

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Živa FIŠER PEČNIKAR

**OCENA VARSTVENEGA STATUSA
BLAGAJEVEGA VOLČINA (*Daphne blagayana*) S
FILOGEOGRAFSKO ANALIZO**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Živa FIŠER PEČNIKAR

**OCENA VARSTVENEGA STATUSA BLAGAJEVEGA VOLČINA
(*Daphne blagayana*) S FILOGEOGRAFSKO ANALIZO**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ASSESSMENT OF THE CONSERVATION STATUS OF
BLAGAY'S DAPHNE (*Daphne blagayana*) WITH
PHYLOGEOGRAPHIC ANALYSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija Bioloških in biotehniških znanosti s področja Varstva naravne dediščine na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskave so bile opravljene v Laboratoriju za molekularno ekologijo Znanstveno-raziskovalnega središča Univerze na Primorskem.

Po sklepu Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani je bila tema disertacije sprejeta 11. 5. 2011.

Za mentorico disertacije je bila imenovana izr. prof. dr. Elena Bužan.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Robert Brus

Član: doc. dr. Martina Bačič

Član: doc. dr. Petra Košir

Datum zagovora: 19. 10. 2015

Podpisana izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Živa Fišer Pečnikar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 582(043.2)=163.6
KG	<i>Daphne blagayana</i> /kloroplastna DNA/AFLP/filogeografija/varstvena biologija/Balkanski polotok
KK	
AV	FIŠER PEČNIKAR, Živa, univ. dipl. biolog, mag. znanosti
SA	BUŽAN, Elena (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje varstva naravne dediščine
LI	2015
IN	OCENA VARSTVENEGA STATUSA BLAGAJEVEGA VOLČINA (<i>Daphne blagayana</i>) S FILOGEOGRAFSKO ANALIZO
TD	Doktorska disertacija
OP	XIV, 128 str., 19 pregl., 22 sl., 4 pril., 215 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Blagajev volčin (<i>Daphne blagayana</i>) je nizka polegla grmovnica iz družine volčinovk (Thymelaeaceae). Zaradi svoje redkosti je praktično v vseh državah, v katerih se pojavlja, zavarovan z nacionalnimi akti. Namen naloge je bil ovrednotiti varstveni status Blagajevega volčina na podlagi različnih molekularnih markerjev. Današnji areal Blagajevega volčina je fragmentiran in obsega Balkanski polotok in južne romunske Karpatе. Način nastanka fragmentiranih nahajališč ni znan. Po eni od razlag naj bi Blagajev volčin v interglacialu zasedal strnjen areal in se iz njega širil proti severu in severozahodu, po drugi pa naj bi bila fragmentirana severna nahajališča posledica razkosanja v glacialu in kot taka naj bi se ohranila do danes. Način nastanka izoliranih populacij igra vlogo pri znotrajpopulacijski in medpopulacijski genski variabilnosti, kar posledično vpliva tudi na varstvo vrste. Vzorčenje Blagajevega volčina je potekalo na 21 lokacijah znotraj celotnega areala vrste v letih 2009 in 2010. Kot orodje za oceno varstvenega statusa smo uporabili kloroplastno DNA ter AFLP markerje. V filogeografsko analizo smo vključili 95 rastlin iz vseh 21 populacij. Raziskava je temeljila na analizi petih medgenskih vmesnikov kloroplastne DNA: <i>rpl20-rps12</i> , <i>atpB-rbcL</i> , <i>trnL-F</i> , <i>psbA-trnH</i> ter <i>trnK-matK</i> skupaj z genom <i>matK</i> . Rezultati kažejo na obstoj treh skupin: severne skupine, ki vključuje slovenske in italijanske populacije, južne skupine, ki vključuje populacije iz Makedonije, Črne gore in Stolca (BiH) ter osrednje skupine, ki vključuje ostale vzorčene populacije. Tako haplotipna kot nukleotidna raznovrstnost sta najvišji v osrednji, najnižji pa v severni skupini. V drugem delu raziskave smo s pomočjo dominantnih AFLP markerjev ocenili genetsko strukturo izbranih 13 populacij ter ocenili genski pretok med njimi. Rezultati kažejo na razmeroma močno genetsko diferenciacijo vrste ($F_{ST} = 0,4$) in na odsotnost genskega pretoka med oddaljenimi populacijami. S pomočjo programov STRUCTURE in BAPS smo populacije razvrstili v skupine, ki pa niso popolnoma usklajene s skupinami glede na kloroplastno DNA. Neusklenjenost vzorcev, ki jih kažeta kloroplastna DNA in AFLP, lahko pripošemo različnim načinom razmnoževanja posameznih populacij ter različnemu načinu dedovanja kloroplastne in jedrne DNA. Na podlagi obeh markerskih sistemov lahko za Blagajev volčin predlagamo identifikacijo treh evolucijsko pomembnih enot (angl. Evolutionary significant units; ESU) in ene dodatne upravljaške enote (angl. Management units; MU), na katere bi se moralo osredotočiti varovanje vrste v prihodnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	UDC 582(043.2)=163.6
CX	<i>Daphne blagayana</i> /chloroplast DNA/AFLP/phylogeography/conservation biology/ Balkan peninsula
CC	
AU	FIŠER PEČNIKAR (FIŠER), Živa
AA	BUŽAN, Elena (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Protection of Natural Heritage
PY	2015
TI	ASSESSMENT OF THE CONSERVATION STATUS OF BLAGAY'S DAPHNE (<i>Daphne blagayana</i>) WITH PHYLOGEOGRAPHIC ANALYSIS
DT	Doctoral dissertation
NO	XIV, 128 p., 19 tab., 22 fig., 4 ann., 215 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Blagay's daphne (<i>Daphne blagayana</i>) is a small decumbent bush from the family Thymelaeaceae. Due to its rarity it is protected by national legislation in almost all countries within its range. The aim of this work was to assess the conservation status of Blagay's daphne (<i>Daphne blagayana</i>) throughout its distribution range, using chloroplast DNA (cpDNA) and AFLP markers. The present distribution of <i>D. blagayana</i> is fragmented and comprises the Balkan Peninsula and the southern Romanian Carpathians. However, the mechanism leading to such fragmented distribution range is not well understood. According to one interpretation, <i>D. blagayana</i> had a smaller distribution range during the interglacial, after which it expanded north and northwest. According to another interpretation, the fragmented areal is the result of fragmentation during the glacial and is still preserved today. The mechanisms leading to isolated populations play an important role in within-and between-population genetic variability, which in turn is relevant to species conservation. Sampling of <i>D. blagayana</i> was conducted at 21 locations across the entire distribution range in 2009 and 2010. cpDNA and AFLP markers were used as a tool for assessing its conservation status. The phylogeographic analysis included 95 plants from 21 populations. The study was based on the analysis of five spacer regions of chloroplast DNA: <i>rpl20-rps12</i>, <i>atpB-rbcL</i>, <i>trnL-F</i>, <i>psbA-trnH</i> and <i>trnK-matK</i> with the gene <i>matK</i>. The results suggest the existence of three clusters: the northern cluster (SLO), including Slovenian and Italian populations, the southern cluster (J), including populations from Macedonia, Montenegro and Stolac (BiH), and the central cluster (SR), including the remaining populations. Both haplotype and nucleotide diversity were highest in the central cluster and lowest in the northern cluster. In the second part of the study we assessed genetic structure and gene flow between 13 selected populations using dominant AFLP markers. The results showed a relatively strong genetic differentiation ($F_{ST} = 0.4$) and absence of gene flow among distant populations. Using programs STRUCTURE and BAPS populations were subdivided into 2 and 7 groups, respectively. The groupings proposed by STRUCTURE and BAPS are not fully congruent with cpDNA clusters. This incongruence might be attributed to different reproduction strategies within populations, and to different modes of inheritance of chloroplast and nuclear DNA. Based on both marker systems we can suggest the identification of three evolutionarily significant units (ESU) and one additional management unit (MU), on which conservation efforts should be focused in the future.</p>

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 DRUŽINA VOLČINOVK (THYMELAEACEAE) IN ROD <i>DAPHNE</i>	5
2.1.1 <i>Daphne blagayana</i> Freyer	6
2.2 BALKANSKI POLOTOK IN TERCIARNI RELIKTI	13
2.3 VARSTVENA GENETIKA OGROŽENIH RASTLINSKIH VRST	15
2.3.1 Pomen varstvene genetike pri varovanju vrst	15
2.3.2 Posledice spolnega in nespolnega načina razmnoževanje pri rastlinah	17
2.3.3 Molekulski markerji v filogeografskih in populacijskih študijah rastlin	19
3 MATERIAL IN METODE	30
3.1 VZORČENJE BLAGAJEVEGA VOLČINA	30
3.2 IZOLACIJA DNA IN DOLOČANJE KONCENTRACIJE	33
3.2.1 Kvantitativno določanje DNA s spektrofotometrom	33
3.2.2 Kvalitativno določanje DNA z gelsko elektroforezo	33
3.3 KLOROPLASTNA DNA	34
3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) in določanje nukleotidnih zaporedij	34
3.3.2 Obdelava podatkov kloroplastne DNA in statistična analiza	37
3.4 AFLP	40
3.4.1 Genotipizacija s pomočjo metode AFLP	40
3.4.2 Statistična obdelava podatkov AFLP in analiza genetske diverzitete	44
4 REZULTATI	47

4.1	KLOROPLASTNA DNA	47
4.1.1	Analiza mutacij	47
4.1.2	Prisotnost filogeografske strukture in razporeditev populacij v klastre	52
4.1.3	Haplotipna analiza	53
4.1.4	Demografska analiza populacij	66
4.2	AFLP ANALIZA	70
4.2.1	Opisna statistika	70
4.2.2	Genetske razdalje med populacijami	75
4.2.3	Genetska struktura	79
4.2.4	Analiza molekularne variance (AMOVA)	84
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	86
5.1	UPORABA MONONUKLEOTIDNIH MIKROSATELITOV KLOROPLASTNE DNA V FILOGEOGRAFSKIH RAZISKAVAH	87
5.2	NEUSKLAJENOST FILOGEOGRAFSKIH VZORCEV PRI KLOROPLASTNIH IN JEDRNIH MARKERJIH	89
5.3	GENETSKA DIVERZITETA POPULACIJ IN POVEZAVA Z NAČINOM RAZMNOŽEVANJA	91
5.4	GENSKI PRETOK MED POPULACIJAMI	94
5.5	RAZREŠEVANJE TAKSONOMSKIH NEJASNOSTI IN NARAVOVARSTVENE IMPLIKACIJE	95
5.6	SKLEPI	99
6	POVZETEK (SUMMARY).....	101
6.1	POVZETEK	101
6.2	SUMMARY	104
7	VIRI	107

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Seznam lokalitet vzorčenja Blagajevega volčina.....	31
Preglednica 2: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje fragmentov kloroplastne DNA.....	35
Preglednica 3: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za AFLP analizo	43
Preglednica 4: Prikaz mutacij v vseh petih odsekih kloroplastne DNA.....	50
Preglednica 5: Razdelitev populacij glede na analizo SAMOVA.	52
Preglednica 6: Razporeditev haplotipov po različnih odsekih cpDNA.....	57
Preglednica 7: (A) Seznam 27 haplotipov, pridobljenih v DNAsp ob upoštevanju mutacij v poli-A/T regijah. N – št. vzorcev, L – pripadnost populaciji. (B) Seznam 13 haplotipov, pridobljenih ob izločitvi poli-A/T regij.....	60
Preglednica 8: Seznam vzorčenih populacij Blagajevega volčina.....	62
Preglednica 9: Haplotype (Hd) in nukleotidna (Pi) raznovrstnost, izračunani s programom DNAsp	63
Preglednica 10: Hierarhična analiza molekularne variance (AMOVA) za celoten podatkovni niz.....	64
Preglednica 11: Rezultati testov nevtralnosti za skupine Blagajevega volčina: test Tajima D, Fu Fs in Ramos-Onsins in Rozas R2.	67
Preglednica 12: Število pridobljenih in polimorfnih vrhov za vsako kombinacijo začetnih oligonukleotidov.....	71
Preglednica 13: Izbrani populacijski parametri.	71
Preglednica 14: Alelno bogastvo in privatno alelno bogastvo po rarefakciji.....	73
Preglednica 15: Populacijska genetska struktura izračunana v programu AFLPsurv.....	75
Preglednica 16: Parni F_{ST} med populacijami, izračunani v programu AFLPsurv	76
Preglednica 17: Neieva genetska razdalja (Lynch in Milligan, 1994), izračunana v programu AFLPsurv.....	77
Preglednica 18: Rezultati analize glavnih koordinat (PCoA)	83
Preglednica 19: Analiza molekularne variance Blagajevega volčina na podlagi rezultatov AFLP	85

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Blagajev volčin v polnem cvetu.....	7
Slika 2: Zemljevid razširjenosti Blagajevega volčina (Brus, 2001: 2).....	9
Slika 3: Kloroplastni genom vodne kuge (<i>Elodea canadensis</i>) (prilagojeno po Huotari in Korpelainen, 2012: 99)	22
Slika 4: Shematski prikaz medgenskega vmesnika <i>psbA–trnH</i> pri dvokaličnicah.....	25
Slika 5: Shematski prikaz <i>trnK–matK</i> regije. Prilagojeno po Zoschke in sod. (2010: 3246).	26
Slika 6: Zemljevid vzorčnih mest Blagajevega volčina.	30
Slika 7: Rastišča Blagajevega volčina: A) gorovje Pindos (Grčija), B) Stara Planina (Bolgarija), C) Piatra Mare (Romunija), D) Kozjanski park (Slovenija), E) Buila Vanturarita (Romunija), F) Dolina Gračnice (Slovenija)	32
Slika 8: Mesta prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov <i>trnK-3914F</i> , <i>matK</i> - <i>934F</i> in <i>trnK-2R</i> (Johnson in Soltis, 1995: 151).	36
Slika 9: Shematski prikaz metode AFLP (Vuylsteke in sod., 2008: 1387).	41
Slika 10: Fiksacijski indeksi F, pridobljeni v programu SAMOVA.....	53
Slika 11: Drevo minimalnega razvejanja za različne odseke cpDNA: a) <i>trnL-F</i> , b) <i>atpB-rbcL</i> , c) <i>psbA-trnH</i> , d) <i>trnK</i>	56
Slika 12: Mreža haplotipov, pridobljena v programu Network	58
Slika 13: Razporeditev haplotipov Blagajevega volčina na podlagi petih odsekov kloroplastne DNA.....	59
Slika 14: Razporeditev klastrov Blagajevega volčina na podlagi petih odsekov kloroplastne DNA	65
Slika 15: Razporeditev neskladja nukleotidnih zaporedij za različne klastre. Polna črta: pričakovana razporeditev, črtkana črta: opažena razporeditev. A) klaster SLO, B) klaster SR C) klaster J, D) združena klastra J in SR, E) vsi vzorci.....	68
Slika 16: Razporeditev alelnega bogastva (levo zgoraj), privatnega alelnega bogastva (desno zgoraj) in Neieve genetske diverzitete (spodaj).....	74
Slika 17: Korelacija med Φ_{PT} in geografskimi razdaljami parov populacij Blagajevega volčina, izračunana v programu GenAlex	78

Slika 18: Populacijska struktura Blagajevega volčina določena z metodami na osnovi Bayesovega algoritma s programi STRUCTURE in BAPS za K = 2-7.....	80
Slika 19: Analiza prostorskega združevanja (angl. <i>spatial clustering</i>) na osnovi Bayesovega algoritma v programu BAPS	81
Slika 20: Razporeditev populacij Blagajevega volčina v dve skupini, kot ju predлага program Structure na podlagi metode po Evannu.....	82
Slika 21: Projekcija vzorcev 123 rastlin Blagajevega volčina vzdolž prvih dveh osi v analizi primarnih koordinat (PCoA), izdelani v programu GenAlex.	84
Slika 22: Spomenik ob vznožju Sv. Lovrenca v bližini Polhovega Gradca, posvečen obisku saškega kralja Friderika Avgusta	100

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov za kombinacijo B14.

PRILOGA B: Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov za kombinacijo G13.

PRILOGA C: Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov za kombinacijo G14.

PRILOGA D: Združeno nukleotidno zaporedje za 27 kloroplastnih haplotipov.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16S – mitohondrijski gen za 16S rRNA

6-FAM – standardno flurescentno barvilo modre barve, ki se uporablja pri genotipizaciji

A – adenin

AFLP – polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*)

atp – geni, ki kodirajo podenote ATP sintaze, npr. *atpE*, *atpI*, *atpF*... Gen *atpB* kodira beta podenoto ATP sintaze.

BI – Bayesova statistika (angl. *Bayesian inference*)

bp – bazni par

C – citozin

cpDNA – kloroplastna DNA

DNA – dezoksiribonukleinska kislina

ESU – evolucijsko pomembne enote (angl. *evolutionary significant units*)

G – gvanin

IR – obrnjena ponovitev (angl. *inverted repeat*)

IUCN – Svetovna zveza za varstvo narave (angl. *International Union for Conservation of Nature*)

LSC – dolg predel kloroplastne DNA z geni, ki niso ponovljeni (angl. *large single-copy*)

matK – kloroplastni gen, verjetno vključen v izrezovanje intronov maturaze

mtDNA – mitohondrijska DNA

MP – drevo največjega verjetja (angl. *maximum parsimony tree*)

MU – upravljavaška enota (angl. *management unit*)

PCR – verižna polimerizacija (angl. *polymerase chain reaction*)

poli-A/T – zaporedje adeninov/timinov, daljše od 5 baznih parov; imenovano tudi mononukleotidni mikrosatelit

psb – geni, ki kodirajo proteine fotosistema II, npr. *psbA*

RAPD – naključno namnožena polimorfna DNA (angl. *Random Amplified Polymorphic DNA*)

rbcL – geni, ki kodirajo podentote ribuloze-1,5-bisfosfat karboksilaze (Rubisco). *rbcL* kodira veliko (L; angl. *large*) podenoto Rubisca.

RFLP – polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

rpl20 – gen, ki kodira veliko ribosomalno podenoto (kratica za *ribosomal protein large 20*)

rps12 – gen, ki kodira majhno ribosomalno podenoto (kratica za *ribosomal protein small 12*)

SMM – model postopnih mutacij (angl. *stepwise mutation model*)

SNP – polimorfizem posameznega nukleotida (angl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

SSC – kratek predel kloroplastne DNA z geni, ki niso ponovljeni (angl. *small single-copy*)

SSR – enostavne ponovljive sekvence, imenovane tudi mikrosateliti (angl. *Simple Sequence Repeat*)

T – timin

trn – prenašalni RNA geni (angl. *transfer RNA*); npr. *trnH*, *trnF*, *trnL*

VIC – standardno flurescentno barvilo zelene barve, ki se uporablja pri genotipizaciji

SLOVARČEK

aloencimi – tudi alocimi; različice istih encimov, ki jih kodirajo različni aleli istega lokusa in jih lahko ločimo s pomočjo elektroforeze.

arktoterciarna geoflora – eden od dveh ključnih vegetacijskih tipov v Evropi med terciarjem, za katerega so značilne širokolistne listopadne vrste.

Bayesov princip/statistika – metoda v filogenetski analizi, ki vrednoti hipoteze na podlagi posteriorne verjetnosti.

fukcionalna omejenost (angl. *functional constraint*) – DNA zaporedja, znotraj katerih mutacije vplivajo na funkcijo, kažejo večjo funkcionalno omejenost kot zaporedja, ki nimajo funkcije. Močnejša kot je funkcionalna omejenost, nižja je stopnja mutacij.

genetska struktura – se nanaša na kakršen koli vzorec genetske diverzitete med več populacijami. Ob prisotnosti genetske strukture lahko na podlagi osebkov iz dane populacije sklepamo o genetskem make-upu posameznega osebka iz iste populacije.

genetska variabilnost – sposobnost biološkega sistema (npr. osebka ali populacije), da se spreminja v času.

genetska diferenciacija – kopičenje razlik v frekvencah alelov med popolnoma ali deloma izoliranimi populacijami. Merilo genetske diferenciacije je npr. fiksacijski indeks F_{ST} .

genetska diverziteta (tudi genetska raznolikost) – skupno število genetskih razlik (nukleotidov, genov, kromosomov ali celotnih genomov) znotraj ali med populacijami.

hipoginijski disk – anatomska del cveta; podaljšek cvetišča, na katerem je nameščena plodnica.

inbriding (angl. *inbreeding*) – oplojevanje v ožjem sorodstvu. Merilo za stopnjo sorodnosti med dvema osebkoma podajamo s koeficientom inbridinge (angl. *inbreeding coefficient*). V nalogi uporabljamo namesto daljšega slovenskega prevoda splošno uporabljen izraz inbriding.

intron – nekodirajoče nukleotidno zaporedje znotraj gena, ki ločuje eksone in se izreže iz RNA, preden obveščevalna RNA (mRNA) zapusti jedro.

izoencimi – tudi izocimi; encimi, ki katalizirajo isto kemijsko reakcijo, vendar jih kodirajo geni na različnih lokusih in imajo različno kemijsko strukturo.

klasično nahajališče (lat. *locus classicus*) – mesto, kjer je bila neka vrsta prvič najdena in od koder izhaja tudi tipski primerek.

medgenski vmesnik – nekodirajoče nukleotidno zaporedje med dvema genoma.

metoda največjega verjetja – metoda, ki izbere hipotezo sorodstvenih odnosov, ki ima največje verjetje v okviru izbranega evolucijskega modela.

mismatch distribution – razporeditev neskladja nukleotidnih zaporedij.

paleotropska geoflora – eden od dveh ključnih vegetacijskih tipov v Evropi med terciarjem, za katerega so značilne vednozelene lovorolistne vrste.

paralog – gen, ki nastane z duplikacijo gena v organizmu; tako gena zasedata dve različni mesti v istem genomu.

učinek ustanovitelja (angl. *founder effect*) – izguba genetske variabilnosti, do katere pride, ko se nova populacija formira iz majhnega števila osebkov iz ene populacije.

usmerjena selekcija – selekcija, ki favorizira ekstremne fenotipe pred ostalimi fenotipi, kar povzroči spremembo frekvence alelov v smeri favoriziranega fenotipa.

1 UVOD

Balkanski polotok, zlasti njegov zahodni gorati del, predstavlja vročo točko biotske raznovrstnosti v Evropi. Poleg velikega števila vrst je zanj značilen tudi endemizem. Vzrok za visoko biotsko raznovrstnost območja je več. Predvsem so k temu pripomogli velika ekološka stabilnost, topografska in klimatska raznolikost ter lega na prehodu med različnimi favnističnimi in florističnimi regijami (Kryštufek in Reed, 2004; Reed in sod., 2004). K veliki pestrosti je gotovo pripomogel tudi refugialni značaj območja. Balkanski polotok je zadnjih 1,8 milijona let igral vlogo glacialnega refugija, saj je bilo območje izven ledenega pokrova, ki je takrat prekrival večino srednje in severne Evrope. Palinološke raziskave so pokazale neprekinjeno prisotnost gozdov med glaciali in interglaciali (Huntley in Birks, 1983), kar je vrstam omogočilo ne samo preživetje, temveč tudi evolucijo vrst (med katerimi je veliko endemičnih) na mestu samem (*in situ*).

Balkanski polotok zaradi svojega značaja - sklenjenih gozdov, visokih vrhov, pa tudi zaradi prisotnosti vojn v zadnjih desetletjih - še danes ohranja status ene zadnjih ohranjenih divjin v Evropi. Relativna ohranjenost območja je omogočila preživetje reliktnim vrstam, ki se danes drugod po svetu soočajo z intenzivno degradacijo okolja. Vrste, prilagojene na velika podnebna nihanja iz preteklosti, imajo potencial, da preživijo tudi v prihajajočih klimatskih spremembah, ki se napovedujejo za prihajajoča desetletja. Kljub vsemu številnim vrstam, predvsem ožjim endemitom, tudi na Balkanskem polotoku grozi izumrtje zaradi človeške dejavnosti.

V recentni flori družine volčinovk (Thymelaeaceae) sta na območju Balkana prisotna dva rodu: rod *Thymelaea* Mill. (ptičji kljunček) ter rod *Daphne* L. (volčin). Blagajev volčin (*Daphne blagayana* Freyer) velja za terciarni relikt lovorolistnih gozdov, ki so bili v preteklosti verjetno razširjeni vse od vzhodne Azije do južne in srednje Evrope. Uvrščamo ga v sekcijo *Daphnanthes* C.A. Meyer, v kateri so združene vrste, značilne za vzhodnoazijske lovoroze gozdove ter vrste, značilne za širše sredozemske območje (Keissler, 1898). Oblika in zgradba listov kažeta na sorodnost z vzhodnoazijskimi »lovorolistnimi« volčini. Njegovo pritalno razrast razlagajo z dejstvom, da je le na tak

način (pozimi zavarovan s snegom in steljo) lahko preživel do današnjega časa, v katerem vladajo ostrejše podnebne razmere (Praprotnik, 2004).

