown W.M., Prager E.M., Wang A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 225-239
- Chat J., Manicki A., Merchermek N. 2008. Typing for brown trout LDH-C1* alleles together with microsatellites by automated sequencing. *Concervation Genetics*, 9, 6: 1669-1671
- Clyton D.A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28: 693-705
- Crespi B., Fulton M.J. 2004. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 658-679
- Crivelli A.J. 1995. Are fish introductions a threat to endemic freshwater fishes in the northern Mediterranean region? *Biological Conservation*, 72, 2: 311-320
- Database. 2010. Balkan trout restoration group. Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta. Oddelek za zootehniko.
<http://www.bfro-uni-lj.si/uba/apex/f?p=114:5:1668083088432908::NO> (8. avg. 2010)
- Delling B., Doadrio I. 2005. Systematics of the trouts endemic to Moroccan lakes, with description of a new species (Teleostei: Salmonidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 16: 49-64
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 8: 2611-2620
- Ford M.J. 2000. Effects of natural selection on patterns of DNA sequence variation at the transferrin, somatolactin, and p53 genes within and among chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) populations. *Molecular Ecology*, 9: 843-855
- Gyllensten U., Wilson A.C. 1988. Mitochondrial DNA of salmonids. V: Population Genetics and Fishery Management. Seattle, Washington press: 301-317
- Goldstein D.B., Schlötterer C. 1999. Microsatellites: evolution and applications. Oxford, Oxford University Press: 352 str.
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
<http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html> (8. avg. 2010)
- Hansen M.M. 2002. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology*, 11: 1003-1015

- Hansen M.M., Loeschke V. 1994. Effects of releasing hatchery-reared brown trout to wild trout populations. *Conservation Genetics*. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag: 273-290
- Jug T., Berrebi P., Snoj A. 2005. Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout populations as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation*, 123: 381-388
- Kruglyak L., Nickerson D.A. 2001. Variation is the spice of life. *Nature Genetics*, 27: 234-236
- Kottelat M., Freyhof J. 2007. *Handbook of European freshwater fishes*. Cornol, Switzerland. Publications Kottelat: 646 str.
- Lagler K.F. 1977. *Freshwater Fishery Biology*. Dubuque, WM. C. Brown Company Publishers: 19-35
- Laikre L. 1999. Hereditary defects and conservation genetic management of captive populations. *Zoo Biology*, 18: 81-99
- Langella O. 2002. *Populations*, 1.2.28 (12.5.2002). Copyright 1999. Olivier Langella. Gif-sur-Yvette: CNRS UPR9034
- Largiader C.R., Scholl A. 1996. Genetic introgression between native and introduced brown trout *Salmo trutta L.* populations in the Rhone River Basin. *Molecular Ecology*, 5: 417-426
- Lerceteau-Köhler E., Weiss S. 2006. Development of multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potential application for the genus. *Aquaculture*, 258: 641-645
- Lucentini L., Palomba A., Gigliarelli L., Lancioni H., Viali P., Panara F. 2006. Genetic characterization of a putative indigenous brown trout (*Salmo trutta fario*) population in a secondary stream of the Nera River Basin (Central Italy) assessed by means of three molecular markers. *Italian Journal of Zoology*, 73, 3: 263-27
- Maitland P.S. 1995. The conservation of freshwater fish: past and present experience. *Biological Conservation*, 72: 259-270
- McMeel O.M., Hoey E.M., Ferguson A. 2001. Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1*90 and *100 alleles. *Molecular Ecology*, 10: 29-34
- Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping science. *Science*, 235: 1616-1622
- Nelson J.S. 1984. *Fishes of the world*. New York, John Wiley and Sons: 600 str.