Zaradi zanimive zgodovine odkrivanja vrste, ki ima klasično nahajališče prav v Sloveniji, je bilo Blagajevemu volčinu posvečeno veliko strokovno in poljudno zanimanje. Kljub temu nekateri aspekti problematike vrste še niso bili razrešeni. Nastanek njenega areala, realna ogroženost disjunktnih populacij ter znotrajvrstna diferenciacija so vprašanja, na katera zaenkrat še nimamo jasnega odgovora.

1.1 NAMEN DELA

Namen doktorske naloge je oceniti genetsko diverziteto Blagajevega volčina na podlagi različnih molekularnih markerjev.

Današnji areal Blagajevega volčina obsega Balkanski polotok in južne romunske Karpate. Vrsta se je na območje svojega današnjega areala verjetno razširila iz Male Azije, od koder se je postopoma širila proti severozahodu. Predvidevajo, da je bila vrsta v terciarju verjetno splošno razširjena na Balkanskem polotoku, kjer je zasedala strnjen areal (Kerner, 1891; Paulin, 1902).

Vendar današnji areal vrste na Balkanskem polotoku ni sklenjen: osrednji, največji del njenega območja razširjenosti obsega Bosno in Hercegovino, Srbijo ter Črno goro; slovenske populacije tvorijo skupaj s hrvaškimi ter italijanskimi obsežnejše območje razširjenosti na severu. Vrsta se pojavlja tudi v Makedoniji, Albaniji in na Kosovu. Najbolj južne populacije se nahajajo disjunktno v severni Grčiji, na vzhodu pa v gorovju Balkan v Bolgariji ter v Romuniji (J Karpati in Transilvanija). Vrsta je v osrednjem delu areala najpogosteša na serpentinu, kjer jo najpogosteje najdemo skupaj s črnim (*Pinus nigra* Arnold) in rdečim borom (*Pinus sylvestris* L.), omoriko (*Picea omorika* (Pančić) Purkyne) ter v hrastovih in bukovih gozdovih (Fukarek, 1965). Slovenske in hrvaške populacije uspevajo na karbonatni podlagi (dolomit), pojavlja pa se tudi na apnenu (npr. populacije v Romuniji, Bolgariji in Makedoniji).

Ker so nekatere populacije med seboj oddaljene tudi več sto kilometrov, predvidevamo, da med njimi ne prihaja do izmenjave genetskega materiala - populacije so genetsko

izolirane. O nastanku fragmentiranih nahajališč na severu obstajata dve hipotezi. Po prvi (Keissler, 1896) naj bi Blagajev volčin v interglacialu zasedal strnjen areal in se iz njega širil proti severu in severozahodu. Druga hipoteza (Kerner, 1891) pa pravi, da so fragmentirana severna nahajališča posledica razkosanja v glacialu in taka naj bi se ohranila do danes. Kerner (1895) se opira na trditev, da je v primeru reliktnih vrst izumiranje posameznih populacij vrste posledica tega, da so take vrste nekoč pripadale drugačni flori in so v današnjem času izrinjene na rob preživetja na ozemlju, na katerem prevladuje drugačna flora. Ti hipotezi do danes nista bili potrjeni ali ovrženi. Način nastanka izoliranih populacij (vikariantni prosti disperzijskemu načinu; Milne 2006) igra vlogo pri znotrajpopulacijski genski variabilnosti populacij, saj vikariantni način nastanka populacij predvideva večjo genetsko diverziteto znotraj fragmentiranih populacij, medtem ko disperzijski model nastanka majhnih populacij napoveduje manjšo genetsko diverziteto znotraj izoliranih populacij.

S pomočjo sodobnih molekularnih metod želimo preveriti, ali je za Blagajev volčin obstajal en ali več ledenodobnih refugijev, v katerih se je vrsta ohranjala in se razvijala.

S pomočjo molekularnih tehnik želimo tudi preveriti, ali genetski podatki potrjujejo obstoj več podvrst Blagajevega volčina. Blagajev volčin je v celotnem območju razširjenosti splošno sprejet kot enotna vrsta, vendar se v literaturi omenjajo tudi nekatere podvrste oziroma varietete (npr. Fukarek, 1969; Lakušić, 1974; Markova in Cherneva, 1979; Praprotnik, 2004).

S pomočjo obstoječih literaturnih podatkov bomo preverili varstveni status populacij Blagajevega volčina v posameznih državah, kjer se pojavlja. S pomočjo molekularnih metod pa bomo opredelili varstveno pomembne enote ter skušali ovrednotiti varstveni status Blagajevega volčina v Sloveniji.

1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

V okviru raziskave bomo potrdili ali ovrgli naslednje hipoteze:

1. Delitev Blagajevega volčina na domnevne podvrste (subsp. *lerchenfeldiana*, subsp. *kellereri*, subsp. *zogovićii*) ne odraža dejanske filogeografske strukture vrste.
2. Na Balkanskem polotoku je obstajalo več območij ledenodobnih refugijev (centrov diferenciacije) za Blagajev volčin.
3. Posamezne populacije Blagajevega volčina so izolirane, med njimi ni genskega pretoka.
4. Otočkasta razporeditev populacij Blagajevega volčina je posledica disperzijskega načina razširjanja med ledenimi dobami.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DRUŽINA VOLČINOVK (THYMELAEACEAE) IN ROD *DAPHNE*

Družina volčinovk obsega okoli 600 vrst v 50 rodovih (Peterson, 1978; Takhtajan, 1997). Sistematsko jo ponavadi uvrščajo v red Mytales, čeprav nekateri sistematiki izražajo pomisleke o taki uvrstitvi (Cronquist, 1988) in jo povezujejo z družino Flacourtiaceae (red Violales). Razširjena je po skoraj celotnem tropskem in zmernem pasu, raznolikost družine pa je večja na južni polobli (Peterson, 1978; Heywood, 1995; Takhtajan, 1997).

Družina se deli na 4 poddružine, in sicer na poddružino Thymelaeoideae (najštevilčnejša poddružina z najbolj značilnimi predstavniki *Gnidia*, *Pimelea*, *Wikstroemia*, *Daphne* in *Lasiosiphon*), Aquilarioideae (vključuje 7 majhnih rodov s tihomorskega območja in Afrike), Gonystyloideae (trije majhni rodovi iz JV Azije in Bornea) ter Giliodaphnoideae (en sam rod iz Z Afrike). Za prvo poddružino je značilna ena sama viseča semenska zasnova, predstavniki družine Aquilarioideae imajo dve semenski zasnovi (redko več), medtem ko imajo tri semenske zaslove predstavniki poddružine Gonystyloideae (Heywood, 1995). V Evropi poznamo le tri rodovne predstavnike družine volčinovk, rodove *Diarthron*, *Daphne* in *Thymelaea*.

Rod volčinov obsega okoli 90 vrst z razširjenostjo v Evropi, Aziji do Avstralije in Pacifika (Halda, 1998). Rod pripada taksonomsko kompleksnemu tribusu *Daphneae* C.A. Meyer. Evolucijska razmerja med rodovi znotraj tribusa ter znotraj samega rodu so nejasna. Zapleten kompleks sestavljata rodova *Daphne* in *Wikstroemia* na jugozahodnem Kitajskem, saj rodova razločuje predvsem anatomska zgradba hipoginijskega diska, ki je pri prvem sklenjen, pri drugem pa sestavljen iz ločenih lusk (Halda, 1998).

Primarni center evolucije rodu *Daphne* se nahaja na jugozahodnem Kitajskem. Drugi, manj očitni centri so v hribovitih območjih Evrazije (Halda, 1998). Gre za majhne grmičke ali redko nizka drevesa. Vsi evropski predstavniki rodu so pritlikavi do srednje veliki grmički. Veje so prožne, z močnimi likovimi vlakni, listi so na poganjkih nameščeni premenjalno, redko nasprotno; pogosto se nahajajo terminalno na koncu vej.

Zvezdasto somerni dvospolni cvetovi so združeni v terminalna ali zalistna socvetja, redko so posamični. Cvetovi so pisani do zelenkasti, večinoma opojno dišeči. Cvetno odevalo je enojno: čašni listi so 4 (5), petaloidni (obarvani) in med seboj zrasli, venčni listi pa so zakrneli ali jih ni. Prašnikov je 8 (10), v 2 obročih, 4 (5) se jih nahaja blizu vrha, preostali 4 (5) pa v sredini hipantija. Prašnične niti so kratke. Vrat pestiča je kratek, brazda velika, sedeča ali skoraj sedeča, glavičasta. Plod je koščičast, z omesenelim ali usnjatim eksokarpom (Webb in Ferguson, 1993). Semena so obdana s trdo ovojnicico, endosperma je malo, plodnica je enopredalasta, s slabo vidnim obročem hipoginijskih lusk na njeni bazi (disku) (Halda, 1998).

Halda (1998) deli rod *Daphne* na 15 podrodov in 10 sekcij. V Evropi se pojavlja 17 vrst volčinov (Webb in Ferguson, 1993), od tega jih v Sloveniji najdemo šest.

2.1.1 *Daphne blagayana* Freyer

2.1.1.1 Biološke značilnosti

Blagajev volčin je vednozelen grmiček s poleglimi, kipečimi poganjki. Poganjki dosegajo dolžino 1 m in se lahko vzponejo do 30 cm visoko. Listi so nameščeni na poganjkih terminalno. Po obliki so narobejajčasti, s topo do zašiljeno listno konico, temno zeleni z gladkim robom, na otip usnjati. Cvetovi so združeni v ovršne, glavičaste kobule z 10 do 15 cvetovi. Posamezni cvetovi so kremasto bele barve, opojno dišeči. Plod je koščičast, prozorno-belkast, enosemenski, omesenel. Znotraj plodu se nahajajo črna semena, ki pogosto ne kalijo. Rastlina se razmnožuje tudi vegetativno prek ukoreninjanja poleglih poganjkov. O načinu razmnoževanja vrste v Sloveniji je obširneje pisala Brunsteinerjeva (1957).

Blagajev volčin uspeva na apnencu, dolomitu, predvsem pa na serpentinhih. Najnižje ležeče populacije uspevajo v Sloveniji, na nadmorski višini 400 m (na primer v okolici Idrije, v Polhograjskem hribovju), najvišje pa sega na Stari planini v Bolgariji (1900 m).



Slika 1: Blagajev volčin v polnem cvetu.

Figure 1: *Daphne blagayana* in full bloom.

2.1.1.2 Znotrajvrstna diferenciacija

Blagajev volčin je splošno sprejet kot enotna vrsta v celotnem območju razširjenosti. V literaturi so omenjene tudi naslednje podvrste oziroma varietete: za romunske Karpatе podvrsta *D. blagayana* subsp. *lerchenfeldiana* Schur (Fukarek, 1969), v Bolgariji pa naj bi uspevala podvrsta *D. blagayana* subsp. *kellereri* Stoj. & Stef. (Fukarek, 1969). V Flori Bolgarije (Stojanov in Stefanov, 1933: 725) slednjo omenjajo kot varieteto, prav tako je kot varieteta omenjena v novejši izdaji Flore Bolgarije VII (Markova in Cherneva, 1979: 327). Domnevni podvrsti *lerchenfeldiana* in *kellereri* naj bi se ločili po listih; pri podvrsti *kellereri* naj bi bili zgornji listi topi, zaokroženi, na zgornji strani temnozeleni in spodnji modrikasti oziroma sivkasti (Praprotnik, 2004). Lakušić (1974) navaja še eno podvrsto, *D. blagayana* subsp. *zogovićii* kot endemično podvrsto JV

Dinaridov, vendar opis podvrste ni bil nikoli objavljen.

2.1.1.3 Areal razširjenosti Blagajevega volčina

Predniki Blagajevega volčina verjetno izvirajo iz lovoralistnih gozdov vzhodne Azije. Velja za terciarni relikt, saj kaže prilagoditve na toplejšo in vlažnejšo klimo, kot je to značilno za ostale predstavnike sekcije Daphnantes, značilnih za lovoralistne gozdove vzhodne Azije. Njegovo poleglo kipečo rast je Meusel (1969) razložil kot adaptacijo na vse manj ugodne življenske razmere, do katerih je prihajalo postopoma. Vrsta naj bi se hladnejšim razmeram prilagodila tako, da je liste pomaknila proti tlem.

Vrsta zavzema ilirski areal – Balkanski polotok in južne Karpati (romunske Transilvanske Alpe; slika 2). Areal vrste je disjunkten. V osrednjem delu areala (Srbija, Bosna in Hercegovina) ima vrsta precej nahajališč (v Srbiji npr. kanjon reke Uvac, Ibarska dolina, Suvobor, Lojalnik, Divčibare, Nacionalni park Tara, Pešter, Radocelo-Divan, Zlatar, Zlatibor; v BiH na primer številne lokalitete med Višergradom in Fočo v dolini Drine, okolica Konjica, dolina reke Bosne in druga). V Srbiji je vrsta pogosta samo na serpentinih (Josifović in sod., 1972), v Bosni in Hercegovini pa se nahajališča nahajajo tudi na apnencu in dolomitru (Fukarek, 1965). Na Kosovu je vrsta redka, zanjo je znanih le malo nahajališč (Kopaonik, Morina, Luboten), populacije pa so razmeroma majhne. Vsa nahajališča so na serpentinitu (Millaku in sod., 2013). Možno je, da bodo v prihodnosti odkrita nova nahajališča.

Drugo območje zavzema zahodni del Hrvaške, Slovenijo in Italijo, kjer se vrsta nahaja na dolomitru (karbonatna podlaga). Slovenske populacije predstavljajo severozahodno mejo tega areala. Najzahodnejša populacija se nahaja v Italiji v Karnijskih predalpah. Strgar (1973) navaja, da se slednje območje nahaja (cit.) “*v ozkem pasu od Samoborskega gorja proti severozahodu čez Kozjansko in Zidani most do Polhograjskega hribovja in naprej do doline Trebuše.*” Ker je ustreznih rastišč za Blagajev volčin v tem pasu še precej, je Strgar napovedal možna odkritja novih nahajališč, kar se je kasneje izkazalo za pravilno. Slovenska nahajališča se tako nahajajo v Posotelju, ob spodnji Savinji, na Kočevskem, v Polhograjskem hribovju, v okolici Idrije in v dolini Trebuše. Na Hrvaškem je vrsta razširjena v Dolini Kolpe in Sušice v Gorskem kotarju, na Medvednici ter v Samoborskem hribovju (Japetić, Oštrc, Palačnik, Plješevica, Preseka, Veliki dol) (Flora Croatica Database, 2013).



Slika 2: Zemljevid razširjenosti Blagajevega volčina (Brus, 2001: 2) in lokacije analiziranih populacij.

Figure 2: Distribution map of *D. blagayana* (Brus, 2001: 2) and locations of studied populations.

Tretje območje predstavlja fragmentirane populacije na jugovzhodu: v Albaniji, Makedoniji, Grčiji, Bolgariji in Romuniji. V Bolgariji se vrsta nahaja na kamnitih travnatih območjih med ruševjem na nadmorski višini med 1500 in 1900 m (Andreev in sod., 1992). V Grčiji zaseda vrsta južno mejo svojega areala. Vrsta je tu redka, znana z dveh območij: prvo se nahaja v severnem Pindosu v bližini prelaza Katara na nadmorski višini med 1550 in 1700 m ter nižje v okolici vasi Malakasi (850-950 m). Na prelazu Katara vrsta uspeva v odprtrem borovem gozdu med pušpanovim grmičevjem. Drugo nahajališče je na Kato Olimbos, vzhodno od vasi Kallipevki na nadmorski višini 1100 m. Na obeh območjih vrsta uspeva na ofiolitnem substratu (serpentinit) (Aldén, 1991). Vrsta ima v Romuniji več nahajališč. Fukarek (1969), Ciocârlan (2009) in Sârbu in sod. (2013) omenjajo naslednje lokalitete: Ciucas, Garbova, Piatra Mare, Postavarul, Bucegi, Cozia, Buila, Piatra Closanilor, Valcan in Bihor. Micevski (1998) navaja za Makedonijo nahajališča Nice-Kožuf, severni Majdan in Visoka Čuka ter Prilep in Bitola. V Albaniji se vrsta nahaja na severu države (Prokletije).

2.1.1.4 Zgodovina odkritij Blagajevega volčina

Zgodovino odkritja Blagajevega volčina je natančneje opisala Praprotnik (2004: 5-13) v monografski publikaciji, posvečeni tej vrsti. Blagajev volčin je bil prvič odkrit leta 1837, ko je kmet iz Polhovega Gradca nabral cvetoč primerek neznane rastline in jo prinesel Rihardu Ursiniju, grofu Blagayu. Ker grof sam rastline ni poznal, jo je naslednjega dne poslal v Deželni muzej v Ljubljano kustosu Henriku Feyerju. Freyer je rastlino v dvomu označil kot "*Daphne alpina* ?" in pripisal ime "*daphne Blagayi*", primerke pa je poslal tudi češkemu botaniku P. M. Opitzu ter profesorjem D.H. Hoppeju ter H. G. L. Reichenbachu. Slednji je Freyerju avgusta istega leta odpisal in potrdil, da gre za novo vrsto, za katero se je uveljavilo ime *Daphne blagayana*. Leta 1839 je novo odkrito rastlino potrdil tudi W. D. J. Koch. Reichenbachu je Freyer naknadno poslal 100 posušenih primerkov volčina za herbarijsko zbirko Flora Germanica exiccata (izhajala med 1830 in 1845). Klasično nahajališče (*locus classicus*) Blagajevega volčina je torej Gora pri Polhovem Gradcu. Leta 1838 je klasično nahajališče Blagajevega volčina obiskal saški kralj Friderik Avgust II., v spomin na katerega so še istega leta postavili spomenik v Polhovem Gradcu.

Kljub temu, da velja, da je bil Blagajev volčin odkrit leta 1837 na Gori pri Polhovem Gradcu, je bila rastlina resnično prvič nabранa leta 1780 v okolici Brašova v Transilvaniji (Romunija). Rastlino je za svoj herbarij nabral J. M. Lerchenfeld in jo določil kot *D. alpina*. Skoraj sto let kasneje, leta 1866 je avstrijski botanik in kemik J. F. Schur ob pregledovanju Lerchenfeldove herbarijske zbirke prepoznal njegovo zmoto ter na podlagi primerka iz 1780 vrsto na novo opisal kot *D. lerchenfeldiana*. Šele leta 1884 je bilo ugotovljeno, da je Lerchenfeldov volčin identičen Blagajevemu volčinu in to spoznanje je bilo leta 1886 objavljeno v delu o transilvanskem rastlinstvu (Simonkai, 1886). Skladno z Mednarodnim kodeksom botanične nomenklature je obvezljalo prvo veljavno opisano ime, torej *Daphne blagayana*.

Do drugega odkritja (prvega zunaj območja današnje Slovenije) je prišlo leta 1856, ko je bila rastlina najdena na Stolu pri Čačku v Srbiji. Na tedanjem Kranjskem (območju današnje Slovenije) je bil Blagajev volčin drugič odkrit na Jetrbenku leta 1871, 1881 pa še tretjič na (Polhograjski) Grmadi. Za tem so se odkritja vrstila: 1889 na Razorju v bližini Stare Vrhnike, 1894 med sv. Marjeto in sv. Jurijem v bližini zaselka Turje na Štajerskem, 1902 na Kozjem nad Zidanim mostom, 1903 nad Sv. Marjeto pri Rimskih

topliah. V naslednjih desetletjih so bila odkrita še številna nahajališča v Sloveniji. Med zadnja odkrita nahajališča sodi odkritje Blagajevega volčina v dolini Trebuše leta 2000 (Dakskobler, 2000) ter v okolini Idrije leta 2004 (Vončina, 2008, 2009).

2.1.1.5 Varstveni status in ogroženost Blagajevega volčina

Čeprav je za Blagajev volčin na območju razširjenosti znanih precej nahajališč, je v posameznih državah rastlina redka, zato je skoraj povsod uvrščena med zavarovane vrste ter obravnavana na rdečih seznamih ogroženih vrst. V posameznih državah je bila za Blagajev volčin opravljena kategorizacija na podlagi merit IUCN.

Po zadnjih spremembah v opredelitvi IUCN kategorij rdečega seznama iz leta 2001 lahko vrsto opredelimo kot Not Evaluated (NE) / neopredeljena vrsta, Near Threatened (NT) / potencialno ogrožena, Data Deficient (DD) / premalo podatkov, Endangered (EN) / prizadeta vrsta, Critically Endangered (CR) / skrajno ogrožena, Vulnerable (VU) / ranljiva vrsta, Extinct in the Wild (EW) / v divjini izumrla vrsta ali Extinct (EX) / izumrla vrsta.

Vrsta zaenkrat še ni obravnavana na IUCN-ovem rdečem seznamu ogroženih vrst (Walter in Gillett, 1998), prav tako ni uvrščena v Rdeči seznam vaskularne flore Evrope - Red List of Vascular Flora of Europe (Bilz in sod., 2011).

Varovanje rastlinskih vrst je v Sloveniji urejeno z Uredbo o zavarovanih prosto živečih rastlinskih vrstah (2004), ki nadomešča Odlok o zavarovanju redkih ali ogroženih rastlinskih vrst (1976). Uredbi sta priloženi dve prilogi, priloga Poglavlje A) - zavarovane rastlinske vrste, ki so domorodne na območju Republike Slovenije¹ ter priloga Poglavlje B) - zavarovane rastlinske vrste v interesu skupnosti, ki niso domorodne na območju Republike Slovenije.

Rdeči seznam praprotnic in semenk (2002), priloga Pravilnika o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam, obravnava stanje ogroženosti rastlinskih

¹V prilogi A so pri nekaterih rastlinskih vrstah omenjene tudi opombe, ki definirajo, zakaj je posamezna vrsta zavarovana in kateri ukrepi so dovoljeni oziroma ne: C – pogojno dovoljen odvzem iz narave in izkoriščanje; H – ukrepi za ohranjanje ugodnega stanja habitata rastlinske vrste; H* - rastlinska vrsta, pri kateri je treba prednostno upoštevati ohranjanje ugodnega stanja habitata; O – rastlinske vrste, pri katerih je dovoljen odvzem iz narave in zbiranje nadzemnih delov, razen semen oziroma plodov, za osebne namene; Oo – rastlinske vrste, pri katerih ni prepovedi za nadzemne dele rastlin, razen semen oziroma plodov. Blagajev volčin ima v opombah oznako H, kar pomeni, da mora država izvajati ukrepe za ohranjanje ugodnega stanja habitata rastlinske vrste.

vrst. V rdečem seznamu so vrste uvrščene v ustrezno kategorijo ogroženosti: izumrla vrsta (Ex), domnevno izumrla vrsta (Ex?), prizadeta vrsta (E), ranljiva vrsta (V), redka vrsta (R), vrsta zunaj nevarnosti (O), neopredeljena vrsta (I) in premalo znana vrsta (K), za katere se izvajajo ukrepi za izboljševanje stanja, kot so omogočanje primernih mest za reprodukcijo, prehranjevanje, prezimovanje ter za zagotavljanje drugih pomembnih življenjskih faz. Blagajev volčin je v rdečem seznamu praprotnic in semenk uvrščen v kategorijo ranljive vrste, torej kategorijo, (cit.) “*v katero se uvrstijo vrste, za katere je verjetno, da bodo v bližnji prihodnosti prešle v kategorijo prizadete vrste, če bodo dejavniki ogrožanja delovali še naprej. Številčnost vrste se je v velikem delu areala zmanjšala oziroma se zmanjšuje. Vrste so zelo občutljive na kakršnekoli spremembe oziroma poseljujejo habitate, ki so na človekove vplive zelo občutljivi.*”

Blagajev volčin je na slovenskem zavarovan že od leta 1898, ko so ga zaradi prekomernega nabiranja zavarovali skupaj s planiko. Ker gre torej za prvo zavarovano rastlinsko vrsto pri nas, predstavlja simbol slovenskega naravovarstva. Med botanične naravne vrednote ga uvršča tudi Uredba o zvrsteh naravnih vrednot (2002).

Tudi v preostalih državah, kjer se Blagajev volčin pojavlja, je uvrščen med zavarovane vrste ter ga zasledimo na nacionalnih in ponekod regionalnih rdečih seznamih. Blagajev volčin je na Hrvaškem zaščiten z zakonom o varstvu narave (16.4.1952, NN 6/62). Vrsta je uvrščena v rdeči seznam hrvaške flore kot ranljiva (VU (NT) s kriterijem B1a+2a(ii,iii) (Nikolić, 2013). Blagajev volčin je v Bosni in Hercegovini kot ranljiva vrsta (V - ugrožena ali ranjiva) uvrščen na seznam rastlinskih vrst, ki služi kot osnova za Rdečo knjigo praprotnic in semenk Bosne in Hercegovine (Šilić, 1996). Kategorija ustreza IUCN-ovi kategoriji CR-VU. Blagajev volčin je na italijanskem regionalnem rdečem seznamu rastlinskih vrst uvrščen v kategorijo NT za pokrajino Furlanija - Julijska krajina (Conti in sod., 1997). Vrsta je uvrščena na seznam zavarovanih rastlinskih in živalskih vrst v Črni Gori (List on protected of certain plant and animal species in Montenegro) ter na seznam zavarovanih rastlinskih vrst Kosova (List of protected plant species on basis of the decision no. 239/86 of Institute for Nature Protection of Kosovo). V rdečem seznamu vaskularne flore Kosova je opredeljen pod kategorijo EN (Millaku in sod., 2013). V rdečem seznamu višjih rastlin Romunije (Oltean in sod., 1994) je Blagajev volčin uvrščen v kategorijo redke vrste, v okrožju Arges pa je uvrščen med ranljive vrste (VU). Danciu in sod. (2007) uvrščajo vrsto v

kategorijo V/R, Oprea (2005) pa med ranljive vrste (VU). V srbskem rdečem seznamu (Stevanović (ur.), 1999) je *Daphne blagayana* opredeljena kot LR (stara kategorija IUCN; manj ogrožena vrsta, angl. *low risk*), v rdečem seznamu rastlin Bolgarije pa je uvrščena med ogrožene vrste s kriterijem EN B2ab(i,ii,iii) (Petrova in Vladimirov, 2009). V Makedoniji je vrsta opredeljena kot EN s kriterijem B2ab(i,ii,iii). Za Albanijo podatki niso dosegljivi.

2.2 BALKANSKI POLOTOK IN TERCIARNI RELIKTI

Današnja razporeditev in abundanca vrst na severni zemeljski polobli je odraz speciacij, migracij in izumiranj, do katerih je prihajalo zaradi podnebnih nihanj v zadnjih 65 milijonih let.

Primarna evropska flora se je začela razvijati v kasnejši zgornji kredi s pojavom predstavnikov iz družin Maxtixiaceae, Theaceae, Sabiaceae in Pentaphylaceae (Mai 1987). V obdobju terciarja (65,5 do pribl. 1,8 mio let) je bilo podnebje današnje severne Amerike in Evrazije toplo in vlažno, kopno pa je prekrival obsežen cirkumborealni gozdni ekosistem (Tiffney, 1985). V tem obdobju sta ozemlje Evrope prekrivala dva ključna vegetacijska tipa: vednozelena lovoralistna »paleotropska geoflora« ter širokolistna listopadna »arktoterciarna geoflora«. Flora tega obdobja je zaradi velikega števila fosilnih ostankov (listi, plodovi, semena, pelod in les) relativno dobro raziskana, znani so številni predstavniki rodov, poddružin in družin, ki jih v rastlinstvu današnje Evrope ni več. Paleotropska flora, sestavljena iz paratropskih deževnih gozdov, subtropskih deževnih in lovoralistnih gozdov, zmernih lovoralistnih gozdov ter edafsko pogojenih formacij lovoro-iglastih gozdov, je prevladovala med zgornjo kredo in poznim miocenom (Mai, 1987). S paleocenom se je v Evropo v valovih širila tudi arktoterciarna flora (listopadni širokolistni gozdovi), ki predstavlja osnovo za terciarne mešane mezofitne gozdove (zmerno tople deževne gozdove, gozdove hrasta, gabra in kostanja, ter gozdove bukve, hrasta in gabra ali na primer močvirne gozdove). Najintenzivnejši razvoj lovoralistne vegetacije je potekal v eocenu. V tem času sta območje srednje in južne Evrope prekrivala lovoralistni in deževni gozd, ki pa sta se začela umikati že v oligocenu.

Tertiarna vegetacija Evrope se je spremajala vzporedno s postopnim, nelineranim ohlajanjem podnebja, ki se je začelo pred nekako 15 milijoni let (v zgornjem miocenu) in je doseglo vrhunec v ledenih dobah (v kvartarju). V oligocenu/eocenu so se začenjali pojavljati florni elementi sredozemske regije, čeprav o Sredozemlju kot regiji takrat še ne moremo govoriti (Axelrod, 1975).

Pred 15 milijoni let (v zgornjem miocenu) so se obsežni cirkumborealni gozdovi severne poloble začeli krčiti in postopoma izginjati. Evrazijski pas lovoralistnih gozdov je razpadel, s tem pa je izumrla velika večina predstavnikov lovoralistne flore (vlažno-subtropskih elementov) v Evropi. Ostanki teh gozdov so se ohranili v refugialnih območjih vzhodne Azije (območje Kitajske/Japonske), zahodne in jugovzhodne Severne Amerike in jugozahodne Evrazije (predvsem na Kavkazu) (Milne, 2006). Izginjanje vrst ni potekalo postopoma, temveč v cikličnih intervalih pod vplivom spreminjačih se podnebnih razmer, kar je vodilo k vikarianci ozko sorodnih vrst (Mai, 1987). Na jugozahodnem Kitajskem ter v manjših hribovitih območjih Azije se nahajajo tudi primarni centri evolucije rodu *Daphne* (Halda, 1998). Sredozemska vrsta *Daphne oleoides* ima na primer bližnja sorodnika na zahodnem Kitajskem, vrsti *D. giraldii* in *D. tangutica* (Axelrod, 1975). Lovoralistični gozdovi so postopoma postajali vse bolj podobni zmernim gozdovom (npr. vednozeleni širokolistni gozdovi, kot jih najdemo na južnem Japanskem, južni Kitajski, v Himalaji ali na Kanarskih otokih). Iz Evrope so lovoralistični gozdovi izginili že pred ohladitvami v pleistocenu. Veliko lovoralistnih reliktorjev se je ohranilo v južni Evropi in na Kavkazu. Med relikte iz tistega obdobja lahko uvrstimo rodove *Daphniphyllum* Bt., *Sabia* Colebh. in *Styrax* L. (Mai, 1987).

S propadom lovoralistnih gozdov pa se je v Evropi začela pojavljati sredozemska sklerofilna vegetacija, ki je današnji izgled verjetno dobila v pleistocenu (Mai, 1987). Listopadni gozdovi, značilni za današnjo Evropo, go genetsko mladi, razvili so se postopoma iz »arktoterciarne geoflore«.

Palmarev (1989) v pregledni študiji o izvoru mediteranske sklerofilne dendroflore omenja dve vrsti rodu *Daphne*, in sicer *D. kimmerica* Kolak. (predhodnik *D. laureola* L.) ter *D. oeningensis* A. Br. (predhodnik *D. oleoides*). Obe vrsti uvršča v skupino vrst miocenskega izgleda (za razliko od vrst zgodnejšega eocenskega ali oligocenskega izvora ali kasnejšega pliocenskega izvora). Vrsti naj bi se pojavili v srednjem ali pozнем miocenu. Ettingshausen (1872) za Zagorje omenja vrsto *Daphne aquitanica* Ett.

Od vrste *D. oeningensis* naj bi se razlikovala po žilah drugega reda, ki so pri *D. aquitanica* bolj poudarjene. *Daphne aquitanica* je omenjena tudi za terciarno floro Češke (Bohemije) in Abhazije (Hably, 1994). Pilar (1883) za terciarno nahajališče Dolje v bližini Zagreba omenja tudi vrste *Daphne laureolifolia* Pilar (po videzu podobna današnji *D. laureola* L.) in *D. spathulata* Pilar.

Regionalno gledano sestavljata danes vegetacijo Balkanskega polotoka dve glavni združbi (Eastwood, 2004): 1) sredozemska vegetacija na jugu (vključuje tudi elemente toploljubnih listopadnih gozdov) ter 2) srednjeevropska (celinska) vegetacija na severu (vključuje elemente hladnoljubnih listopadnih gozdov).

Sredozemsko vegetacijo sestavljajo vednozeleni gozdovi, značilni za toplejše (obmorske) dele, ter listopadni sredozemski gozdovi, značilni za hladnejša območja. Ta dva tipa vegetacije se nahajata do nadmorske višine 700 m. Na višjih nadmorskih višinah (med 700 in 1700 m) najdemo iglaste gozdove jelke in brina, še višje pa subalpinsko in alpinsko vegetacijo.

Srednjeevropsko vegetacijo nižjih nadmorskih višin do 700 m sestavljajo mešani gozdovi hrasta in gabra (z bukvijo, brestom, jesenom in javorjem), na višinah med 700 in 1700 m se v montanskem pasu najpogosteje pojavljajo bukovi gozdovi, nad njimi pa iglasti gozdovi z jelko, smreko in bori. Zadnji vegetacijski pas predstavlja grmičevje z bori, brinom in jelšo.

2.3 VARSTVENA GENETIKA OGROŽENIH RASTLINSKIH VRST

2.3.1 Pomen varstvene genetike pri varovanju vrst

Varstvena genetika je teoretična in aplikativna veda, ki si prizadeva varovati redke vrste. V povezavi z molekularno sistematiko varstvena genetika prispeva k ohranjanju taksonov na štiri načine (Soltis in Gitzendanner, 1999): 1) preko razjasnitve koncepta vrste, 2) preko identifikacije linij znotraj vrste, ki jih je smiselno ohranjati; 3) preko opredelitve varstvenih prioritet in 4) preko razjasnitve pomena hibridizacije na biologijo in ohranjanje redkih vrst.

V današnjem času se vse bolj uveljavlja mnenje, da je v varstveni biologiji pomembno

ohranjanje evolucijskega potenciala vrste, torej tistih enot znotraj vrste, ki kažejo samostojno evolucijsko zgodovino oz. se bodo lahko razvijale v prihodnosti. Z razjasnjevanjem principov in procesov, ki vplivajo na geografsko razporeditev (predvsem znotrajvrstnih) genealoških linij, se ukvarja filogeografija (Avise in sod., 1987). Preko določitve haplotipov in njihove geografske razporeditve znotraj areala vrste lahko sklepamo na historične spremembe v velikosti populacij. S pomočjo filogeografije lahko ugotovimo, ali so populacije na nekem območju avtohtone ali pa so bile vnesene v zadnjem času, pri čemer lahko ugotovimo tudi izvor vnesenih osebkov. S pomočjo (primerjalne) filogeografije so znanstveniki proučevali posledice historičnih dogodkov na razporeditev taksonov, kar je posebno dobro raziskano na primeru poledenitvenih obdobjij v Evropi v pleistocenu, ki so ključno vplivali na razporeditev današnje flore in favne v Evropi. Čeprav so bili za različne vrste ugotovljeni različni refugiji, lahko za Evropo na podlagi genetskih podatkov trdimo, da je bila večina glacialnih refugijev razporejenih v južni Evropi, predvsem na Iberskem, Apeninskem in Balkanskem polotoku (Tzedakis in sod., 2002). Filogeografija omogoča poleg zgoraj naštetih aplikacij tudi prepoznavanje kriptičnih vrst. Pri tem je ključnega pomena vzorčenje na celotnem arealu vrste (Beebee in Rowe, 2004).

Molekularne analize redkih vrst so v nekaterih primerih znižale ali celo ovrgle varstveni status nekaterih taksonov, za katere se je izkazalo, da jih na podlagi genetskih podatkov ne moremo uvrstiti v samostojno enoto (Avise in Laerm, 1982). V številnih primerih pa so molekularne metode omogočile prepoznavo novih vrst in s tem olajšale določitev varstvenih prioritet.

Varstveni genetiki še vedno niso enotnega mnenja, katere evolucijske linije znotraj filogenij je smiselno ohranjati, da prispevamo k čim bolj uspešnemu ohranjanju vrst. Varovanje se lahko osredotoči na tiste linije, iz katerih je potekla radiacija, ali pa na linije, ki vsebujejo številne redke endemite (vendar so te linije očitno zašle na »mrtvo točko«). Podobni dvomi se pojavljajo tudi glede ohranjanja posameznih populacij znotraj vrste. Po eni strani se zdi bolj smiselno ohranjati velike in zdrave populacije namesto majhnih, robnih populacij. Lesica in Allendorf (1995) menita, da je ohranjanje robnih populacij smisleno v primeru, ko te pomembno prispevajo k genetski variabilnosti vrste. V robnih populacijah lahko poleg tega prihaja do speciacije in s tem do nastanka novih vrst. Vse več varstvenih genetikov se danes nagiba k ohranjanju procesov in ne vzorcev (npr. Thompson, 1996; Stockwell in sod., 2003).

Z namenom ohranjanja tako genetske raznovrstnosti kot tudi evolucijskih procesov Moritz (2002) predлага razdelavo genetske raznovrstnosti v dve dimenziji: v 1) adaptivno radiacijo, ki se osredotoča na ohranjanje heterogene krajine in viabilnih populacij in 2) nevtralno divergenco, ki se osredotoča na ohranjanje historično izoliranih linij (t.i. evolucijsko pomembnih enot, angl. *evolutionary significant units*, ESU). Izraz ESU se v varstveni biologiji uporablja že skoraj tri desetletja, vse odkar ga je Ryder (1986) prvič omenil v članku o *ex situ* ohranjanju v živalskih vrtovih. V tem času so številni avtorji predlagali različne definicije ESU, ki so se sprva nanašale na uporabo genetskih in ostalih bioloških podatkov (na primer morfologije), v zadnjem času pa definicije vključujejo izključno genetske podatke. Moritz (1994) ESU definira kot populacije, ki so recipročno monofiletske za mtDNA alele in ki kažejo signifikantno divergenco v frekvencah alelov jedrnih lokusov. Ena glavnih kritik ESU se namreč nanaša prav na uporabo nevtralnih markerjev, na katerih najpogosteje bazira določitev ESU, saj ti ne dajo vedno pravilne slike o genetski strukturi vrste.

Genetskih podatkov, pridobljenih iz mikrosatelitov ali alocimov, ne moremo neposredno prenesti v koncept ESU. S pojavom vse bolj številnih mikrosatelitnih študij je zanje Moritz (1994) predlagal koncept upravljavskih enot (ang. *Management units*, MU), podkategorije znotraj ESU. Populacije lahko opredelimo kot MU takrat, ko kažejo značilne razlike v razporeditvi alelov (angl. *allele distributions*). Gre za skupine osebkov, pri katerih igrata v lokalni populacijski dinamiki vlogo rodnost in smrtnost, ne pa imigracije in emigracije (Moritz, 1995).

2.3.2 Posledice spolnega in nespolnega načina razmnoževanja pri rastlinah

Na genetsko strukturo rastlinskih populacij vplivajo številni dejavniki, kot so selekcija, struktura habitata, izolacija zaradi oddaljenosti, socialna organizacija, način razmnoževanja, genski pretok, genetski drift, evolucijska zgodovina ter drugi ekološki in evolucijski dejavniki (Loveless in Hamrick, 1984; Avise, 2004). Populacije splošno razširjenih vrst, ki se razmnožujejo spolno, pogosto kažejo visoko genetsko variabilnost (Hamrick in Godt, 1989), kar pa ne velja tudi za vrste, ki se razmnožujejo vegetativno ali za vrste, pri katerih je prisoten inbriding (Ellstrand in Roose, 1987; Bauert, 1998). Na splošno velja, da vrste, pri katerih prihaja do navzkrižnega parjenja (angl.

outcrossing), kažejo večjo genetsko diverziteto, a hkrati nižjo diferenciacijo med populacijami kot vrste, ki se razmnožujejo klonsko ali s samooploditvijo.

Vzdrževanje primerne genetske raznolikosti znotraj populacij je pomembno za dolgoročno preživetje populacij, saj omogoča genetske prilagoditve na spreminjače se okoljske dejavnike (Lande in Shannon, 1996) in preživetje nekaterih genotipov ob morebitnih stohastičnih dogodkih. Populacijska ozka grla, učinek ustanovitelja (angl. *founder effect*) in genetski drift lahko v majhnih populacijah vodijo do nepredvidljivih nihanj v frekvencah alelov (Ellstrand in Elam, 1993; Knapp in Connors, 1999), zaradi česar so majhne populacije ponavadi genetsko manj raznolike od velikih. Tako lahko na primer pri vrstah, ki so v pleistocenu prestale obsežne migracije, zaznamo nižjo genetsko raznolikost kot pri vrstah, ki so poledenitve preživele v t.i. ledenodobnih refugijih (Mosseler in sod., 1993; Lewis in Crawford, 1995). Velika genetska diferenciacija je posledica omejenega stika in s tem zmanjšanega genskega pretoka med populacijami, ko so se te zadrževale v ledenodobnih refugijih.

Na lokalno genetsko strukturo populacij ima pomemben vpliv način razmnoževanja vrste. Klonsko razmnoževanje lahko vodi do številnih genetskih posledic tako znotraj kot med populacijami (Balloux in sod., 2003; Bengtsson, 2003). Populacije z visoko stopnjo klonskega razmnoževanja kažejo večjo alelnou raznovrstnost, medtem ko je njihova genotipska raznovrstnost nižja. Populacije, ki se torej razmnožujejo nespolno, ohranjajo visoko genetsko raznovrstnost na vsakem posameznem lokusu, medtem ko kažejo nižje število posameznih genotipov. V popolnoma klonskih populacijah je genetska diferenciacija močno zmanjšana v primerjavi s populacijami, ki se razmnožujejo izključno spolno. Balloux in sod. (2003) so z računalniško simulacijo pokazali, da se z višanjem stopnje klonskega razmnoževanja efektivna alelna velikost populacije sprva počasi povečuje, s približevanjem striktnemu klonskemu razmnoževanju pa naraste proti ekstremnim vrednostim. Obratno pa velja za populacije, pri katerih je prisotna samooploditev, saj se v tem primeru efektivna velikost populacije zmanjšuje. Mešanih populacij, pri katerih je prisotno tako spolno kot klonsko razmnoževanje, praktično ne moremo razlikovati od populacij, ki se razmnožujejo striktno spolno (Balloux in sod., 2003).

Številne rastlinske vrste se razmnožujejo tako spolno kot tudi nespolno. Uspešnost posameznega načina razmnoževanja je pri takih vrstah odvisna od ekoloških in

genetskih dejavnikov, ki dajejo prednost enemu načinu razmnoževanja pred drugim (Eckert, 2002). Znano je, da se hibridne populacije v začetnih generacijah razmnožujejo predvsem nespolno, s ciljem povečanja števila cvetočih rastlin (ramet; poleg tega so hibridi v začetnih generacijah neredko manj plodni; Burke in sod., 2000; Silvertown, 2008). Klonsko razmnoževanje velja pogosto za alternativo spolnemu razmnoževanju v specifičnih, ponavadi težkih življenjskih razmerah. Zaradi odsotnosti spolnega razmnoževanja je lahko genetska diverziteta v takih populacijah manjša, s tem pa je zmanjšana tudi sposobnost prilagajanja na spremembe v okolju.

Kljub temu lahko pri nekaterih populacijah, ki se razmnožujejo klonsko, opazimo visoko genetsko diverziteto, pa primer pri vrsti *Saxifraga cernua* (Bauert in sod., 2007). Ena od možnih razlag je ta, da klonsko razmnoževanje podaljšuje življenjsko dobo genotipa in s tem prispeva k vzdrževanju genetske diverzitete populacije v neugodnih razmerah, ko je spolno razmnoževanje in preživetje mladih rastlin otežkočeno. Dolgoživeči genotip take rastlinske vrste ima torej dovolj časa, da lahko počaka na redke ugodne trenutke, ko lahko pride do navzkrižnega oprševanja in tvorbe semen. Klonsko razmnoževanje torej ne pomeni nujno alternative spolnemu razmnoževanju, temveč lahko nanj gledamo tudi kot način zagotavljanja outbridingu pod neugodnimi razmerami (Bauert in sod., 2007). Poleg tega so raziskave na lesnih vrstah z visoko stopnjo vegetativnega razmnoževanja v zadnjem času pokazale, da se pri populacijah lahko pojavljajo somatske mutacije, ki tudi prispevajo k povečevanju genetske diverzitete vrste, kot na primer pri robiniji (Lian in sod., 2004), divji češnji (Jarni in sod., v tisku) in drugih. Na ta način somatske mutacije prispevajo k evoluciji klonskih rastlin (Pelsy, 2010),

2.3.3 Molekulski markerji v filogeografskih in populacijskih študijah rastlin

Izbira ustreznih molekulskih markerjev je odvisna od cilja raziskave. Primerni molekulski markerji za študije populacijske genetike naj bi ustrezali kriterijem, kot so prisotnost Mendlovega dedovanja (prenos iz ene generacije v drugo), polimorfnost (za izbrani lokus mora obstajati več alelov - multialelni marker), kodominantnost (kodominanten marker omogoča razlikovanje med homozigoti in heterozigoti), odsotnost epistaze (lahko določimo genotip fenotipa ne glede na genotipe na drugih lokusih; epistaza pomeni sodelovanje dveh ali več lokusov), neodvisnost od okolja (ni

fenotipske plastičnosti, enakomerna razporejenost po genomu in visoka ponovljivost) (Solé, 2003). Kodominantni markerji omogočajo enostavno določanje stopnje frekvence alelov in tako omogočajo določanje genskega pretoka med populacijami ali pa študije disperzije. V nasprotju s tem lahko z dominantni markerji določimo genotipe, ne pa frekvence alelov. Dominantne markerje uporabljamo kot prstne odtise DNA in so nam v pomoč pri identifikaciji klonov (Solé, 2003).

V populacijski genetiki rastlin se kot markerji najpogosteje uporablja izocimi, RAPD (Williams in sod., 1990), RFLP (Botstein in sod., 1980), AFLP (Vos in sod., 1995), minisateliti in mikrosateliti (imenovani tudi SSR ali STR; Tautz in Renz, 1989), v nekaterih primerih pa so uporabna tudi visoko variabilna nukleotidna zaporedja (Beebee in Rowe, 2004), ki se večinoma nahajajo v nekodirajočih regijah, torej regijah, pri katerih ne prihaja do prepisa v RNA in zato te regije ne predstavljajo vira genetskih informacij. Zaradi nevtralnosti nekodirajočih regij naj bi se mutacije pojavljale relativno konstantno skozi čas, ne da bi nanje vplivala selekcija. Večina teorij populacijske genetike se je zato razvila za nevtralno DNA (Beebee in Rowe, 2004).

V (živalskih) filogeografskih raziskavah vse od začetka prevladuje uporaba mitohondijske DNA - mtDNA (Beebee in Rowe, 2004). V filogeografskih študijah rastlin se mtDNA ni uveljavila, saj je v primerjavi z živalsko mtDNA manj variabilna, zato njeno uporabo nadomešča kloroplastna DNA (cpDNA). Narašča tudi uporaba mikrosatelitnih markerjev, v prihodnosti pa pričakujemo porast raziskav, ki uporabljajo točkovne polimorfizme na jedrni DNA (SNP).