- O'Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K., Wright J.M. 1996. Rapid analysis of genetic variations in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 53: 2292–2298
- Philippart J.C. 1995. Is captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? Biological Conservation, 72: 271–296
- Phillips R.B., Oakley T.H. 1997. Phylogenetic relationships among the Salmoninae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. Molecular Systematics of Fishes. San Diego, Academic Press: 145-161
- Povž M., Sket B. 1990. Naše sladkovodne rive. Ljubljana, Mladinska knjiga: 84-89
- Presa P., Guyomard R. 1996. Conservation of microsatellites in tree species of salmonids. Journal of Fish Biology, 49: 1326-1329
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155: 945-959
- Razpet A., Snoj A. 2007. O genetsko čistih in avtohtonih potočnicah donavskega porečja. Ribič, 12: 334-335
- Razpet A., Sušnik S., Jug T., Snoj A. 2007. Genetic variation among trout in the River Neretva basin, Bosnia and Herzegovina. Journal of Fish Biology, 70 (Supplement A): 94-110
- Schoffmann J., Susnik S., Snoj A., 2007. Phylogenetic origin of *Salmo trutta* L 1758 from Sicily, based on mitochondrial and nuclear DNA analyses. Hydrobiologia, 575: 51-55
- Snoj A. 2004. Filogenetska struktura postrvi (*Salmo trutta L.*) v Sloveniji. Ribič, 10: 239-243
- Snoj A., Glamuzina B., Razpet A., Zablocki J., Bogut I., Lerceteau-Köhler E., Pojskić N., Sušnik S. 2010. Resolving taxonomic uncertainties using molecular systematics: Salmo dentex and the Balkan trout community. Hydrobiologia, 651: 199-212
- Snoj A., Jug T., Melkič E., Sušnik S., Pohar J., Dovč P., Jesenšek D., Budihna N. 2000. Mitochondrial and microsatellite DNA analysis of marble trout in Slovenia. Journal of Freshwater Biology. Quaderni ETP, 29: 5-11
- Snoj A., Melkič E., Sušnik S., Muhamedagić S., Dovč P. 2002. DNA phylogeny supports revised classification of *Salmothymus obtusirostris*. Biological Journal of the Linnean Society, 77: 399-411.
- Snoj A., Pohar J., Dovč P. 1997. Rapid communication: The first microsatellite DNA marker for marble trout, BFRO 001. Journal of Animal Science, 75: 1983 str.

- Sušnik S., Snoj A., Pohar J., Dovč P. 1997. The microsatellite marker (BFRO 002) characteristic for different geographically remote brown trout, *Salmo trutta* L., populations. Animal Genetics, 28: 370-383
- Sušnik S., Snoj A., Wilson I., Mrdak D., Weiss S. 2007. Historical demography of brown trout (*Salmo trutta*) in the Adriatic drainage including the putative *S. letnica* endemic to lake Ohrid. Molecular Phylogenetics and Evolution, 44: 63-76
- Svetina M., Pavšič P. 1987. Sladkovodno ribištvo na Slovenskem. Ribiški zbornik. Druga dopolnjena izdaja. Ljubljana, Ribiška zveza slovenije: 343 str.
- Vuković T. 1982. Sistematika riba. Sladkovodno ribarstvo. Zagreb, Jumena: 105-112
- Weir B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38, 6: 1358-1370
- Weiss S., Schmutz S. 1999. Response of resident brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout. Fisheries Management and Ecology, 6: 365-375
- Weiss S., Schlötterer C., Waidbacher H., Jungwirth M. 2001. Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish – by man or nature? Molecular Ecology, 10: 1241-1246
- Wills T.C. 2006. Comparative Abundance, Survival, and Growth of One Wild and Two Domestic Brown Trout Strains Stocked in Michigan Rivers. North American Journal of Fisheries Management, 26: 535-544

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Simoni Sušnik in somentorju dr. Alešu Snoju, ker sta mi omogočila izdelavo diplomske naloge in mi zelo veliko pomagala tako pri pisanju, kot tudi delu v laboratoriju. Hvala za ves trud in razumevanje.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Juretu Poharju in predsedniku komisije prof. dr. Ivanu Štuhcu za pregled in popravke diplomske naloge.

Zahvaljujem se dr. Andreju Razpetu za pomoč pri analizi mikrosatelitov.

Zahvaljujem se Zavodu za ribištvo Slovenije, RD Tržič in še posebej gospodarju RD Tržič Janezu Čadežu za vzorce in informacije o lokacijah.

Zahvaljujem se sodelavcem v genetskem laboratoriju za pomoč pri laboratorijskih analizah. Hvala Gašper P., Rok K., Tatjana K., Vida Š., Urška S., Anja P.,...

Hvala za podporo fantu, družini, sošolcem in prijateljem.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Klavdija BOGATAJ

**ANALIZA GENETSKE ČISTOSTI POPULACIJ
AVTOHTONE POTOČNE POSTRVI (*SALMO
TRUTTA*) V SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010