2.3.3.1 Kloroplastna DNA

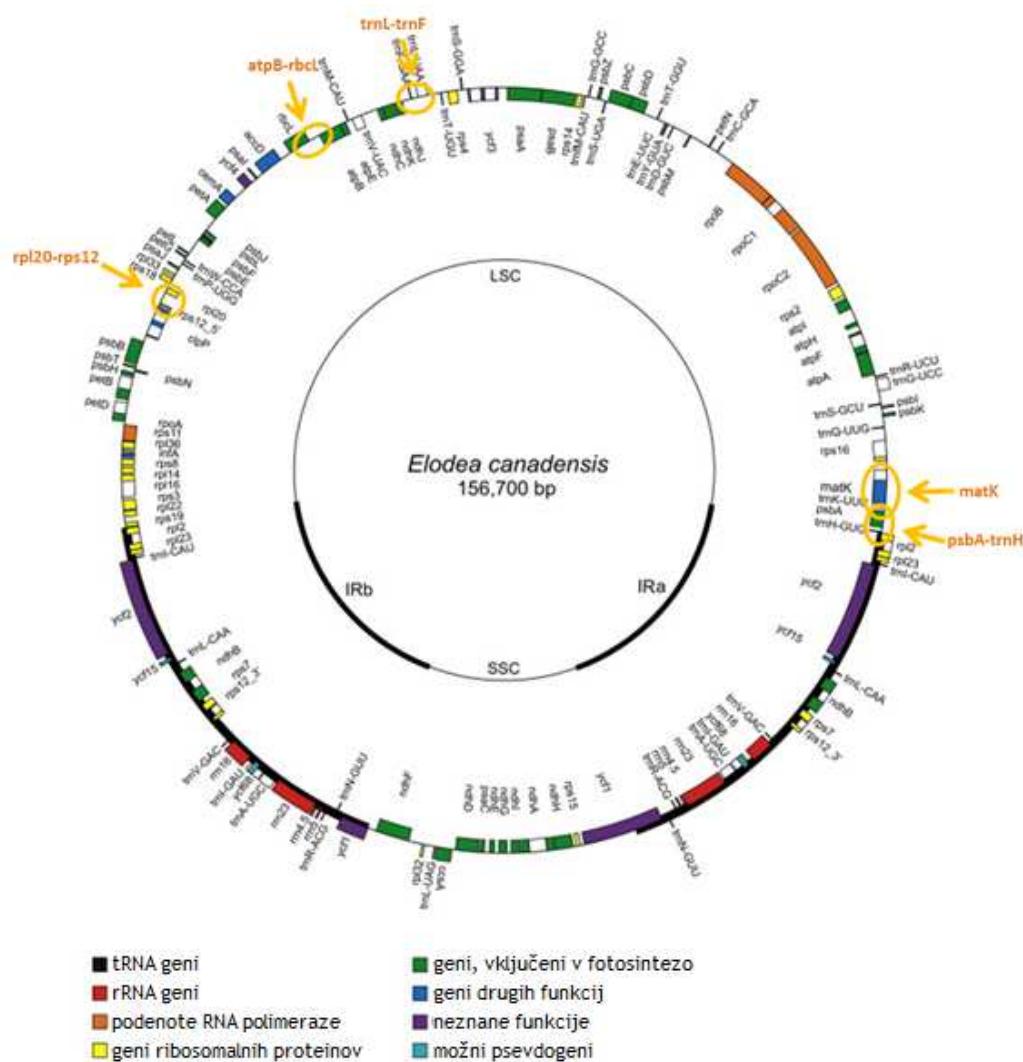
Kloroplastni genom kopenskih fotosintetskih rastlin meri med 120 in 217 kb; pri večini cvetnic je razpon velikosti med 135 in 160 kb (Petit in Vendramin, 2007). Genom se ponavadi nahaja v obliki enojnega krožnega kromosoma (slika 3). Poleg krožnih genomov pa se pri nekaterih organizmih hkrati pojavljajo tudi linearne molekule ali pa manjše krožne molekule, ki vsebujejo posamezne komponente celotnega genoma (Brown, 2007: 239). Kloroplastni genom je organiziran v dve regiji, znotraj katerih geni niso ponovljeni (angl. *single-copy region*): veliko (angl. *large single-copy*; LSC) in malo (angl. *small single-copy*; SSC). Ti regiji sta med seboj ločeni z dvema obrnjenima ponovitvama (angl. *inverted repeat*; IR), ki kodirata 18S in 23S ribosomalne RNA gene. Variacije v dolžini kloroplastne DNA gredo predvsem na račun dolžine IR, ki sta

spremenljivi. Zaporedja IR manjkajo pri nekaterih predstavnikih družine metuljnic (Palmer in Thompson, 1982) ter pri nekaterih iglavcih (Strauss in sod., 1988; Tsumura in sod., 1993). IR zaporedja so bila v skupnih prednikih kopenskih rastlin verjetno prisotna, vendar so se tekom evolucije pri nekaterih vrstah izgubila.

Čeprav sta struktura in vsebnost (razporeditev) genov pri večini kopenskih rastlin visoko konzervativni, obstajajo pri nekaterih taksonih tudi obsežne inverzije, na primer pri nekaterih predstavnikih družine zvončičevk, metuljnic ali pri rodu *Pelargonium* (Petit in Vendramin, 2007). Med 30 in 40 % zaporedij je nekodirajočih, introni se pojavljajo pri 18 % genov.

Število kloroplastnih genomov znotraj celic različnih fotosintetskih organizmov se razlikuje. Fotosintetski mikroorganizem *Chlamydomonas* na primer vsebuje okoli 1000 kloroplastnih genomov v vsaki celici, medtem ko celice višjih rastlin vsebujejo okoli 200 kloroplastnih genomov. Večina kloroplastnih genomov vsebuje okoli 200 istih genov, ki kodirajo tRNA in rRNA, ribosomalne proteine ter proteine, ki so vključeni v fotosintezo (Brown 2007: 240). Kloroplasti nosijo zapis za vse tRNA, ki jih potrebujejo za lastno sintezo beljakovin, iz jedra pa uvažajo nekatere ribosomske beljakovine, potrebne za sestavo 70S ribosomov, ter nekatere beljakovine, vključene v fotosintezo. Kloroplastni genom na primer kodira velike podenote ribulozne-1,5-bifosfatne karbosilaze/oksigenaze (Rubisco), jedrni genom pa male. Kloroplastni genom kodira tudi lastno RNA polimerazo (Sugiura, 1992).

Med najpogosteje uporabljenimi zaporedji DNA v molekularni sistematiki in filogeniji rastlin so kloroplastni geni *rbcL* (kodira veliko podenoto ribuloze-1,5-bisfosfat karbosilaze), *atpB* (kodira beta podenoto ATP sintaze) in *matK* (verjetno vključen v izrezovanje intronov maturaze). Omenjeni geni so v filogenijah pogosto uporabljeni zaradi enostavnega pomnoževanja s PCR, majhnega števila indelov ter stopnjo evolucije in ohranjanja. Omenjene gene se uporablja v sistematiki in filogeniji, saj omogočajo podporo na različnih taksonomskih ravneh. Na podlagi omenjenih regij so bila razrešena razmerja na ravni družine ali višje (Soltis in sod., 1997, 2001; Savolainen in sod., 2000; Hilu in sod., 2003).



Slika 3: Kloroplastni genom vodne kuge (*Elodea canadensis*) (prilagojeno po Huotari in Korpelainen, 2012: 99). Na genomu so z oranžno barvo obkrožene regije, uporabljene v raziskavi na Blagajevem volčinu (*Daphne blagayana*).

Figure 3: Chloroplast genome of *Elodea canadensis* (adapted from Huotari in Korpelainen, 2012: 99). Regions, used in the analysis of *Daphne blagayana*, are circled in orange.

Poleg kodirajočih zaporedij se v filogenetskih študijah pogosto uporablja tudi nekodirajoče regije. Te so včasih tako variabilne, da jih lahko uporabimo pri analizah filogenetskih odnosov med podvrstami, varietetami ali sortami ali v populacijskih in filogeografskih študijah (Pleines in sod., 2008). Ker sprememb v nekodirajočih regijah DNA ne omejuje selekcija, lahko na teh območjih zasledimo veliko število polimorfnih

mest. Danes najbolj uporabljeni nekodirajoči območji so relativno konzervativna DNA območja - večinoma gene. Za pomnoževanje odsekov DNA namreč potrebujemo začetne oligonukleotide, ki jih lahko izdelamo le na podlagi vnaprej znanih sekvenc - te pa se večinoma nahajajo na genih. Na ta način lahko dizajniramo univerzalne začetne nukleotide za PCR. Teh je danes v uporabi že veliko število, ki še narašča s poznavanjem genoma vse več rastlinskih vrst.

S sekvenciranjem kompletnih nukleotidnih zaporedij kloroplastnega genoma (prvi so bili sekvencirani v 80. letih 20. stoletja) so se v zadnjih desetletjih odprle možnosti za izdelavo univerzalnih začetnih nukleotidov za intraspecifične študije. Ti začetni oligonukleotidi so večinoma zasnovani v konzervativnih regijah (ponavadi kodirajočih), ki obdajajo bolj variabilne (ponavadi nekodirajoče) regije. Večina nekodirajočih regij, to je medgenskih vmesnikov in psevdogenov, je bogatih z AT zaradi majhnih funkcionalnih omejitev. Majhne funkcionalne omejitve vplivajo na hitrejšo stopnjo evolucije pri večini vmesnikov.

Objava univerzalnih začetnih oligonukleotidov je zelo olajšala filogeografske študije ter filogenetske raziskave na nižjih taksonomskih ravneh. V filogeografskih (ter pogojno tudi v populacijskih) raziskavah se najpogosteje uporablja medgenske regije *rpl20–rps12*, *atpB–rbcL*, *trnL–F*, *psbA–trnH*, *trnS–trnG*, intron *atpF* ter medgenska regija *trnK–matK* skupaj z genom *matK*.

2.3.3.1.1 Gen *rbcL* in medgenski vmesnik *atpB–rbcL*

Soltis in sod. (1993) ugotavljajo, da ima gen *rbcL* pri nekaterih skupinah omejene možnosti za razreševanje sorodstvenih razmerij na rodovni ravni. Soltis in Kuzoff (1995) sta pri proučevanju rodu *Heuchera* ugotovila, da zaporedje gena ne vsebuje zadostne filogenetske informacije za razločevanje nižjih taksonomskih ravni.

Medgenski vmesnik *atpB–rbcL* se nahaja v LSC regiji kloroplastnega genoma med genoma *rbcL* in *atpB*. Chiang in sod. (1998) so pokazali variabilnost v dolžini regije pri različnih (višjih in nižjih) rastlinah; dolžina vmesnika se z evolucijsko naprednejšimi stopnjami podaljšuje (npr. 507 bp v jetrenjaku *Marchantia*, 550 bp pri mahu *Phytidiadelphus*, okoli 1000 bp pri golosemenki *Cunninghamia lanceolata*, okoli 800 bp pri enokaličnicah in 850-900 bp pri dvokaličnicah). Variabilnost vmesnika se razlikuje med posameznimi rastlinskimi skupinami; posledično se lahko vmesnik

uporablja na nivoju vrste (ali nižje) in rodu, v nekaterih primerih pa tudi pri študijah populacijske genetike. Vmesnik je bogat z AT zaporedji.

2.3.3.1.2 Gen *trnL* in medgenski vmesnik *trnL*–F

TrnL–F regija kloroplastne DNA se nahaja znotraj LSC regije kloroplastnega genoma med tRNA genoma *trnL* in *trnF* ter v bližini gena *rbcL*. Vključuje gen *trnL* (intron skupine I) in medgenski vmesnik *trnL*–F (Hao in sod., 2009). Medtem ko ima *trnL* intron konzervativno sekundarno strukturo, je medgenski vmesnik visoko variabilen v svoji dolžini in nukleotidnem zaporedju, zato se predvideva, da so različni deli *trnL*–F regije podvrženi različnim vzorcem evolucije. Sekundarna struktura *trnL* introna in *trnL*–F vmesnika vsebuje zanke, sestavljenе iz tandemskih ponovitev. Znotraj vmesnika se nahajajo promotorski elementi za gen *trnF*. Tako gen *trnL* kot vmesnik *trnL*–F se pogosto uporablja na različnih taksonomskih ravneh (Hao in sod., 2009).

2.3.3.1.3 Gen *psbA* in medgenski vmesnik *psbA*–*trnH*

Medgenska regija *psbA*–*trnH* spada med bolj variabilne regije kloroplastnega genoma kritosemenk. Pogosto jo uporabljajo v populacijski genetiki in v filogenetskih raziskavah na ravni vrste. Predlagana je kot ena od primernih regij za črtne kode DNA (Kress in sod., 2005). Regija vključuje dve območji, ki se razlikujeta v evolucijskem ohranjanju: 1) kodirajoče zaporedje *psbA* 3'UTR (angl. *untranslated region*), potrebno za uspešno procesiranje RNA in 2) medgenski neprepisan vmesnik *psbA*–*trnH* (angl. *intergenic non-transcribed spacer*), katerega funkcija je zaenkrat neznana (slika 4).

Dolžina medgenskega vmesnika *psbA*–*trnH* pri golo- in kritosemenkah variira med 200 in 500 bp. Odsek izkazuje visoko variabilnost znotraj vrste in med vrstami znotraj rodu. Kljub temu, da je nukleotidna variabilnost znotraj tega odseka visoka, so bili s primerjavo nukleotidnih zaporedij nesorodnih taksonomskih skupin tudi znotraj vmesnika odkriti konzervativni odseki dolžine 6-30 bp (Štorchová in Olson, 2007).



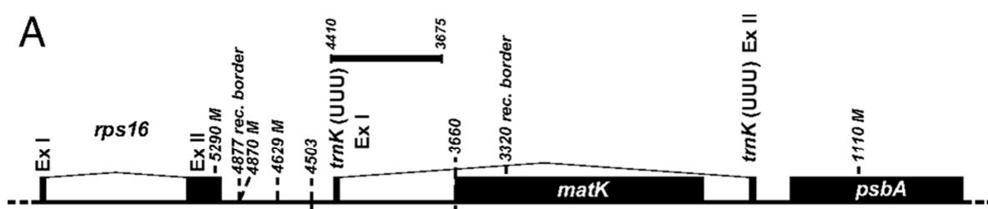
Slika 4: Shematski prikaz medgenskega vmesnika *psbA–trnH* pri dvokaličnicah. Oznaka TATA se nanaša na domnevno konzervativen funkcijski motiv na steblu zanke. Oznaki PSBA and H se nanašata na mesto prijemanja univerzalnih oligonukleotidov, ki jih je razvil Hamilton (1999).

Figure 4: Schematic drawing of the intergenic spacer *psbA–trnH* in dicots. TATA represents the supposedly conservative functional motif on the stem of the loop. PSBA and H represent the annealing site of universal primers, developed by Hamilton (1999).

2.3.3.1.4 Genska regija *trnK–matK*

Plastidna genska regija *trnK–matK* je univerzalno prisotna pri kopenskih rastlinah, le v redkih primerih je prišlo do njene sekundarne izgube ali reorganizacije (Funk in sod., 2007). Gen *matK* je vgnezden med 5' in 3' eksona *trnK* (ekson I in ekson II; slika 5) znotraj LSC regije kloroplastnega genoma (Sugita in sod., 1985).

Način in hitrost evolucije gena *matK* se močno razlikuje od ostalih kloroplastnih genov. Gen *matK* je hitro evoluirajoč, stopnja substitucije nukleotidov je trikrat večja kot pri veliki podenoti Rubisca (*rbcL*) in šestkrat hitrejša na stopnji substitucij aminokislin (Barthet, 2006: 2). Hitra stopnja substitucije nukleotidov in aminokislin omogoča visok filogenetski signal za razrešitev evolucijske sorodnosti med rastlinami na vseh taksonomskih stopnjah (Johnson in Soltis, 1994). Poleg substitucij kaže *matK* tudi različno število in dolžino indelov, vendar se jih večina pojavlja v multiplih treh nukleotidov, kar pomeni, da se na ta način ohranja bralni okvir (Hilu in Liang, 1997).



Slika 5: Shematski prikaz *trnK–matK* regije. Prilagojeno po Zoschke in sod. (2010: 3246).

Figure 5: Schematic representation of the *trnK–matK* region. Adapted from Zoschke et al. (2010: 3246).

Mutacije (substitucije) se na genu *matK* ne pojavljajo enakoverno vzdolž celega gena, temveč imajo različna območja znotraj gena različno stopnjo substitucij. Visoko konzervativna regija, imenovana domena X, je dolga 448 bp in se nahaja na koncu 3' gena *matK*. Na tem območju so indeli odsotni.

Gen *matK* je pri večini cvetnic dolg okoli 1500 bp, kar ustreza okoli 500 aminokislinam, ki kodirajo proteinski produkt. V genu se pojavljajo indeli v različnem številu in obsegu (dolžini). Parazitski rod *Epifagus* na primer vključuje delecijo 200 bp na 5' koncu. Variabilnost gena *matK* je veliko večja na stopnji aminokislin kot na stopnji nukleotidov (87 % napram 67 %); od 527 aminokislin, ki jih kodira zaporedje 1581 nukleotidov, je variabilnih aminokislin kar 456 (87 %) (Hilu in Liang, 1997). V nasprotju s tem je na primer za funkcionalno omejen kloroplastni gen *rbcL* značilna veliko manjša variabilnost aminokislin kot nukleotidov (5 % napram 59 %; Hilu in Liang, 1997). Le rahlo višja stopnja mutacij v genu *matK* velja za tretje mesto v kodonu (razmerje 32:31:37 glede na 1., 2. in 3. mesto v kodonu), kar bi lahko razložilo veliko stopnjo mutacij v aminokislinskem zaporedju (Hilu in Liang, 1997) in posledično nakazovalo sproščeno usmerjeno selekcijo (angl. *relaxed directional selection*) ali tendenco k nevtralni selekciji.

Gen *matK* vsebuje številna informativna mesta tako znotraj konzervativnih in tudi znotraj variabilnih regij. Zaradi indelov, ki se pojavljajo povečini v tripletih, se je poravnavanje sekvenč izkazalo za dokaj enostavno tudi na višjih taksonomskih ravneh (Hilu in Liang, 1997). Uporabnost gena *matK* so izkazale študije na različnih skupinah rastlin tudi na nižjih taksonomskih ravneh (nivo roda ali niže), na primer znotraj družine kamnokrečevk (rodovi *Saxifraga*, *Chrysosplenium*, *Astilbe* in *Saxifragopsis*; Johnson in Soltis, 1994; Soltis, 1996), trav (Liang in Hilu, 1996), kukavičevk, znotraj

skupine Asterides ter v drugih taksonih znotraj cvetnic. Filogenetska drevesa, narejena na podlagi gena *matK*, so se izkazala za bolj robustna celo kot pri uporabi kombinacije več genov (Barthet, 2006).

Za uporabo plastidnega gena *matK* v filogenetskih in drugih študijah obstajajo danes znana zaporedja več univerzalnih začetnih oligonukleotidov. Med drugim so zaporedja začetnih oligonukleotidov objavili Liang in Hilu (1996), Hilu in Liang (1997), Johnson in Soltis (1995), Long in sod. (2000) ter Wicke in Quandt (2009).

Hilu in Liang (1997) sta v svoji študiji dokazala, da uporaba celotnega nukleotidnega zaporedja gena *matK* ni vselej nujna oz. lahko celo ni tako informativna kot uporaba določenih odsekov tega gena (glej tudi Wicke in Quandt, 2007). Nekateri odseki lahko namreč povečajo šum v filogenetskih analizah. Visoko variabilno regijo 5' je na primer treba na višjih taksonomskih nivojih uporabljati kritično zaradi možne saturacije mest ali možnih multiplih zadetkov, angl. *multiple hits* (Hilu in Liang, 1997).

2.3.3.1.5 *Medgenski vmesnik rpl20–rps12*

Medgenski vmesnik *rpl20–rps12* se nahaja med ribosomalnimi proteinskimi geni L20 in S12 (Renner in sod., 2004). Njegova dolžina je variabilna in znaša med 715 in 880 bp (Shaw in sod., 2005; Hamilton, 1999). Vmesnik pogosto uporabljajo v filogenetskih raziskavah (npr. Renner in Zhang, 2004; Renner in sod., 2004; Schaefer in sod., 2008), redkeje pa v filogeografskih raziskavah (npr. Simões Ramos in sod., 2007; Gao in sod., 2009).

2.3.3.2 Jedrni markerji

V primerjavi s kloroplastno DNA so jedrni geni redkeje uporabljeni v filogeografskih raziskavah rastlin. Retikulatna evolucija, hibridizacija in poliploidija so dejavniki, ki omejujejo uporabo jedrne DNA za namene filogeografskih študij, saj prinašajo »neželjeno« variabilnost. Najprimernejši jedrni gen za uporabo v filogeografskih študijah bi moral biti prisoten v eni sami kopiji, s čimer bi se izognili potencialnim težavam, ki jih povzročajo multipli paralogi. Kaže, da je število jedrnih genov oz. regij, ki bi omogočale primerjavo sekvenc na nižjih taksonomskih ravneh, omejeno (Sang, 2002).

Kljub temu obstajajo jedrne DNA regije, ki kažejo potencial za zaznavanje filogenetskih

razmerij na ravneh, nižjih od rodu. Njihova uporaba obsega najrazličnejše organizme, od rastlin do bakterij (White in sod., 1990; Nickrent in Soltis, 1995; Soltis in sod., 1997, 2001). Danes najpogosteje uporabljeni regiji je ITS (Internal Transcribed Spacer), ki predstavlja del jedrne ribosomalne transkripcijske enote (angl. *nuclear ribosomal transcription unit*; NRTU, drugače imenovane tudi 18S-5.8S-28S jedrni ribosomalni cistron). Ta je sestavljena iz 18S, 5.8S in 28S genov, dveh notranjih vmesnikov (ITS-1 in ITS-2) ter medgenskega vmesnika (IGS) (Ali in sod., 2011). Konzervativni regiji, gena 18S in 28S, se uporabljata pri filogenetskih raziskavah na višjih taksonomskeih ravneh, medtem ko sta hitreje spreminjajoči se regiji ITS in IGS uporabni tudi na nižjih taksonomskeih nivojih (na nivoju rodu ali populacij) (Alvarez in Wendel, 2003).

Znotraj regije ITS se izmenjujejo visoko variabilne regije ter konzervativna območja, ki so omogočila izdelavo univerzalnih začetnih oligonukleotidov. Glede na strukturo in nukleotidno zaporedje (dolžina zaporedja in vsebnost GC) kažeta regiji ITS-1 in ITS-2 funkcionalno omejenost, zaradi česar sta uporabni v filogenetskih rekonstrukcijah na nižjih taksonomskeih ravneh (Goertzen in sod., 2003).

V nasprotju z nekaterimi drugimi jedrnimi regijami (npr. IGS), je dolžina ITS konzervativna. Zaradi omenjenega razloga, ki omogoča lažje poravnvanje sekvenč, vključno z visoko variabilnostjo njenega nukleotidnega zaporedja, se je regija izkazala kot zelo uporabna v sistematskih študijah. Bolj omejena je njena uporaba na nižjih taksonomskeih ravneh (znotraj vrste), saj zaporedja pri nekaterih vrstah ne kažejo zadostne variabilnosti. Tudi retikulacija, hibridizacija in poliploidija ter usklajena evolucija (angl. *concerted evolution*) omejujejo uporabo ITS v filogeografskih študijah, saj prispevajo k neželjeni variabilnosti (Sabovljević, 2006).

V raziskavi, ki je zajela 244 člankov s filogenetsko vsebino, objavljenih med letoma 1998 in 2002, Alvarez in Wendel (2003) kritično ugotavlja, da se regija ITS uporablja v dveh tretjinah (66 %) vseh člankov, kar v dobrji tretjini (34 %) pa se rezultati študij nanašajo izključno na regijo ITS. Ne glede na koristno informacijo, ki jo lahko posreduje ITS, je opiranje samo na to regijo zaradi številnih zgoraj omenjenih razlogov vprašljivo.

Kljub začetnim dvomom o zadostni variabilnosti regije ITS za znotrajvrstne raziskave (Schaal in sod., 1998) se je kasneje izkazalo, da številne vrste kažejo zadostno variabilnost znotraj te regije za filogeografske študije zlasti pri vrstah s krajšo

življenjsko dobo.

2.3.3.2.1 AFLP markerji

AFLP tehniko so razvili Vos in sod. (1995). Metoda temelji na PCR pomnoževanju izbranih restrikcijskih fragmentov iz celokupne DNA. Označene fragmente v dolžini 50–600 bp ločimo s pomočjo elektroforeze. Več o tehniki je zapisano v poglavju 3.4.1.

Tehnika predpostavlja, da so migrirajoči fragmenti iste dolžine homologni. Vendar to ne drži vselej, zlasti pri zelo diferenciranih skupinah so lahko komigrirajoči fragmenti nehomologni. Možne napake zaradi migracije nehomolognih fragmentov naj bi bile izničene z uporabo velikega števila alelov.

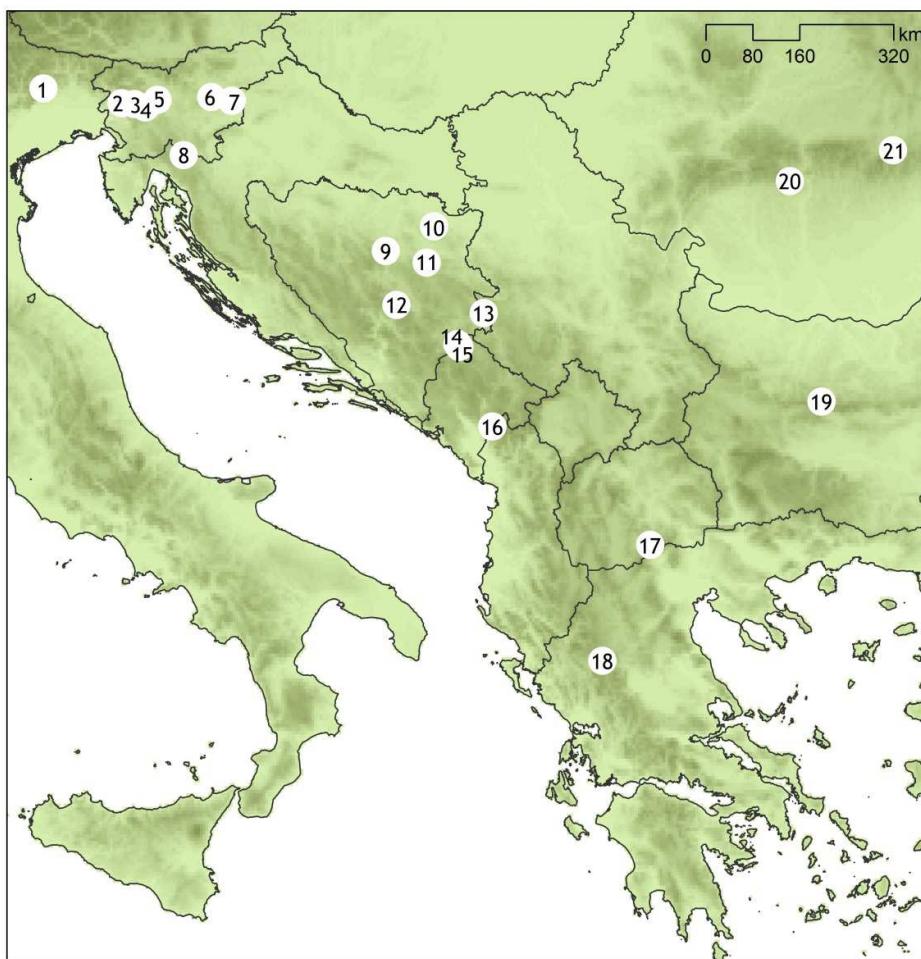
AFLP markerji so dominantni markerji; to pomeni, da ne moremo razlikovati med homozigoti in heterozigoti, kar velja za največjo pomanjkljivost tehnike². Prisotnost pomnoženega fragmenta označujemo z 1; tako pomeni 1 prisotnost dominantnega alela ali heterozigota, odsotnost (označujemo jo z 0) pa recessiven alel. AFLP nam torej ne obmogoča, da pridobimo informacijo o znotrajpopulacijski heterozigotnosti (H_E), vendar se kot dokaj ustrezan ekvivalent heterozigotnosti za dominantne markerje uporablja Neieve genetsko diverzitetu (H_S), zlasti če so v populaciji heterozigoti redki in se rastline samooprašujejo (Nybom, 2004). Za vrste, ki se razmnožujejo pretežno spolno in imajo navzkrižno opravjevanje, lahko uporabimo modifikacije Neieve formule, kot jih predlagata Lynch in Milligan (1994). Genetsko diferenciacijo med populacijami ocenjujemo pri dominantnih markerjih kot fiksacijski koeficient G_{ST} , ki ustreza Wrightovemu F_{ST} (Nybom, 2004).

² Nekatere študije (npr. Ajmone-Marsan in sod., 1997) so na podlagi intenzitete pomnoženih fragmentov tudi AFLP markerje uspele analizirati kot kodominantne markerje, vendar take študije še danes ostajajo bolj izjema kot pravilo.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORČENJE BLAGAJEVEGA VOLČINA

Rastlinski material je bil nabran na 21 lokalitetah, razporejenih po vsem Balkanskem polotoku (sliki 6 in 7). Seznam lokalitet s koordinatami je predstavljen v preglednici 1.



Slika 6: Zemljevid vzorčnih mest Blagajevega volčina. Številke ustrezanojo lokalitetam v preglednici 1.

Figure 6: Map of sampling localities of *Daphne blagayana*. The numbers correspond to the localities in table 1.

Za namen izolacije DNA smo z vsake vzorčene rastline nabrali približno dva sveža mlajša lista in ju shranili v silikagelu. Rastline, s katerih smo odvzeli liste za genetske analize, smo herbarizirali in shranili na Oddelku za gozdarstvo in obnovljive gozdne

vire Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani za morebitne nadaljnje morfometrične analize. Po eno rastlino na populacijo smo herbarizirali in shranili na Inštitutu za biodiverzitetne študije Znanstveno-raziskovalnega središča Univerze na Primorskem. Ker se vrsta razmnožuje tudi vegetativno, smo vzorce listov nabrali z rastlin, ki so rasle vsaj 10 metrov narazen, s čimer smo se žeeli izogniti nabiranju klonov.

Preglednica 1: Seznam lokalitet vzorčenja Blagajevega volčina. Analiza kloroplastne DNA je bila izvedena za vse populacije, z zvezdico pa so označene populacije, ki smo jih uporabili v AFLP analizi.

Table 1: List of sampling locations of *Daphne blagayana*. The analysis of chloroplast DNA was conducted on all populations, while AFLP analysis was conducted on populations marked with asterisk.

	vzorčno mesto	oznaka	koordinate	država	geološka podlaga
1.	Karnijske Alpe*	ITA	46.220, 12.647	Italija	dolomit
2.	Dolina Trebuše*	TG	46.061, 13.844	Slovenija	dolomit
3.	Idrija	ID	46.052, 14.040	Slovenija	dolomit
4.	Samija	SA	46.016, 14.210	Slovenija	dolomit
5.	Jetrbenk	JE	46.097, 14.392	Slovenija	dolomit
6.	Gračnica*	GRA	46.127, 15.219	Slovenija	dolomit
7.	Kozjanski park	KP	46.088, 15.534	Slovenija	dolomit
8.	Mirtoviški potok*	MI	45.506, 14.794	Slovenija	dolomit
9.	Smolin*	SM	44.463, 17.890	BiH	serpentin
10.	Maoča	MA	45.136, 18.629	BiH	serpentin
11.	Konjuh	KO	44.336, 18.514	BiH	serpentin
12.	Kreševo*	KR	43.868, 18.053	BiH	apnenec, dolomit in serpentin
13.	Stolac*	ST	43.779, 19.389	BiH	apnenec, dolomit in serpentin
14.	Čelebići*	CE	43.433, 18.987	BiH	apnenec, dolomit in serpentin
15.	Meštrovac	ME	43.401, 19.016	BiH	apnenec, dolomit in serpentin
16.	Berane*	CG	42.506, 19.521	Črna Gora	apnenec
17.	Kožuf*	MK	41.150, 21.938	Makedonija	apnenec
18.	Prelaz Katara*	GRC	39.792, 21.205	Grčija	serpentin
19.	Stara planina*	BG	42.789, 24.559	Bolgarija	apnenec
20.	Buila Vanturarita*	BV	45.225, 24.075	Romunija	apnenec
21.	Piatra Mare	PM	45.557, 25.654	Romunija	apnenec

Za osebke, ki smo jih nabrali na vsakem od 21 vzorčnih mest, v nadaljevanju uporabljam označke iz preglednice 1. Skupino osebkov s posameznega vzorčnega mesta v nadaljevanju imenujemo populacija.



Slika 7: Rastišča Blagajevega volčina: A) gorovje Pindos (Grčija), B) Stara Planina (Bolgarija), C) Piatra Mare (Romunija), D) Kozjanski park (Slovenija), E) Buila Vanturarita (Romunija), F) Dolina Gračnice (Slovenija). (Foto: Ž. Fišer Pečnikar, P. Glasnović, M. Lužnik).

Figure 7: Habitats of *D. blagayana*. A) Pindos Mountains (Greece), B) Stara Planina (Bulgaria), C) Piatra Mare (Romania), D) Kozjanski park (Slovenia), E) Buila Vanturarita (Romania), F) Gračnica Valley (Slovenia). (Photo: Ž. Fišer Pečnikar, P. Glasnović, M. Lužnik).

3.2 IZOLACIJA DNA IN DOLOČANJE KONCENTRACIJE

Izolacijo DNA smo izvedli po protokolu proizvajalca izolacijskih kitov SIGMA (GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit). V zadnjem koraku izolacije, pri izpiranju DNA s kolone, smo uporabili pufer TdE, DNA smo izprali dvakrat z volumnom 50 µL. Vzorce DNA smo shranili na -20° C.

3.2.1 Kvantitativno določanje DNA s spektrofotometrom

Koncentracije DNA smo določili s pomočjo spektrofotometra Epoch (BioTek). Spektrofotometer smo pred vsakim merjenjem umerili tako, da smo na ploščo nanesli dva slepa vzorca z destilirano vodo (3 µL). Po merjenju slepih vzorcev smo na očiščeno ploščo nanesli po 3 µL izolirane DNA za vsak vzorec. Spektrofotometer meri absorbanco pri valovni dolžini 260 nm, kar predstavlja absorpcijski maksimum nukleinskih kislin, ter pri valovni dolžini 280 nm; razmerje A260/A280 nam pove čistost vzorca. Razmerje med 1,8 in 2,0 predstavlja optimalno čist vzorec brez prisotnosti proteinov.

Vzorce, ki smo jih uporabili za določanje nukleotidnega zaporedja, smo redčili z deionizirano vodo do koncentracije 5 ng/µL. Redčene vzorce s koncentracijo 5 ng/µL smo pripravili do volumna 20 µL. Vzorcev za AFLP nismo redčili.

3.2.2 Kvalitativno določanje DNA z gelsko elektroforezo

Agarozno gelsko elektroforezo uporabljamo za ločevanje različnih dolžin DNA fragmentov. Metoda temelji na premikanju negativno nabitih molekul DNA skozi pore agaroznega gela (pore merijo med 100 in 300 nm) od negativno nabite katode proti pozitivno nabiti anodi. Manjši fragmenti molekule DNA se premikajo hitreje, saj jih pore agaroznega gela manj ovirajo, večji fragmenti pa potujejo počasneje. Glede na gostoto gela lahko ločimo različne velikosti molekul DNA (Brown, 2002).

Nekatere vzorce izolirane DNA smo preverili na 1,8 % agaroznem gelu, pripravljen s pufrom TBE (0,5 X). Raztopino smo premešali in 2-3 minute segrevali v mikrovalovni pečici, dokler mešanica ni zavrela. Nato smo erlenmajerico s tekočim agaroznim gelom pod tekočo vodo ohlajali do približno 60 °C. Vsebino smo vlili v kalup elektroforeze,

pri čemer smo pazili, da niso nastali zračni mehurčki, vstavili 2 glavnička ter počakali, da se je gel strdil in ohladil. Ko se je gel ohladil, smo ga prenesli v elektroforezno kadičko, napolnjeno z 0,5 x TBE puferom ter jo priklopili na usmernik BioRad. Elektroforezo smo nastavili na napetost 120 V ter pustili teči približno 30 minut. Vzorce za elektroforezo smo pripravili tako, da smo 5 µL izolirane DNA zmešali s 3 µL nanašalnega barvila (6X Loading Dye, Fermentas). Nanašalno barvilo nam omogoča spremeljanje nanašanja DNA na gel ter njenega potovanja proti anodi. Poleg tega barvilo zaradi večje gostote zadržuje DNA v luknjici gela. Poleg izolirane DNA smo vedno nanesli tudi merilno lestvico, ki nam je omogočila preverjanje dolžine vzorcev izolirane DNA.

Po končani elektroforezi smo agarozni gel za 20 minut potopili v pufer TBE z etidijevim bromidom (EtBr). Etidijev bromid se vgradi med baze nukleinskih kislin in omogoča detekcijo pod UV svetlobo. Gel smo nato sprali pod tekočo vodo in ga slikali s pomočjo UV-transiluminatorja Uvitec, MiniBis in programske opreme GelCapture.

Za raziskavo filogeografske stukture smo analizirali vseh 21 populacij, medtem ko smo zaradi časovnih in finančnih omejitev za raziskavo populacijske genetike izbrali 15 populacij, ki so pokrivale celoten areal vrste. V primeru, ko smo imeli na ožjem geografskem območju vzorčenih več populacij, smo tako nekatere populacije izločili iz populacijske študije.

3.3 KLOROPLASTNA DNA

3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) in določanje nukleotidnih zaporedij

Za namen filogeografske analize Blagajevega volčina smo preverili variabilnost petih odsekov kloroplastne DNA: štirih medgenskih vmesnikov (*rpl20-rps12*, *atpB-rbcL* in *psbA-trnH*, *trnL-F*) ter gensko regijo *trnK-matK* z genom *matK*. Vse uporabljene začetne oligonukleotide (25 pmol/µL) smo naročili pri proizvajalcu IDT DNA. MgCl₂, Taq polimerazo (5 U/µL), 10x PCR pufer in dNTP smo naročili pri proizvajalcu Fermentas. DNA smo redčili z deionizirano vodo do koncentracije 5 ng/µL. Reakcijske mešanice smo inkubirali v termociklerju AB 2720 (Applied Biosystems).

Pomnoževanje medgenskega vmesnika *atpB–rbcL* je potekalo v 200 µL mikrocentrifugirkah. Pripravili smo po 25 µL reakcijske mešanice, ki jo je sestavljal 1,5 µL MgCl₂, 2,5 µL 10x PCR pufra, 2 µL 2 µM dNTP, 1 µL začetnega nukleotida atpB, 1 µL začetnega nukleotida rbcL, 0,25 µL Taq polimeraze in 14,75 µL ddH₂O ter 2 µL DNA. Reakcijsko mešanico smo inkubirali v termociklerju po naslednjem postopku: 5 min na 94 °C, čemur je sledilo 35 ciklov 1 min na 94 °C, 30 sek na 50 °C, 1 min na 72 °C. Sledila je elongacija za 5 min na 72 °C ter shranjevanje vzorcev na 4 °C.

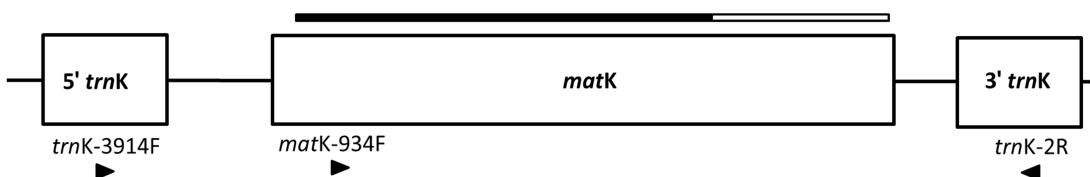
Preglednica 2: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje fragmentov kloroplastne DNA.

Table 2: List of primers used for the amplification of chloroplast DNA fragments.

odsek	Zaporedje začetnega oligonukleotida (5' → 3')	Ime začetnega oligonukleotida	Vir zaporedja
<i>matK</i>	GGG GTT GCT AAC TCA ACG G	trnK-3914F	Johnson in Soltis, 1994
	AAC TAG TCG GAT GGA GTA G	trnK-2R	Johnson in Soltis, 1994
	ATT TTG GTT ATG ACA ATA A	matK -934F	Johnson in Soltis, 1994
<i>rpl20–rps12</i>	CGY YAY CGA GCT ATA TAT CC	rpl20	Hamilton in sod., 1999
	ATT AGA AAN RCA AGA CAG CCA AT	rps12	Hamilton in sod., 1999
<i>psbA–trnH</i>	CGCGCATGGTGGATTCACAAATC	trnH	Sang in sod., 1997
	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	psbA	Sang in sod., 1997
<i>atpB–rbcL</i>	GAAGTAGTAGGATTGATTCTC	atpB	Samuel in sod., 1997
	CCCTACAACTCATGAATTAAG	rbcL	Samuel in sod., 1997
<i>trnL–F</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG	trnL-c	Taberlet in sod., 1991
	ATTTGAACTGGTGACACGAG	trnL-f	Taberlet in sod., 1991

Za pomnoževanje dela medgenskega vmesnika *trnL–F* smo uporabili univerzalna začetna oligonukleotida trnL-c in trnL-F. Pomnoževanje je potekalo v 200 µL mikrocentrifugirkah. Pripravili smo po 30 µL reakcijske mešanice, ki jo je sestavljal 2,4 µL MgCl₂, 3 µL 10x PCR pufra, 1,6 µL 2 µM dNTP, 1,2 µL začetnega nukleotida trnL-c, 1,2 µL začetnega nukleotida trnL-f, 0,25 µL Taq polimeraze in 16,5 µL ddH₂O ter 3 µL DNA. Reakcijsko mešanico smo inkubirali v termociklerju po postopku: 5 min na 94 °C, čemur je sledilo 35 ciklov 30 sek na 94 °C, 30 sek na 51 °C, 30 sek na 72 °C. Sledila je elongacija za 10 min na 72 °C ter shranjevanje vzorcev na 4 °C.

Za pomnožitev regije *trnK–matK* z genom *matK* smo prvotno izbrali le en set začetnih oligonukleotidov, ki imajo mesto prileganja znotraj eksona *trnK*: *trnK-3914F* in *trnK-2R*. Zaradi težav pri pomnoževanju tako dolgega odseka smo se odločili še za uporabo vmesnega začetnega oligonukleotida, ki ima mesto prileganja znotraj *matK* regije, to je *matK-934F*. Prikaz mest prileganja začetnih oligonukleotidov je prikazan na sliki 8. Kljub uporabi vmesnega začetnega oligonukleotida nam ni uspelo pomnožiti celotnega odseka, temveč smo dobili 3 ločene odseke.



Slika 8: Mesta prileganja uporabljenih začetnih oligonukleotidov *trnK-3914F*, *matK-934F* in *trnK-2R* (Johnson in Soltis, 1995: 151).

Figure 8: Location of primers *trnK-3914F*, *matK-934F* in *trnK-2R* (Johnson in Soltis, 1995: 151), used in the analysis.

Pomnoževanje medgenskega vmesnika *psbA–trnH* je potekalo v 200 µL mikrocentrifugirkah. Pripravili smo po 20 µL reakcijske mešanice, ki jo je sestavljalo 1,2 µL MgCl₂, 2 µL 10x PCR pufra, 1,6 µL 2 µM dNTP, 0,8 µL začetnega nukleotida *psbA*, 0,8 µL začetnega nukleotida *trnH*, 0,25 µL Taq polimeraze in 11,35 µL ddH₂O ter 2 µL DNA. Reakcijsko mešanico smo inkubirali v termociklerju po naslednjem postopku: 5 min na 94 °C, čemur je sledilo 35 ciklov 45 sek na 94 °C, 1 min na 53 °C, 30 sek na 72 °C. Sledila je elongacija za 5 min na 72 °C ter shranjevanje vzorcev na 4 °C.

Pomnoževanje medgenskega vmesnika *rpl20–rps12* je potekalo v 200 µL mikrocentrifugirkah. Pripravili smo po 10 µL reakcijske mešanice, ki jo je sestavljalo 1,2 µL MgCl₂, 2 µL 10x PCR pufra, 1,6 µL 2 µM dNTP, 0,4 µL začetnega nukleotida *psbA*, 0,4 µL začetnega nukleotida *rpl20*, 0,25 µL Taq polimeraze in 11,35 µL ddH₂O ter 2 µL DNA. Reakcijsko mešanico smo inkubirali v termociklerju po naslednjem postopku: 5 min na 94 °C, čemur je sledilo 35 ciklov 45 sek na 94 °C, 1 min 15 sek na

53 °C, 1 min na 72 °C. Sledila je elongacija za 5 min na 72 °C ter shranjevanje vzorcev na 4 °C.

PCR produkte smo očistili, naredili sekvenčno reakcijo in nato sekvencirali na 4-kapilarinem sekvencatorju ABI PRISM 3130.

3.3.1.1 Ponavlajoča zaporedja znotraj kloroplastne in jadrne DNA

Kloroplastna DNA vključuje veliko regij, v katerih se pojavljajo mikrosatelitna zaporedja in regije s ponovitvami posameznih nukleotidov (t.i. mononukleotidni mikrosateli, pogosto imenovani tudi poli-A/T in poli-G/C zaporedja, kar uporabljamo tudi v nadaljevanju). Taka zaporedja se pogosto pojavljajo v nekodirajočih regijah, vendar so lahko prisotna tudi v genih.

Kljub veliki pogostosti zaporedij poli-A/T v kloroplastnem genomu, večina raziskav s področja rastlinske filogeografije, filogenije ali populacijske genetike ne omenja, na kakšen način tretirajo omenjene regije v svojih analizah.

Renner in sod. (2004, 2007) v filogenetskih študijah rodu *Cucumis* in *Arisaema*, v katerih so uporabili različne kloroplastne gene in medgenske vmesnike (npr. gena *rbcL* in *matK*, intron *trnL*, medgenska vmesnika *rpl20–rps12* in *trnL–F*), omenjajo prisotnost številnih zaporedij poli-A/T v omenjenih genih in nekodirajočih zaporedjih, poleg njih pa še prisotnost (sicer redkejših) mikrosatelitnih regij TATATA. Tudi v zaporedju ITS1 je bilo pri rodu *Cucumis* prisotno 25 nukleotidov dolgo zaporedje poli-G ter 17 nukleotidov dolgo zaporedje poli-G, v zaporedju ITS2 pa 11 nukleotidov dolgo zaporedje poli-C. Vsa omenjena zaporedja so bila izločena iz nadaljnih analiz. Oberlander in sod. (2012) ugotavljajo podobno pri rodu *Oxalis*; kljub temu, da so v *psbA–trnH* regiji opazili kar pet variabilnih poli-A/T zaporedij, so jih izključili iz nadaljnjih analiz zaradi možnosti homoplazije.

3.3.2 Obdelava podatkov kloroplastne DNA in statistična analiza

V analizo smo vključili nukleotidna zaporedja petih kloroplastnih regij. Pridobljene elektroferograme in avtomatsko generirana nukleotidna zaporedja smo pregledali v programu CondonCode Aligner 1.63 (CondonCode Corp., Dedham, MA, ZDA), s

katerim smo naredili tudi skupno nukleotidno zaporedje (angl. *consensus sequence*). Skupne sekvene smo poravnali s pomočjo orodja ClustalW 4.0 v programu MEGA 4.0 (Tamura in sod., 2007).

Za nadaljnje analize smo v programu MEGA inverzijo GAGGA/TCCTC kodirali kot eno mutacijo tako, da smo izbrisali preostale 4 bp (AGGA/CCTC). Prav tako pri populaciji MK, pri kateri se pojavlja 23 bp dolg odsek poli-A, tega nismo kodirali kot več mutacij temveč kot eno samo mutacijo (izbrisali 8 bp A pri MK tako, da je bil odsek poli-A pri MK za 1 bp daljši kot pri CG, ki ima 15 A). Tudi insercijo/delecijo v mikrosatelitu TATATA smo obravnavali kot eno mutacijo tako, da smo v matriki izbrisali 1 bp (A).

Razporeditev vzorcev v haplotipe in njihovo frekvenco smo izvedli v programu DNAsp (Rozas in sod., 2003) in jo preverili v spletnem programu FaBox (Villesen, 2007). Haplotipe smo pridobili za vsako kloroplastno regijo posebej (pri čemer smo mutacije v poli-A/T regijah zaradi majhnega števila ostalih mutacij v posameznem odseku upoštevali), nazadnje pa smo vse odseke združili skupaj v enotno nukleotidno zaporedje. Analizo celotnega nukleotidnega zaporedja smo naredili na dva načina, in sicer ob upoštevanju mutacij v poli-A/T regijah ter tako, da smo regije izključili. Vse nadaljnje analize smo naredili ob izključitvi poli-A/T regij.

V programu Arlequin 3.5 (Excoffier in Lischer, 2010) smo izračunali osnovne parametre genetske variabilnosti: nukleotidno (π) in haplotipno (h) raznovrstnost. Nukleotidna raznovrstnost predstavlja povprečno število nukleotidnih razlik na enem mestu med dvema naključno izbranimi nukleotidnima zaporednjema iz populacije (Nei in Li, 1979; Nei, 1987) in je izračunana po formuli:

$$\Pi = \sum x_i x_j \pi_{ij}$$

v kateri $x_i x_j$ predstavlja frekvenci i-tega in j-tega nukleotidnega zaporedja in π_{ij} predstavlja razmerje različnih nukleotidov med zaporednjema i in j.

Haplotipna raznovrstnost je definirana kot $1 - \sum f_i^2$, pri čemer je f_i^2 frekvenca i-tega haplotipa.

Stopnjo diferenciacije med populacijami smo preverili preko izračuna populacijskih parametrov N_{ST} in G_{ST} , izračunanih v programu DNAsp. Medtem ko parameter G_{ST}

upošteva samo frekvence alelov, N_{ST} poleg alelnih frekvenc upošteva tudi podobnost med posameznimi haplotipi. Če so vrednosti $N_{ST} > G_{ST}$, to nakazuje prisotnost filogeografske strukture.

Za pridobitev skupin, ki so si geografsko karseda blizu, vendar so med seboj kar najbolj genetsko diferencirane (angl. *geographically homogeneous and maximally differentiated from each other*), smo uporabili program SAMOVA (Dupanloup in sod., 2002). Program iterativno išče kompozicijo predefiniranega števila geografsko bližnjih skupin (K; definira ga uporabnik) na način, da povečuje vrednost F_{CT} (delež celotne genetske variance zaradi razlik med skupinami populacij). Program je izvedel 10 000 iteracij za K za vrednosti med 1 in 10. Razporeditev z najvišjo F_{CT} vrednostjo je program prikazal kot najboljše grupiranje populacij.

Stopnjo raznolikosti med vzorčnimi mesti smo določili z analizo molekularne variance (AMOVA) v programu Arlequin. Signifikantnost analiz smo testirali s 16 000 permutacijami.

Za prikaz sorodnosti med haplotipi Blagajevega volčina smo uporabili mrežo haplotipov (angl. *haplotype network*). Filogenetska drevesa, ki se delijo na dve veji, pogosto niso primerna za prikaz znotrajvrstnih evolucijskih odnosov. Namesto dreves zato za prikaz znotrajvrstnih genealogij odnosov uporabljamo mreže, ki omogočajo delitev na več vej (Posada in Crandall, 2001). Za prikaz sorodnosti med haplotipi Blagajevega volčina smo uporabili program Network 4.6.1.3 (Fluxus Technology Ltd, Suffolk, UK). Program Network iz podatkovnega niza rekonstruira drevo največjega verjetja (angl. *maximum parsimony tree*; MP) preko dveh možnih algoritmov: *reduced median* (RM) algoritma (zahteva binarne podatke) ali *median-joining* (MJ) algoritma (na posameznem mestu je lahko več možnih nukleotidov, omogoča pa tudi upoštevanje nejasnosti, na primer N), ki smo ga uporabili v našem primeru.

Demografsko zgodovino smo testirali na nivoju vrste in na nivoju podskupin s t.i. »mismatch« analizo (Li, 1997). Podskupine smo definirali glede na rezultate, pridobljene v programu SAMOVA (SLO, J in SR), pri čemer smo dodatno analizirali tudi skupino J in SR skupaj. Nevtralnostne teste smo izvedli v programu programih DNAsp (Ramos-Onsins in Rozasov R2 test) in Arlequin (Tajimov D test in Fujev Fs test).

3.4 AFLP

3.4.1 Genotipizacija s pomočjo metode AFLP

Metoda AFLP (angl. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) temelji na razrezu molekule DNA s pomočjo dveh restrikcijskih encimov ter naknadnem pomnoževanju naključnih restrikcijskih fragmentov iz celokupne DNA. Tehniko so razvili Vos in sod. (1995). Osnovni koraki AFLP so naslednji (slika 9):

Izolacija DNA: Za AFLP potrebujemo čisto DNA visoke molekularne teže. Gre za najpomembnejši korak metode, saj je AFLP zelo občutljiv na nečistoče.

Restrikcija: Restrikcija je razrez molekule DNA, ki jo izvedemo z dvema restrikcijskima encimoma (restrikcijskima endonukleazama). Eden od encimov reže pogosto (npr. MseI, ki prepoznava 4 bp dolgo zaporedje), drugi pa reže redko (npr. EcoRI, ki prepoznava 6 bp dolgo zaporedje). Čeprav v tekstu omenjamo le EcoRI in MseI, obstajajo tudi drugi restrikcijski encimi in njim ustrezeni začetni oligonukleotidi.

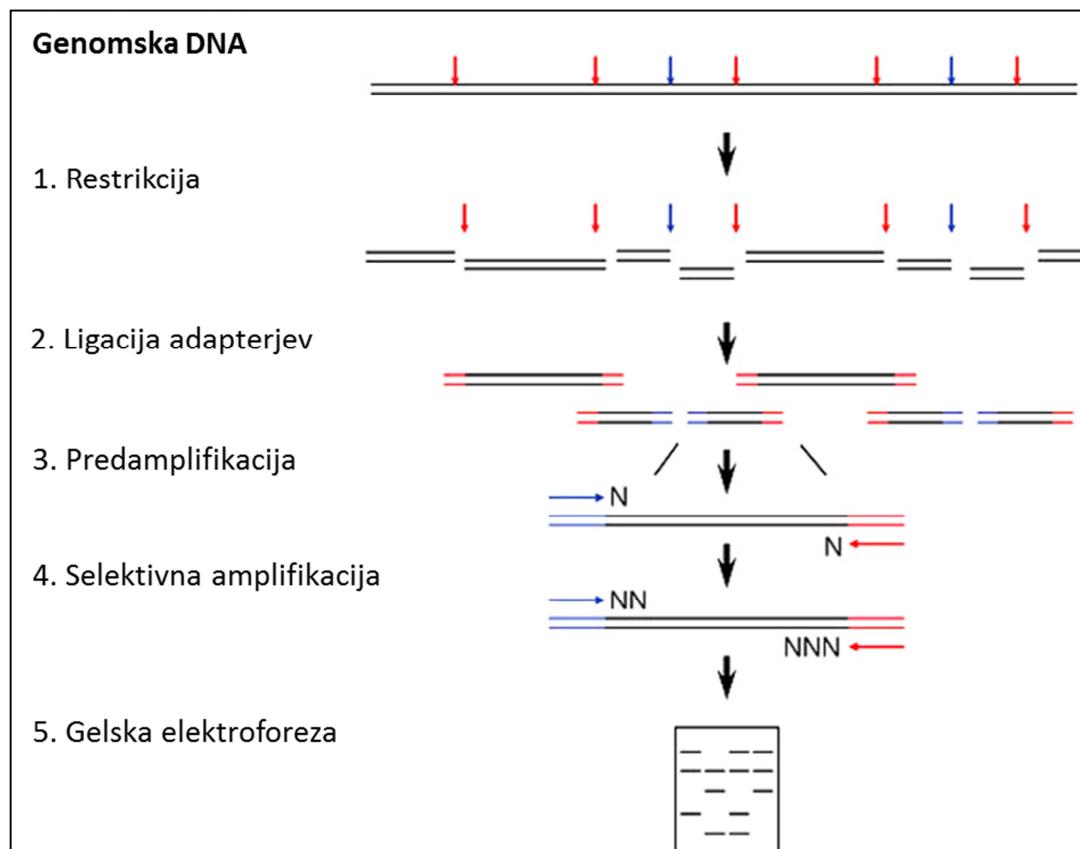
Ligacija: Na koncu restrikcijskih fragmentov se vežejo komplementarni oligonukleotidni adapterji. Adapterji so sestavljeni iz znanega 20 bp dolgega nukleotidnega zaporedja, isto zaporedje pa kasneje služi kot začetni oligonukleotid v PCR reakciji.

Predamplifikacija: Restrikcijski fragmenti so nato pomnoženi v prvi verižni reakciji s polimerazo, pri čemer uporabimo krajše začetne oligonukleotide. Gre za običajen PCR, v katerem uporabimo začetne oligonukleotide, ki ustrezano nukleotidnemu zaporedju adapterjev. Na ta način pomnožimo samo tiste fragmente, ki imajo na enem koncu vezan adapter za EcoRI, na drugem pa adapter za MseI. Poleg nukleotidnega zaporedja adapterjev imata oba začetna oligonukleotida vezano dodatno bazo (na sliki 9 označena s črko N), ki omogoča dodatno zmanjšanje števila pomnoženih fragmentov za $\frac{1}{4}$.

Selektivna amplifikacija: Predamplifikaciji ponavadi sledi še druga verižna reakcija s polimerazo, pri kateri uporabimo začetne oligonukleotide z istim zaporedjem kot v predamplifikaciji s to razliko, da so začetni oligonukleotidi podaljšani za 1, 2 ali 3 nukleotide (na sliki 9 označeni s črkami NN ali NNN) ter označeni s fluorescentnim barvilom. Namen zadnjega koraka je zmanjšanje števila polimorfizmov (fragmentov) in

njihovo označevanje s fluorescentnim barvilo, ki omogoči vizualizacijo fragmenta DNA med migracijo. Med pogosto uporabljenega fluorescentna barvila sodijo na primer VIC (zelena barva), 6-FAM (modra barva), NED (rumena barva) in PET (rdeča barva).

Elektroforeza: Označene fragmente v dolžini 50-600 bp ločimo s pomočjo elektroforeze na akrilamidnem gelu (na sekvenatorju). Na ta način ločimo fragmente, ki se po dolžini ločijo v samo enem baznem paru. Fragmenti se v kapili ločijo po dolžini, najkrajši fragmenti potujejo najprej, najdaljši pa najkasneje. Ko fragmenti potujejo mimo laserja, žarek ekscitira fluorescentno barvilo, da to odda svetlubo. Računalnik zbere signal, rezultat fluorescence pa zaznamo na računalniku kot elektroferogram. Vsak vrh v elektroferogramu ustrezna lisi na normalnem akrilamidnem gelu.



Slika 9: Shematski prikaz metode AFLP (Vuylsteke in sod., 2008: 1387).

Figure 9: Outline of the AFLP procedure (Vuylsteke et al., 2008: 1387).

Genotipizirati smo želeli 195 osebkov s 15 vzorčnih mest s tremi kombinacijami selektivnih začetnih oligonukeotidov. Genotipizacija je bila uspešna pri 135 osebkih. Za uspešno genotipizacijo smo šteli, če nam je pri posameznem vzorcu uspelo genotipizirati vsaj eno od treh kombinacij začetnih oligonukleotidov.

AFLP analizo smo izvedli po protokolu Vosa in sodelavcev (1995) z nekaterimi modifikacijami. Uporabljene začetne oligonukleotide in adapterje navajamo v preglednici 3. Vse encime, začetne oligonukleotide, linkerje in ATP smo naročili pri proizvajalcu Thermo Scientific. Priprava adapterjev, predamplifikacija in selektivna amplifikacija je potekala v termociklerju Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler.

250 ng DNA smo razrezali z restriktijskimi encimi v mešanici, ki je vsebovala 2 U EcoRI in 2 U Tru1I in 1 x Tango pufer v skupnem volumnu 20 µl. Restriktijsko mešanico smo inkubirali v termociklerju 3 ure na 37 °C in 3 ure na 65 °C.

Za pripravo ligacijske mešanice smo iz EcoRI in MseI linkerjev predhodno izdelali adapterje, ki služijo kot mesta prileganja začetnih oligonukleotidov. Adapter EcoRI smo izdelali iz 5 pMol/µl EcoRI-linker1, 50 pMol/µl EcoRI-linker2, 1 M Tris – HCl (pH 7,7) ter bidestilirane vode do končnega volumna 50 µl. Po enakem postopku smo pripravili še adapter MseI. Reakcijski mešanici smo v termociklerju izpostavili temperaturi 95° C za 5 minut in ju nato pustili, da sta se ohladili na sobno temperaturo. Adapterja smo hranili v zmrzovalniku pri temperaturi -20 °C.

Razrezani DNA smo v naslednjem koraku dodali 5 µl ligacijske mešanice, ki je vsebovala 1 µl EcoRI adapterja (5 µM), 1 µl MseI adapterja (5 µM), 1,2 µl ATP (100 mM) in 0,3 µl T4 ligaze (5 U / µl), 0,7 µl T4 pufra (10x, Thermo Scientific) in 0,8 µl vode. Mešanico smo inkubirali v termociklerju 4 ure na 37 °C in 12 ur na 16 °C. Po ligaciji smo vzorce nanesli na agarozni gel in preverili, če je prisoten razmaz.

25 µl predamplifikacijske mešanice je vsebovalo 5 µl 10x redčene restriktijsko-ligacijske mešanice, 5 µl pufra (5x, Promega), 2 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl vsakega od preamplifikacijskih začetnih oligonukleotidov, 0,625 U encima polimeraze (5 u/µl, GoTaq Promega) in 2 µL 10 mM dNTP. Preamplifikacija je potekala v termociklerju po naslednjem temperaturnem protokolu: 2 min na 72 °C, 30 ciklov 30 sek na 94 °C, 30 sek

na 56 °C in 2 min na 72 °C. Sledilo je končno podaljševanje za 30 min na 72 °C. Uspešnost predamplifikacije smo preverili na agaroznem gelu.

Selektivno amplifikacijo smo izvedli v volumnu 10 µl. Mešanica je vsebovala 2 µl 50x redčene restriktijsko-ligacijske mešanice, 2 µl pufra (5x, Promega), 0,8 µl 25 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,3 µl vsakega od začetnih oligonukleotidov za selektivno amplifikacijo (pri čemer so EcoRI začetni oligonukleotidi označeni s fluorescentnima barviloma 6-FAM oz. VIC), 0,125 U encima polimeraze (5 u/µl, Promega) in 0,8 µL 10 mM dNTP (Fermentas). Preamplifikacija je potekala v termociklerju po naslednjem temperaturnem protokolu (PCR s padajočo temperaturo prileganja; angl. *touchdown*): 2 min 30 sek na 94 °C, 13 ciklov 30 sek na 94 °C, 30 sek na 66-56 °C in 1 min na 72 °C, sledilo je 24 ciklov 30 sek na 94 °C, 56 °C za 1 min in 72 °C 10 min ter končno podaljševanje za 10 min na 72 °C. Uspešnost selektivne amplifikacije smo preverili na agaroznem gelu.

Selektivno amplifikacijo smo izvedli s tremi pari začetnih oligonukleotidov:

- 1) EcoRI + ACT – VIC in MseI + CTA (kombinacija G13),
- 2) EcoRI + ACT – VIC in MseI + CTC (kombinacija G14),
- 3) EcoRI + ACG – 6-FAM in MseI + CTC (kombinacija B14).

Preglednica 3: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov za AFLP analizo.

Table 3: List of primers used for the AFLP analysis.

	Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5' - 3')
ligacija	MseI-linker1	GAC GAT GAG TCC TGA G
	MseI-linker2	TA CTC AGG ACT CAT
	EcoRI-linker1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
	EcoRI -linker2	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
predamplifikacija	MseI	GAT GAG TCC TGA GTA A
	EcoRI	GAC TGC GTA CCA ATT C
selektivna amplifikacija	EcoRI + ACG – 6-FAM	GAC TGC GTA CCA ATT C ACG - 6-FAM
	EcoRI + ACT – VIC	GAC TGC GTA CCA ATT C ACT - VIC
	MseI + CTC	GAT GAG TCC TGA GTA A CTC
	MseI + CTA	GAT GAG TCC TGA GTA A CTA

Uspešno pomnožene vzorce (0,5 µL) smo zmešali s formamidom in dolžinskim standardom GeneScan-LIZ 500 (Applied Biosystems) ter genotipizirali na 4-kapilarnem sekvenatorju ABI PRISM 3130.

Ker je bila pri nekaterih populacijah pomnožitev neuspešna pri večjem številu osebkov, smo tiste populacije izločili iz nadaljnjih analiz (iz statistične analize smo izločili tiste lokalitete, za katere smo imeli na voljo manj kot 5 AFLP profilov). V analizo populacijske strukture smo tako vključili 162 osebkov iz 13 vzorčnih lokalitet, pri čemer smo 20 osebkov analizirali dvakrat in na podlagi rezultatov po metodi Bonnina in sod. (2004) ocenili napako (angl. *error rate*). Rezultate fragmentne analize smo obdelali s programom GeneMarker 2.6.3. Lokus smo definirali kot fragment, ki se pojavlja pri najmanj enem vzorcu. Da bi se izognili napakam, smo v analizo vključili le tiste lokuse, ki smo jih ocenili kot zanesljive, z minimalno amplitudo 50 fluorescenčnih enot (CFU) v dolžini med 75 in 500 baznimi pari. Prisotnost lokusa smo zabeležili kot 1, odsotnost pa kot 0. V primerih, ko lokusa nismo mogli objektivno oceniti, smo lokus označili z vprašajem.

3.4.2 Statistična obdelava podatkov AFLP in analiza genetske diverzitete

Izbrane populacijske parametre - število polimorfnih lokusov (NLP), odstotek polimorfnih lokusov (PLP) in Nejevo genetsko diverziteto - smo ocenili s pomočjo programov GenAlEx 6.501 (Peakall in Smouse, 2012), AFLPsurv V1.0 (Vekemans, 2002) in PopGene 1.32 (Yeh in Boyle, 1997). V programu AFLPsurv smo izračunali genetsko diverziteto na dva načina, in sicer ob predpostavki, da 1) so populacije v Hardy-Weinbergovem ravnovesju ($F_{IS} = 0$) in 2) ob predpostavki, da je koeficient inbridinge $F_{IS} = 1$. Ker sta alelna diverziteta in število zasebnih alelov znotraj populacije močno odvisna od velikosti vzorca, dobljene rezultate težko primerjamo med populacijami, kadar so naši vzorci različno veliki. S postopkom rarefakcije, ki poenoti velikost populacij glede na najmanjšo vzorčeno populacijo in nato preračuna število alelov in zasebnih alelov na populacijo, dobimo rezultate, ki jih lahko primerjamo med populacijami. Postopek rarefakcije smo izvedli v programu ADZE (Szpiech in sod., 2008) in poenotili velikost populacij na najmanjšo vzorčeno populacijo, torej 5 osebkov. Pri tem smo v programu dodali ukaz naj zavrže tiste alele, pri katerih odstotek manjkajočih v kateri koli populaciji

presega 10 %. V zelo sorodnih populacijah je število zasebnih alelov na populacijo ponavadi majhno, lahko pa so zasebni aleli prisotni znotraj skupin populacij (Kalinowski, 2004). Tako smo zasebne alele izračunali tudi za skupine populacij (vzorčnih mest), pri čemer smo skupine določili glede na program BAPS za ($K = 7$).

Analizo molekularne variance (AMOVA), Mantelov test in analizo glavnih koordinat (PCoA) smo izvedli v programu GenAIEx 6.501 (Peakall in Smouse, 2012). AMOVA je ena izmed tehnik, ki jih uporabljam za oceno genetske diferenciacije. S pomočjo analize AMOVA računamo komponente variance in njihovo stopnjo signifikantnosti. V analizi AMOVA so F_{ST} -analogi (imenovani Φ_{PT}) izračunani kot razmerje variance komponent, pridobljene iz matrike kvadriranih evklidskih razdalij med pari posameznikov (Excoffier in sod., 1992). Ena glavnih prednosti analize AMOVA je uporabnost na različnih hierarhičnih nivojih (na primer na nivoju osebkov, populacij in regij). PCoA je multivariatna tehnika, ki omogoča prikaz glavnih vzorcev znotraj multivariatnega podatkovnega niza (na primer več lokusov in več vzorcev). Mantelov test je neparametrični test, ki ocenjuje odnos med elementi katerih koli dveh ujemajočih se matrik. S pomočjo Mantelovega testa v populacijski genetiki preverjamo prisotnost signifikantne korelacije med matrikama genetske in geografske razdalje.

Podskupine smo določili s programom STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard in sod., 2000) in BAPS 6.0. (Corander in sod., 2008). Obe metodi temeljita na Bayesovem principu. Bayesovi modeli zajamejo populacijsko strukturo na podlagi

molekularne variabilnosti znotraj vsake podpopulacije tako, da zmanjšujejo Hardy-Weinbergovo neravnovesje (HWD) in vezavno ravnovesje (angl. *linkage disequilibrium*; LD), do česar bi prišlo, če bi osebke iz različnih populacij (pri katerih je prisotno naključno parjenje) nepravilno grupirali v skupno populacijo (Latch in sod., 2006). Oba programa dovoljujeta, da osebki iz posameznih (pod)populacij izvirajo iz različnih prednikov (predniških populacij) in take osebke uvrstijo v posamezen klaster na podlagi verjetnosti.

V programu STRUCTURE smo uporabili model mešanja (angl. *admixture model*) in korelirane alelne frekvence med populacijami (angl. *correlated allele frequencies*), pri

čemer smo programu ukazali, da si pri grozdenju podatkov pomaga z informacijo o vzorčnih lokalitetah (LOCPRIOR model). Ta model je uporaben v primerih, ko je genetska struktura prisotna (na primer značilen F_{ST} med vzorčnimi lokalitetami), vendar je njen signal prešibek, da bi ga zaznali standardni modeli. Do tega lahko pride zaradi majhnega števila markerjev, majhnega števila vzorcev ali zelo šibke genetske strukture (Pritchard in sod., 2000). LOCPRIOR model ima troje pozitivnih lastnosti, in sicer: 1) ne najde strukture, če ta ni prisotna, 2) lahko zanemari informacijo o vzorčnih mestih, če izvor vzorčenih osebkov ni povezan z vzorčnimi lokalitetami in 3) ko je populacijska struktura močna, da LOCPRIOR model enake rezultate kot standardni modeli. Testirali smo tudi model neodvisnih alelnih frekvenc (angl. *independent allele frequencies*) ter model brez mešanja (angl. *no admixture model*).

MCMC veriga je tekla 1 000 000 generacij, pri čimer smo začetnih 100 000 generacij zavrgli. Število skupin (K) smo nastavili med ena in deset; za vsak K smo naredili deset ponovitev. Po analizi v programu STRUCTURE smo najverjetnejši K določili z metodo po Evannu (Evanno in sod., 2005) v programu STRUCTURE HARVESTER Web v0.6.94 (Earl in von Holdt, 2012). Za pridobitev najbolj optimalne strukture smo uporabili algoritem *LargeK Greedy* z naključnim zaporedjem vnosa (angl. *random input order*) in statistiko *G' pairwise matrix similarity* in 1000 permutacijami v programu CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson in Rosenberg, 2007). Rezultate smo vizualizirali v programu DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004).

V programu BAPS smo testirali grupiranje na podlagi molekularnih podatkov na dveh nivojih: 1) na nivoju skupin ter 2) na nivoju posameznikov. Obe analizi smo izvedli tako z neprostorskim kot s prostorskim modelom (angl. *Voronoi tessellation*), pri čemer smo pri slednjem podali koordinate posameznih lokalitet nabiranja. Minimalno število skupin smo nastavili na 13.

4 REZULTATI

4.1 KLOROPLASTNA DNA

4.1.1 Analiza mutacij

Analiza kloroplastne DNA vključuje pet odsekov kloroplastne DNA: štirih medgenskih vmesnikov (*rpl20–rps12*, *atpB–rbcL*, *psbA–trnH* in *trnL–F*) ter gensko regijo *trnK–matK* z genom *matK* (preglednica 4). Pri razlagi mutacij uporabljamo oznake populacij iz preglednice 1.

Pri pomnoževanju medgenskega vmesnika *rpl20–rps12* smo pridobili nukleotidno zaporedje v skupni dolžini 549 bp. Na 130. mestu je prisotna edina mutacija in sicer substitucija T/G. Gvanin vsebujejo vsa nukleotidna zaporedja z izjemo osebkov iz populacije KP, ki imajo na tistem mestu timin. Glede na regijo *rpl20–rps12* so osebki razvrščeni v 2 haplotipa.

Pri pomnoževanju medgenskega vmesnika *atpB–rbcL* smo pridobili nukleotidno zaporedje v skupni dolžini 751 bp. Na mestu 36 se začne zaporedje poli-T v dolžini 8 oz. 9 bp: 9 bp dolgo zaporedje poli-T imajo vsi vzorci iz populacije GRA ter vzorci ID16, ID5, ID6, ID16, ID24, ME24, MI1, MI25, MI16 in MI30. Na mestu 46 je prisotna substitucija T/G; T se pojavlja v enem vzorcu iz populacije KP (KP22) in MI (MI2), pri vseh vzorcih MK ter treh od štirih vzorcih iz populacije ST. Na 263. mestu je prišlo pri petih vzorcih do podvojitve 13 bp dolgega odseka (AAACAGATAGAAA; vzorci SM24, SM27, GRC16, GRC30, GRC5). Na mestu 288 prihaja do substitucije T/C; T se pojavlja v vseh vzorcih populacije BG, v nekaterih vzorcih GRC (GRC16, GRC30, GRC5) ter v nekaterih vzorcih iz populacije SM (SM24, SM27). Na mestu 571 se začenja poli-T v dolžini 9 oz. 10 bp. Devet bp dolgo zaporedje poli-T imajo vzorci: CE10, vsi GRA, ID16, ID5, ID24, ID6, vsi ITA, JE5, JE16, JE28, KO16, KO24, KP26, KP30, MA28, ME24, MI1, MI25, MI16, MI30, vsi SA, ST15 ter vsi TG.

Pri pomnoževanju dela medgenskega vmesnika *trnL–F* smo pridobili nukleotidno zaporedje v skupni dolžini 569 bp. V zaporedju so prisotne tri mutacije, vse tri v zaporedjih poli-A/T. Na mestu 221 se začenja odsek poli-A, ki obsega med 12 in 14 bp

(mutacija na mestih 233 in 234). Poli-A dolžine 12 bp je prisoten v vseh vzorcih iz populacij GRC, PM in SM, pri populaciji MI je poli-A dolg 14 bp, medtem ko je pri ostalih dolg 13 bp. Na mestu 556 se začenja poli-T, ki ima dolžino 7 oz. 8 bp (mutacija na mestu 563). 7 bp dolgo zaporedje je prisotno pri vseh vzorcih CG, MK in ST. Program DNAsp je vzorce glede na prisotne substitucije grupiral v 4 različne haplotipe ($Hd = 0,5443$).

Kljub uporabi vmesnih začetnih oligonukleotidov nam ni uspelo pomnožiti celotnega nukleotidnega zaporedja gena *matK*, temveč smo pridobili tri ločene odseke: *trnK*-3914F, *matK*-934F in *trnK*-2R. Pri pomnoževanju odseka *trnK*-3914F smo pridobili 184 bp dolgo zaporedje, ki je vsebovalo 5 polimorfnih mest. Večina polimorfizmov se nahaja v zaporedjih poli-T/A. Edina substitucija je A/T (na mestu 39/184). Na mestu 40 se pri vseh vzorcih začne poli-T zaporedje, ki ima pri večini vzorcev dolžino 8 bp. Pri 5 vzorcih (in sicer vseh iz populacije KP) je dolžina zaporedja poli-T 7 bp in pri 4 vzorcih (vsi iz populacije SA) 9 bp. Ker je prišlo v populaciji SA tako do substitucije iz A v T ter tudi do pomnožitve dodatnega T v poli-T, je med mestoma 33 in 48 nastal dolg odsek poli-T dolžine 16 bp. Na mestu 140 se začne poli-T regija, ki obsega med 9 in 11 bp: 9 bp imajo vsi vzorci BG, GRA, ITA, vsi JE, vsi ID, vsi KP, vsi MI, vsi SA, vsi TG ter vzorca BV16 in BV30. Zaporedje dolžine 10 bp imajo vsi vzorci iz populacij CE, KO, KR, MA, GRC, PM, vsi vzorci ME razen ME24, vsi SM razen SM24 ter vzorci BV17, BV18, BV21 in BV26. 11 bp imajo vsi vzorci CG, ST in MK (razen MK30, ki je prekratek) ter ME24. Pri pomnoževanju odseka *matK*-934F smo pridobili 495 bp dolg odsek, ki je vseboval 3 polimorfna mesta in sicer substitucijo A/G (na mestu 2/495), substitucijo A/C (na mestu 461/495) in substitucijo A/G (na mestu 489/495). Pri pomnoževanju odseka *trnK*-2R smo pridobili 660 bp dolg odsek, ki je vseboval 2 polimorfni mesti in sicer substitucijo delecijo/insercijo v poli-T (na mestu 230/660) ter substitucijo A/C (na mestu 635/660).

Ob združitvi vseh treh odsekov smo pridobili nukleotidno zaporedje v skupni dolžini 1339 bp. V zaporedju smo zabeležili 5 substitucij in 4 insercije/delecije v regijah poli-A/T. Na podlagi razlik v nukleotidnih zaporedjih smo v programu DNAsp ob upoštevanju poli-A/T regij pridobili 10 haplotipov.

Nukleotidno zaporedje pridobljenega medgenskega vmesnika *psbA–trnH* je dolgo 304 bp in vsebuje 5 polimorfizmov. Med mestoma 38 in 42 je prisotna inverzija zaporedja GAGGA/TCCTC: GAGGA je prisotna v vseh vzorcih populacije CE, ME, ST, CG in MK. Na 84. mestu je edina mutacija in sicer substitucija T/C; C je prisoten pri vseh vzorcih populacije ST, CG in MK. Na 130. mestu je prisotna substitucija C/A, in sicer je v populaciji CG prisoten A, v preostalih vzorcih pa A. S tem pride v populaciji CG do podaljšanja zaporedja poli-A, ki se nahaja na tistem območju. Poli-A se začne na 131. mestu (razen pri CG) in obsega med 10, 11, 12, 14, 15 ali 23 bp. Edina populacija, pri kateri število A v poli-A ni konstantno, je CG, saj vsebuje 14 ali 15 A. 12A vsebujejo populacije CE, ME; 14 jih vsebuje ST, 23 MK, 10 KR. Ostale populacije vsebujejo 11 A. Na mestih 225-226 je v vseh slovenskih (ID, JE, MI, KP, SA, TG) ter pri italijanski populaciji ITA prisotna delecija TA.

Po združitvi vseh petih kloroplastnih zaporedij smo pridobili enotno nukleotidno zaporedje dolžine 3512 bp.

Preglednica 4: Prikaz mutacij v vseh petih odsekih kloroplastne DNA. Sivo so osenčene mutacije v regijah poli-A/T. * insercija (duplicacija) 13 bp dolgega zaporedja AAACAGATAGAAA, ** inverzija GAGGA/TCCTC

Table 4: Display of mutations in all five chloroplast DNA regions. Mutations in poly-A/T regions are shaded in gray. * insertion (duplication) of a 13 bp long sequence AAACAGATAGAAA, ** inversion GAGGA/TCCTC.

		rpl20-rps12				atpB-rbcL				trnL-F				matK										psbA-trnH					
130.		593.	595.	812.-24.	837.	1129.	1533.-34.	1863.		1908.	1916.	1917.	2018.-19.	2055.	2514.	2542.	2778.	3183.	3246.-50.	3292.	3338.		3349.-3361.		3433.-34.				
G/T		poli-T	G/T	insercija*	C/T	poli-T	poli-A	poli-T	indel	poli-T	indel	poli-T	A/G	A/C	A/G	poli-T	A/C	GAGGA/TCCTC**	T/C	C/A	poli-A		indel TA						
H1	G	-	G	-	T	T	A	-	T	T	-	-	G	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-	TA		
H2	G	-	G	-	C	T	A	-	T	T	-	-	G	C	A	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-	TA		
H3	G	-	G	-	C	T	A	-	T	T	-	-	G	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-	TA		
H4	G	-	G	-	C	T	A	-	T	T	-	-	G	C	G	-	C	GAGGA	T	C	A	A	-	-	-	-	TA		
H5	G	-	G	-	C	-	A	-	T	T	-	-	G	C	G	-	C	GAGGA	T	C	A	A	-	-	-	-	TA		
H6	G	-	G	-	C	T	A	-	-	T	-	T	G	C	G	-	C	GAGGA	C	A	A	A	A	-	-	-	TA		
H7	G	-	G	-	C	T	A	-	-	T	-	T	G	C	G	-	C	GAGGA	C	A	A	A	A	-	-	-	TA		
H8	G	T	G	-	C	-	A	-	T	T	-	-	A	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-			
H9	G	-	G	+	T	T	-	-	T	T	-	-	G	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-	TA		
H10	G	-	G	-	C	T	-	-	T	T	-	-	G	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-	TA		
H11	G	-	G	-	C	T	A	-	T	T	-	-	A	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-			
H12	G	-	G	-	C	-	A	-	T	T	-	-	A	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-			
H13	G	-	G	-	C	T	A	-	T	T	-	-	G	A	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-	TA		
H14	G	-	G	-	C	-	A	-	T	T	-	-	G	A	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-	TA		

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 4

<i>rpl20-rps12</i>	<i>atpB-rbcL</i>				<i>trnL-F</i>		<i>matK</i>										<i>psbA-trnH</i>									
130.	593.	595.	812.-24.	837.	1129.	1533.-34.	1863.	1908.	1916.	1917.	2018.-19.	2055.	2514.	2542.	2778.	3183.	3246.-50.	3292.	3338.	3349.-3361.	3433.-34.					
	G/T	poli-T	G/T	insercija*	C/T	poli-T	poli-A	poli-T	indelT	poli-T	indelT	poli-T	A/G	A/C	A/G	poli-T	A/C	GAGGA/TCCTC**	T/C	C/A	poli-A	3349.	3350.	3351.	3352.	3353.-61.
H15	T	-	G	-	C	-	A	-	T	-	-	-	A	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-
H16	T	-	T	-	C	T	A	-	T	-	-	-	A	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-
H17	G	-	G	-	C	T	A	-	T	T	-	-	G	C	G	-	C	TCCTC	T	C	-	-	-	-	-	TA
H18	G	-	G	-	C	-	A	-	T	T	-	-	G	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	TA
H19	G	T	G	-	C	-	A	-	T	T	-	T	G	C	G	-	C	GAGGA	T	C	A	A	-	-	-	TA
H20	G	-	T	-	C	T	A	A	T	T	-	-	A	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-
H21	G	T	G	-	C	-	A	A	T	T	-	-	A	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-
H22	G	T	G	-	C	-	A	A	T	T	-	-	A	C	G	-	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-
H23	G	-	T	-	C	T	A	-	-	T	-	T	G	C	G	-	C	GAGGA	C	C	A	A	A	A	A	TA
H24	G	-	G	-	C	T	-	-	T	T	-	-	G	C	G	-	A	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	TA
H25	G	-	G	-	C	-	A	-	T	T	T	-	A	C	G	T	C	TCCTC	T	C	A	-	-	-	-	-
H26	G	-	T	-	C	T	A	-	-	T	-	T	G	C	G	-	C	GAGGA	C	C	A	A	A	-	-	TA
H27	G	-	G	-	C	-	A	-	-	T	-	T	G	C	G	-	C	GAGGA	C	C	A	A	A	-	-	TA

4.1.2 Prisotnost filogeografske strukture in razporeditev populacij v klastre

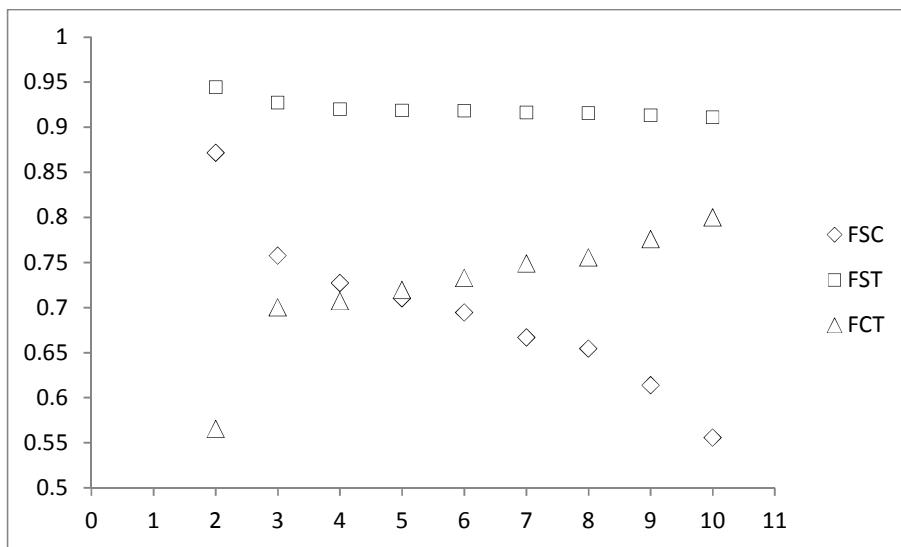
S pomočjo programa SAMOVA smo vzorce Blagajevega volčina razporedili v skupine, ki so si geografsko karseda blizu, vendar so med seboj kar najbolj genetsko diferencirane. Najverjetnejše število skupin (K) smo določili tako, da smo testirali K od 1 do 10. Ob povečevanju števila skupin vrednosti F_{CT} progresivno naraščajo (slika 10). Ob vrednostih $K \geq 4$ program predlaga posamezne populacije kot nove skupine, s čimer se geografska struktura izgublja, zato smo kot najverjetnejše število skupin predlagali $K = 3$. Podatke o razporeditvi posameznih populacij v tri skupine navajamo v preglednici 5. Prikazujemo tudi, kakšno porazdelitev predlaga program za štiri skupine.

Preglednica 5: Razdelitev populacij glede na analizo SAMOVA.

Table 5: Sorting of populations according to SAMOVA.

Ime skupine	Populacije
Skupina 1 – SLO	GRA, ID, ITA, JE, KP, MI, SA, TG
Skupina 2 – J + SR	CG, MK, ST, BG, BV, CE, GRC, KO, KR, MA, ME, PM, SM
Skupina 1 – SLO	GRA, ID, ITA, JE, KP, MI, SA, TG
Skupina 2 – J	CG, MK, ST,
Skupina 3 – SR	BG, BV, CE, GRC, KO, KR, MA, ME, PM, SM
Skupina 1	GRA, ID, ITA, JE, KP, MI, SA, TG
Skupina 2	CG, ST
Skupina 3	BG, BV, CE, KO, KR, MA, ME
Skupina 4	MK

Prisotnost filogeografske strukture smo preverili z oceno ideksov N_{ST} in G_{ST} . Na območju razširjenosti vrste znaša ($N_{ST} = 0,86781$) $>$ ($G_{ST} = 0,77419$), kar pomeni, da je filogeografska struktura prisotna. Prisotnost strukture smo preverili tudi za skupine, ki jih predlaga SAMOVA. Struktura je prisotna v vseh treh skupinah, saj je N_{ST} povsod večji od G_{ST} (preglednica 9).



Slika 10: Fiksacijski indeksi F, pridobljeni v programu SAMOVA (Dupanloup in sod. 2002). F_{ST} – diferenciacija med populacijami, F_{CT} – diferenciacija med skupinami populacij, F_{SC} – diferenciacija med populacijami znotraj skupin.

Figure 10: Fixation indices F obtained with the programme SAMOVA (Dupanloup in sod. 2002). F_{ST} – differentiation among populations, F_{CT} – differentiation among groups of populations, F_{SC} – differentiation among populations within groups.

4.1.3 Haplotype analiza

Ker smo analizirali pet različnih odsekov kloroplastne DNA, smo v programu DNAsp najprej preverili, kakšna je razporeditev vzorcev v haplotipe za posamezen odsek (preglednica 6). Nato smo vseh pet odsekov združili v eno nukleotidno zaporedje in ponovili analizo (preglednica 7). Tako za posamezne odseke kot za skupno zaporedje smo v programu Network izrisali mrežo haplotipov (slika 11 in 12).

V analizi odseka *atpB–rbcL* smo pridobili 6 haplotipov, ki se skladajo z geografsko razporeditvijo vzorčenih populacij. H2 je geografsko najbolj razširjen haplotip, pojavlja se skoraj na celotnem arealu, in je tudi številčno zelo zastopan, saj je prisoten pri skoraj polovici vseh analiziranih osebkov. Zelo razširjen je tudi haplotip H3, prisoten pri petih populacijah iz Slovenije/Italije in štirih iz BiH. V populacijah GRA, ID in MI (ter pri enem samem vzorcu iz BiH) je prisoten haplotip H4. V Bolgariji je prisoten haplotip

H1. V Grčiji in Smolinu (BiH) je prisoten haplotip H5, v Makedoniji ter pri po dveh osebkih iz BiH in Slovenije pa haplotip H6.

Na podlagi variabilne kloroplastne regije *matK* je prisotnih 10 haplotipov. Več kot pri polovici osebkov se pojavljata dva najbolj številčna haplotipa, H3 in H5. Pri vseh vzorcih iz Slovenije je prisoten haplotip H5, razen tistih iz Kozjanskega parka s samostojnim haplotipom H7. H3 je geografsko nekoliko bolj razširjen, saj se pojavlja v BiH, Grčiji in z enim vzorcem v Romuniji. Ostali haplotipi so manj številčni in so prisotni v posameznih populacijah, z izjemo H4, ki je prisoten v Črni gori, Makedoniji in dveh populacij iz BiH, ter H6, ki je prisoten v dveh populacijah iz BiH.

Analiza odseka *psbA–trnH* je razkrila prisotnost 8 haplotipov. Haplotip H5 se pojavlja v vseh slovenskih populacijah. H1, ki vključuje približno tretjino vseh vzorcev, se geografsko pojavlja v Bolgariji, Romuniji, Grčiji in BiH. V ostalih populacijah se pojavljajo posamezni haplotipi. Izjema je haplotip H2, ki se pojavlja pri dveh populacijah iz BiH.

Odsek *trnL–F* kaže variabilnost le v zaporedjih poli-A/T. Štiri haplotipi so zastopani v vzorcih. V vseh slovenskih populacijah, populacijah iz BiH, Bolgarije in deloma iz Romunije (BV) je prisoten haplotip H1. Izjema je populacija MI, v kateri se pojavlja lasten haplotip H4. V Črni gori, Makedoniji in Stolcu (BiH) je prisoten haplotip H2, pri populacijah GRC, PM in SM pa haplotip H3.

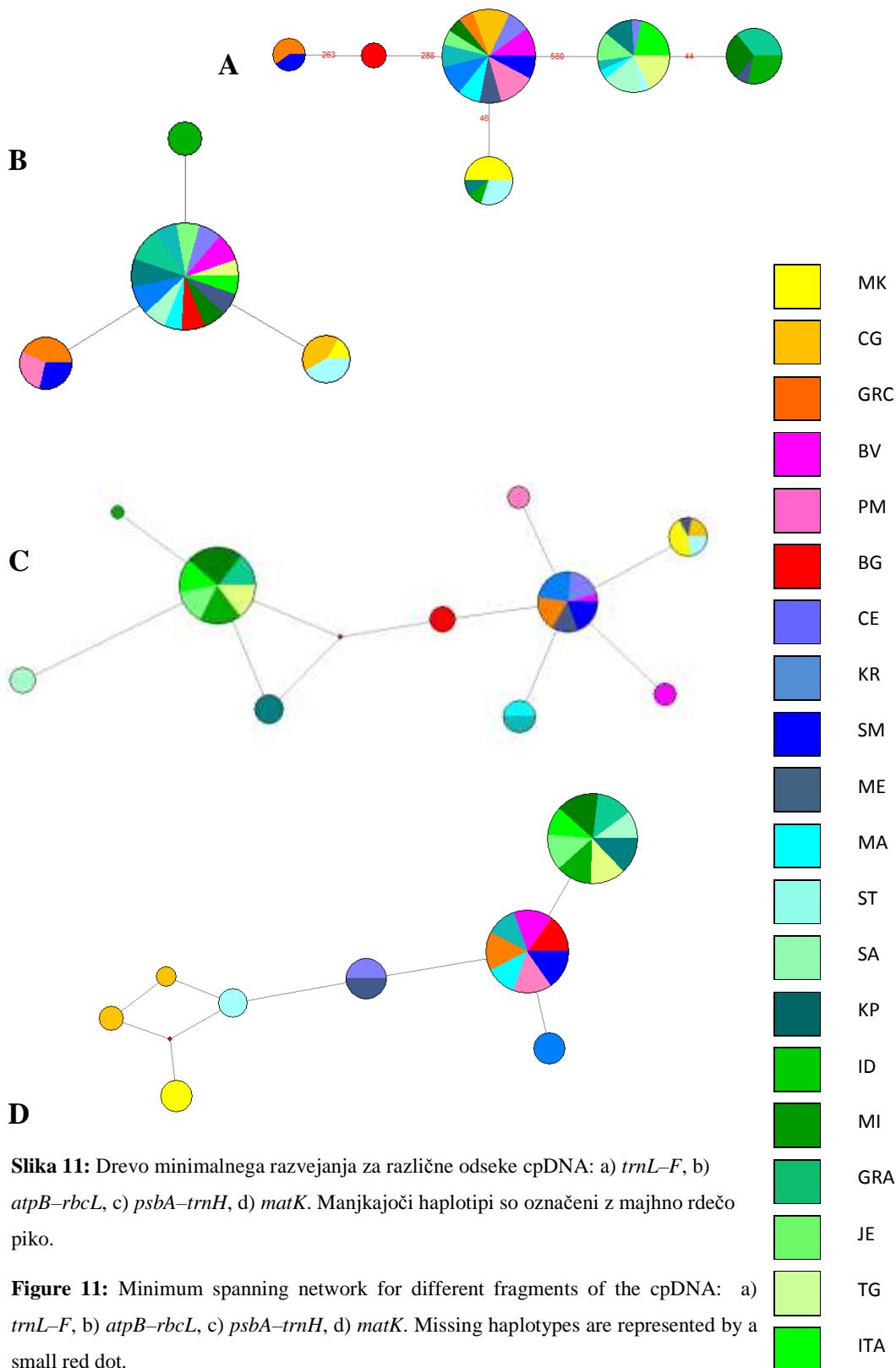
Rpl20–rps12 je najmanj variabilen odsek, saj je prisotna le ena mutacija, ki loči vzorce iz Kozjanskega parka od vseh ostalih vzorcev.

Vseh pet odsekov kloroplastne DNA smo analizirali tudi skupaj. Zaradi pojavljanja številnih mutacij na mestih mononukleotidnih mikrosatelitov (poli-A in poli-T) smo vzorce analizirali na dva načina: i) ob upoštevanju poli-A/T regij (slika 11) in ii) brez poli-A/T regij. Z analizo kloroplastne DNA smo v primeru, ko nismo upoštevali poli-A/T regij, pridobili 14 oziroma 13 haplotipov, odvisno od tega, ali smo v analizi upoštevali vrzeli v poravnavi (angl. *alignment gaps*) ali ne. Edina razlika nastane pri nekaterih vzorcih GRC in SM; ob upoštevanju vrzeli v poravnavi so vzorci GRC5, GRC16, GRC30, SM24 in SM27 uvrščeni v samostojen haplotip, ob neupoštevanju

vrzeli pa so ti vzorci uvrščeni v skupen haplotip z vzorci iz Bolgarije. Pri večini slovenskih vzorcev se pojavlja haplotip H6; izjema so vzorci KP, pri katerih sta prisotna dva dodatna haplotipa, ter en vzorec MI, ki predstavlja haplotip H10. Ostali haplotipi so manj številčni. V Grčiji, Romuniji ter nekaj populacijah iz BiH se pojavlja haplotip H3, preostali haplotipi pa se pojavljajo le v po eni ali dveh populacijah. Glede na število povezav, ki izhajajo iz njega, predstavlja H3 osrednji haplotip, ki se tudi geografsko pojavlja na največjem območju (slika 11). Vzorci iz Slovenije in Italije izhajajo iz osrednjega haplotipa in tvorijo, podobno kot pri mreži 27 haplotipov (slika 11A), enotno skupino. Vsi haplotipi, ki se pojavljajo v Makedoniji, Grčiji in na Stolcu (BiH) tvorijo manjšo skupino, ki izhaja iz haplotipa, skupnega populacijam v Čelebičih in Meštorovcu iz BiH (slika 11B).

V analizi, ki je upoštevala mutacije v zaporedjih poli-A/T, smo pridobili 27 haplotipov. Večina haplotipov se pojavlja v eni ali največ dveh populacijah. Izjema je H3, ki se pojavlja v italijanski in dveh slovenskih populacijah. Vzorci iz posameznih populacij so najpogosteje zastopani v dveh haplotipih. Nekaj populacij je takih, pri katerih je prisoten en sam haplotip (MK, KR, BG, GRA, ITA, TG).

Kljub temu, da kaže mreža 27 haplotipov (slika 12B) kompleksnejši vzorec, je razporeditev posameznih populacij podobna kot pri mreži 13 oziroma 14 haplotipov (slika 12A). Mreža se razlikuje v odsotnosti osrednjega, geografsko bolj razširjenega haplotipa. Namesto tega je prisotno večje število haplotipov, ki združujejo osebke iz ene ali dveh populacij. Na območju Slovenije se še vedno pojavljajo trije haplotipi, ki združujejo po dve ali tri populacije, in nekaj haplotipov, znotraj katerih se nahajajo posamezni vzorci. Znotraj tretje skupine se v mreži 27 haplotipov ločijo vzorci iz Črne gore in Stolca (BiH), medtem ko se v populaciji iz Makedonije v obeh primerih pojavlja en sam haplotip.



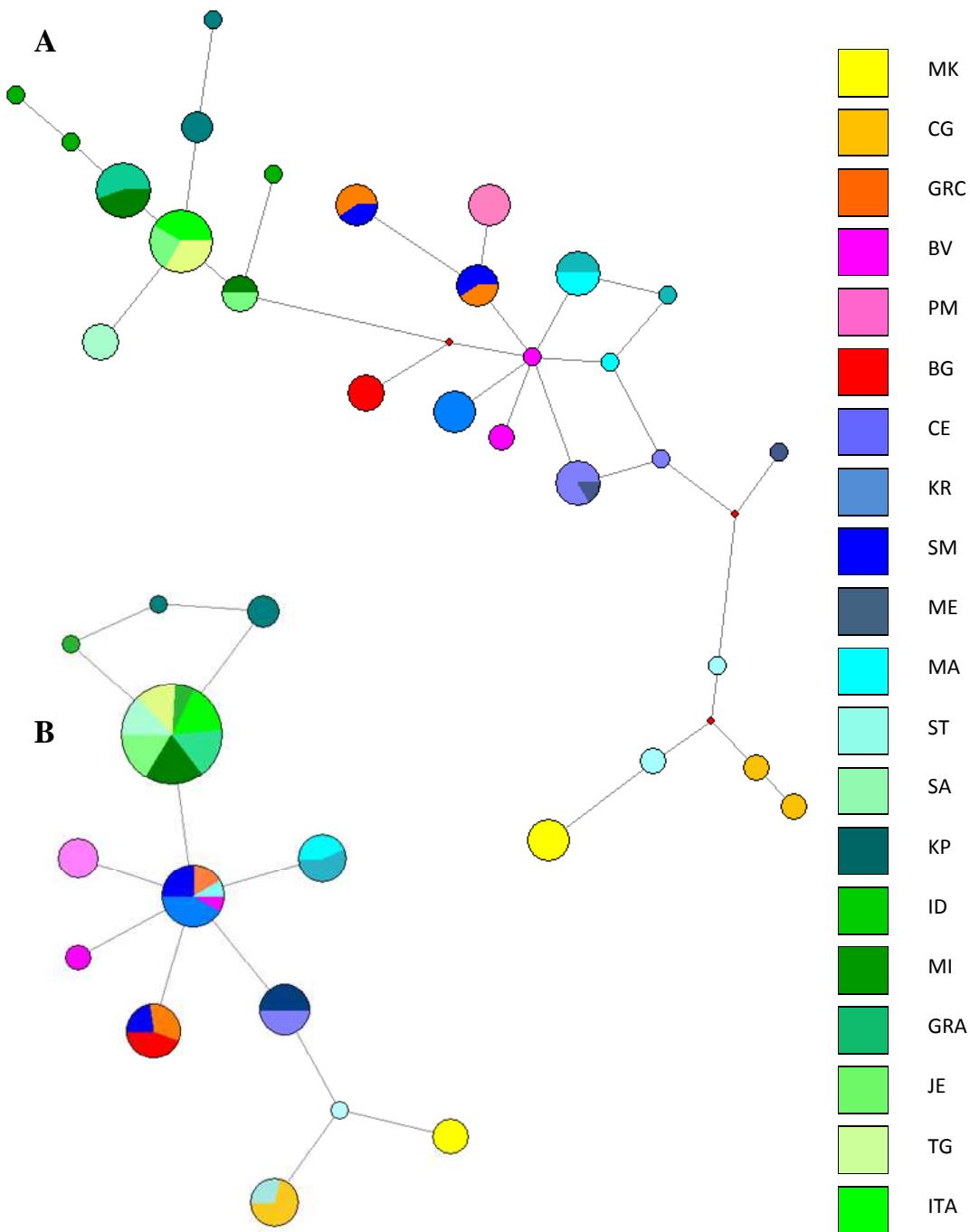
Slika 11: Drevo minimalnega razvejanja za različne odseke cpDNA: a) *trnL-F*, b) *atpB-rbcL*, c) *psbA-trnH*, d) *matK*. Manjkajoči haplotipi so označeni z majhno rdečo piko.

Figure 11: Minimum spanning network for different fragments of the cpDNA: a) *trnL-F*, b) *atpB-rbcL*, c) *psbA-trnH*, d) *matK*. Missing haplotypes are represented by a small red dot.

Preglednica 6: Razporeditev haplotipov po različnih odsekih cpDNA. N - število osebkov z enakim haplotipom; P - populacije, ki vključujejo osebke z enakim haplotipom (v oklepajih je navedeno število osebkov iz posamezne populacije, zastopanih v haplotipu); *Hd* - haplotipna raznovrstnost.

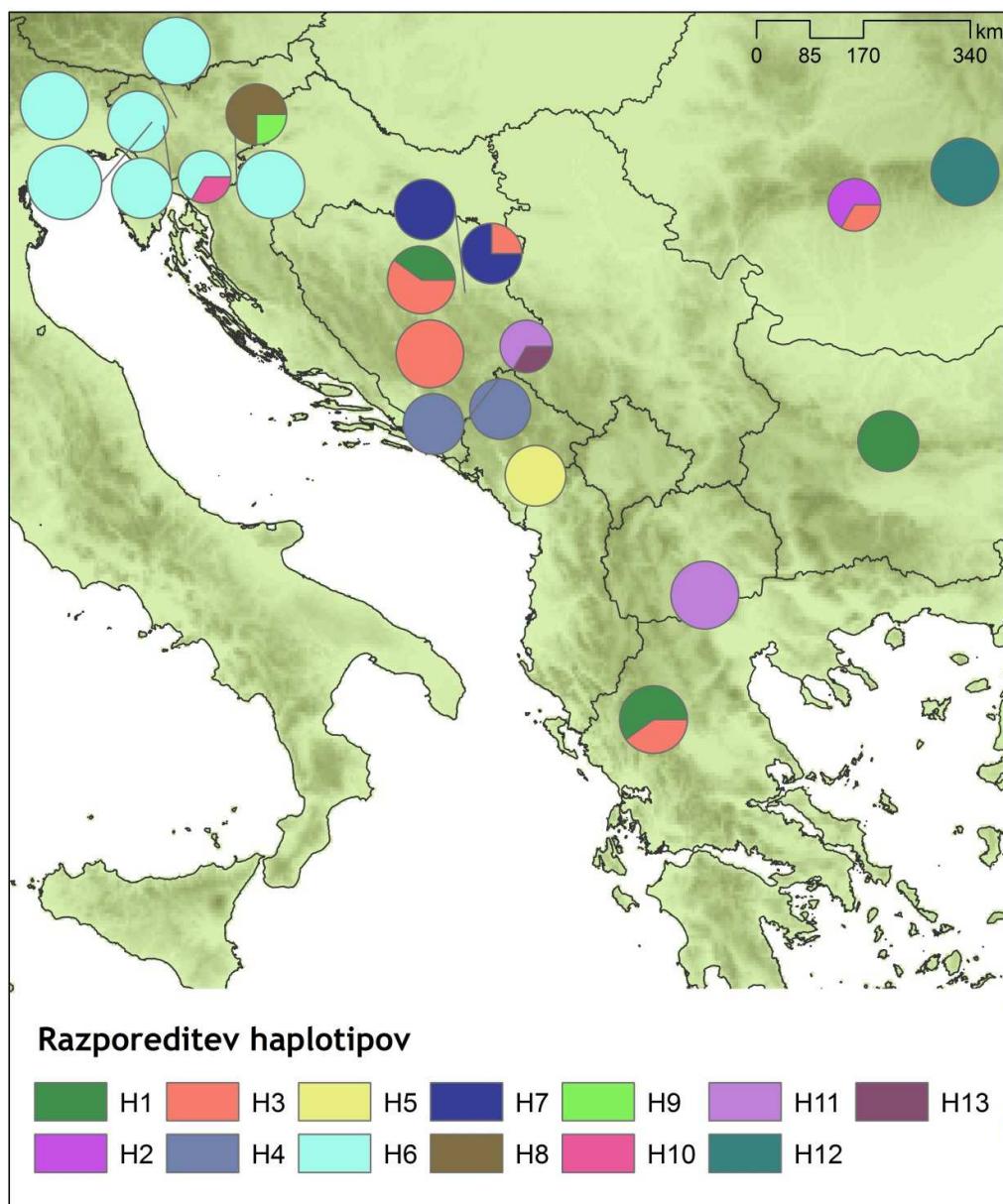
Table 6: Distribution of haplotypes according to different cpDNA fragments. N - number of individuals sharing the same haplotype; P - populations, sharing the same haplotype (numbers in brackets correspond to the number of individuals from a population within a given haplotype); *Hd* - haplotype diversity.

Haplotype	N	P
<i>atpB-rbcL; Hd = 0,7385</i>		
H 1	3	BG (3)
H 2	39	BV (4), CE (4), CG (5), GRC (2), ID (2), JE (2), KO (2), KR (3), MA (3), ME (3), PM (5), SM (3)
H 3	23	CE (1), ITA (5), JE (3), KO (1), KP (3), MA (1), SA (4), ST (1), TG (4)
H 4	14	GRA (5), ID (4), ME (1), MI (4)
H 5	5	GRC (3), SM (2)
H 6	10	KP (1), MI (1), MK (5), ST (3)
<i>matK; Hd = 0,7878</i>		
H 1	4	BG (4)
H 2	3	BV (3)
H 3	21	BV (1), CE(4), KR (5), GRC (4), ME (3), SM (4)
H 4	9	CG (2), ME (1), MK (4), ST (2)
H 5	34	GRA (5), ID (8), ITA (5), JE (5), MI (6), TG1 (5)
H 6	6	KO (3), MA (3)
H 7	5	KP (5)
H 8	1	MI (1)
H 9	3	PM (3)
H 10	4	SA (4)
<i>psbA-trnH; Hd = 0,7264</i>		
H 1	33	BG (5), BV (5), GRC (5), KO (4), MA (4), MA (3), PM (5), SM (5)
H 2	8	CE (4), ME (4)
H 3	2	CG (2)
H 4	3	CG (3)
H 5	39	SA (4), GRA (5), ID (6), ITA (4), JE (5), MI (5), TG (5), KP (5)
H 6	5	KR (5)
H 7	5	MK (5)
H 8	4	ST (4)
<i>trnL-F, Hd = 0,5443</i>		
H 1	58	BG (4), BV (5), CE (4), GRA (5), ID (4), KR (5), KO (4), KP (5), JE (4), MA (3), KR (5), SA (4), TG (3), ITA (3)
H 2	12	CG (3), MK (3), ST (5)
H 3	14	GRC (4), PM (4), SM (5)
H 4	6	MI (6)
<i>rpl20-rps12, Hd = 0,1050</i>		
H 1	86	BG (4), BV (5), CE (4), GRA (5), ID (4), KR (5), KO (4), KP (5), JE (4), MA (3), KR (5), SA (4), TG (3), ITA (3), CG (3), MK (3), ST (5) GRC (4), PM (4), SM (5), MI (6)
H 2	5	KP (5)



Slika 12: Mreža haplotipov, pridobljena v programu Network (A) ob upoštevanju vseh mutacij (vključuje poli-A/T regije) in (B) ob izločitvi poli-A/T mutacij iz analize. Manjkajoči haplotipi so označeni z majhno rdečo piko.

Figure 12: Haplotype network obtained by (A) considering mutations in the poly-A/T regions and (B) by removing poly-A/T regions from the analysis. Missing haplotypes are represented by a small red dot.



Slika 13: Razporeditev haplotipov Blagajevega volčina na podlagi petih odsekov kloroplastne DNA (zemljevid: P. Glasnović).

Figure 13: Distribution of haplotypes of *Daphne blagayana* based on five cpDNA fragments (map: P. Glasnović).

Preglednica 7: (A) Seznam 27 haplotipov, pridobljenih v DNAsp ob upoštevanju mutacij v poli-A/T regijah. N – št. vzorcev, L – pripadnost populaciji. (B) Seznam 13 haplotipov, pridobljenih ob izločitvi poli-A/T regij. Poudarjeni vzorci tvorijo samostojen (14.) haplotip ob upoštevanju vrzeli v poravnavi.

Table 7: List of (A) 27 haplotypes, calculated in DNAsp when considering mutations in poly-A/T regions. (B) 13 haplotypes, calculated in the programme DNAsp without poly-A/T regions. Samples in bold belong to a separate (14th) haplotype if the gaps are considered in the analysis.

Oznaka haplotipa	N	Vzorci, uvrščeni v posamezen haplotip	L
H 1	4	BG1, BG16, BG3, BG30	BG
H 2	2	BV17, BV21	BV
H 3	1	BV2	BV
H 4	1	CE10	CE
H 5	6	CE2, CE6, CE8, ME14, ME16, ME20	CE, ME
H 6	2	CG1, CG14	CG
H 7	2	CG16, CG2	CG
H 8	9	GRA16, GRA24, GRA28, GRA3, GRA30, ID16, ID24, ID5, ID6	GRA, ID
H 9	5	GRC1, GRC2, SM15, SM4, SM7	GRC, SM
H 10	5	GRC16, GRC30, GRC5, SM24, SM27,	GRC, SM
H 11	4	ID1, ID2, JE1, JE22	ID, JE
H 12	12	ITA10, ITA26, ITA27, ITA28, ITA9, JE16, JE28, JE5, TG12, TG13, TG2, TG3	ITA, JE, TG
H 13	6	KO10, KO14, KO2, MA20, MA21, MA3	KO, MA
H 14	1	KO24	KO
H 15	3	KP16, KP26, KP30	KP
H 16	1	KP22	KP
H 17	5	KR20, KR22, KR24, KR31, KR3	KR
H 18	1	MA28	MA
H 19	1	ME24	ME
H 20	1	MI2	MI
H 21	1	MI25	MI
H 22	1	MI30	MI
H 23	5	MK1, MK16, MK2, MK30, MK8	MK
H 24	5	PM16, PM1, PM2, PM22, PM3	PM
H 25	4	SA16, SA20, SA24, SA30	SA
H 26	2	ST14, ST6	ST
H 27	1	ST15	ST

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7

Oznaka haplotipa	N	Vzorci, uvrščeni v posamezen haplotip	L
H1	9	BG1, BG3, BG16, BG30, GRC5, GRC16, GRC30, SM24, SM27	BG, GRC, SM
H2	2	BV21, BV17	BV
H3	12	BV26, GRC1, GRC2, KR20, KR22, KR24, KR3, KR31, MA28, SM15, SM4, SM7	BV, GRC, KR, MA, SM
H4	8	CE10, CE2, CE8, CE6, ME14, ME16, ME20, ME24	CE, ME
H5	4	CG1, CG14 CG2, CG16	CG
H6	31	SA16, SA20, SA24, SA30, GRA16, GRA24, GRA28, GRA3, GRA30, ID1, SA, GRA, ID, ID16, ID2, ID24, ID5, ID6, ITA9, ITA10, ITA26, ITA27, ITA28, JE28, JE1, ITA, JE, MI, JE5, JE16, JE22, MI25, MI30, TG2, TG3, TG12, TG13	TG
H7	7	KO2, KO10, KO14, KO24, MA3, MA20, MA21	KO, MA
H8	3	KP16, KP26, KP30	KP
H9	1	KP 22	KP
H10	1	MI2	MI
H11	7	MK1, MK2, MK8, MK16, MK30, ST14, ST6	MK, ST
H12	5	PM1, PM2, PM3, PM16, PM22	PM
H13	1	ST15	ST

Preglednica 8: Seznam vzorčenih populacij Blagajevega volčina. N – število vzorčenih rastlin, H – število haplotipov, *Hd* – haplotipna raznovrstnost, π – nukleotidna raznovrstnost.

Table 8: List of sampled populations of *Daphne blagayana*. N – number of plants sampled, H – number of haplotypes, *Hd* – haplotype diversity, π – nucleotide diversity.

Populacija	N	h	Hd	π
BG	4	1	0,00000	0,00000
BV	3	1	0,66667	0,00019
CE	4	1	0,00000	0,00000
CG	4	1	0,00000	0,00000
GRA	5	1	0,00000	0,00000
GRC	5	2	0,60000	0,00017
ID	6	1	0,00000	0,00000
ITA	5	1	0,00000	0,00000
JE	5	1	0,00000	0,00000
KO	4	1	0,00000	0,00000
KP	4	2	0,50000	0,00014
KR	5	1	0,00000	0,00000
MK	5	1	0,00000	0,00000
MA	4	1	0,50000	0,00014
ME	4	1	0,00000	0,00000
MI	4	3	0,83333	0,00062
PM	5	1	0,00000	0,00000
SA	4	1	0,00000	0,00000
SM	5	2	0,60000	0,00017
ST	3	2	0,66667	0,00019
TG	4	1	0,00000	0,00000
Skupaj	91	13	0,84138	0,00055

Preglednica 9: Haplotype (Hd) in nukleotidna (π) raznovrstnost, izračunani s programom DNAsp (Rozas in Rozas, 1999).

Table 9: Haplotype (gene) diversity (Hd) and nucleotide (π) diversity, calculated in the programme DNAsp (Rozas in Rozas, 1999).

	Hd	π	G_{ST}	N_{ST}
Skupina SLO	0,25714	0,00009	0,56119	0,62595
Skupina J	0,591	0,00029	0,70033	0,83336
Skupina SR	0,82114	0,00035	0,71486	0,81798
Skupina J + Skupina SR	0,87352	0,00056	0,74920	0,88434
Skupaj	0,84138	0,00055	0,77419	0,86781

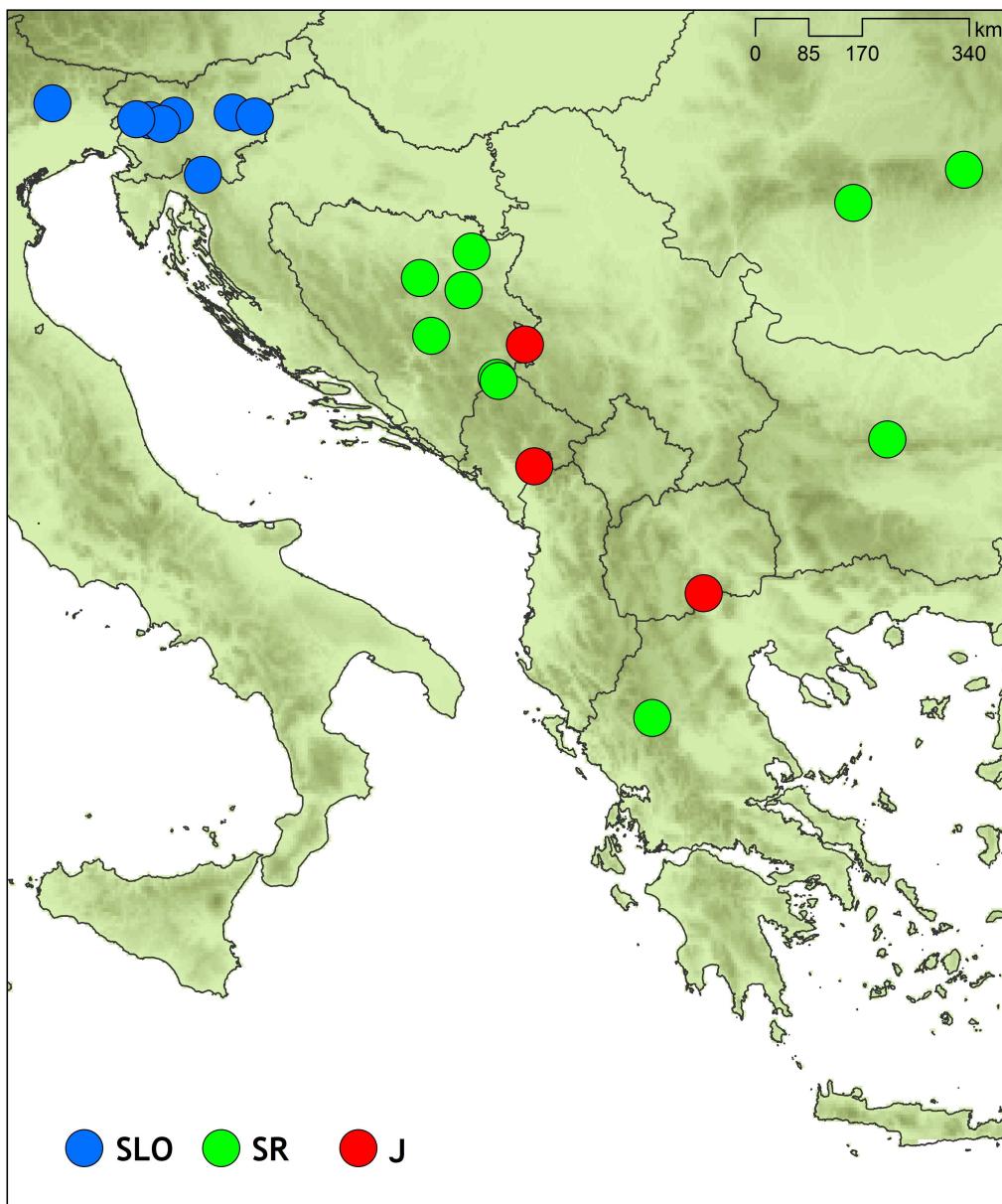
V programu DNAsp smo izračunali haplotipno raznovrstnost. Skupna haplotipna raznovrstnost ($Hd = 0,84138$) je veliko večja kot haplotipna raznovrstnost po posamezni populaciji (med 0 in 0,667) in tudi večja od povprečne haplotipne raznovrstnosti na populacijo ($H_s = 0,2$). Regionalno haplotipno raznovrstnost smo računali posebej za dva ali tri klastre, ki smo jih definirali glede na rezultate analize v programu SAMOVA. V prvi klaster smo vključili vse vzorce iz Slovenije in Italije; haplotipna raznovrstnost je relativno majhna ($H_s = 0,257$). V drugi klaster smo vključili vzorce ST, CG in MK (skupina »J«; $H_s = 0,591$). Tretji klaster, ki vključuje ostale vzorce, ima najvišjo haplotipno raznovrstnost izmed treh skupin ($H_s = 0,82114$). Zadnja dva klastra smo obravnavali tudi skupaj. V tem primeru je haplotipna raznovrstnost te skupine bližu skupni haplotipni raznovrstnosti ($H_s = 0,87352$).

Preglednica 10: Hierarhična analiza molekularne variance (AMOVA) za celoten podatkovni niz.

Skupine so definirane glede na rezulata iz programa SAMOVA.

Table 10: Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) for the whole data set. Groups are defined according to the results from SAMOVA.

		d.f.	vsota kvadratov	komponente	odstotek variance
1 skupina	Med populacijami	20	98,323	1,11683 Va	92,98
	Znotraj populacij	70	5,903	0,08433 Vb	7,02
	Skupaj	90	104,226	1,20116	100
2 skupini	Med skupinami	1	46,700	1,00757 Va	59,20
	Med populacijami znotraj skupin	19	51,623	0,61010 Vb	35,85
	Znotraj populacij	70	5,903	0,08433 Vc	4,95
	Skupaj	90	104,226	1,70200	100
3 skupine	Med skupinami	2	67,361	1,16443 Va	71,55
	Med populacijami znotraj skupin	18	30,962	0,37860 Vb	23,26
	Znotraj populacij	70	5,903	0,08433 Vc	5,18
	Skupaj	90	104,226	1,62736	100



Slika 14: Razporeditev klastrov Blagajevega volčina na podlagi petih odsekov kloroplastne DNA (zemljevid: P. Glasnović).

Figure 14: Distribution of clusters of *Daphne blagayana* based on five cpDNA fragments (map: P. Glasnović).

4.1.4 Demografska analiza populacij

Razporeditev neskladja je orodje, s katerim lahko s pomočjo uporabe selektivno nevtralnih nukleotidnih zaporedij sklepamo o spremembah v efektivni velikosti populacij v preteklosti. Če je efektivna velikost populacij v času konstantna, lahko s pomočjo analize neskladja sklepamo o poteku naravne selekcije.

Medtem ko je za genealogije populacij s konstantno efektivno velikostjo populacij značilna bimodalna razporeditev parnih razlik, je za populacije, pri katerih je prisotna hitra populacijska rast (ekspanzija) ali krčenje, značilna drugačna razporeditev (unimodalna). Pri hitro rastočih populacijah je vidna visoka frekvenca parov sekvenc z visoko stopnjo neskladja in nizka frekvenca parov sekvenc z nizko stopnjo neskladja. Obratno je pri populaciji, ki je doživela krčenje, na grafu razvidna visoka frekvenca parov sekvenc z nizko stopnjo neskladja.

Teste nevtralnosti in analizo neskladij (angl. *mismatch analysis*) smo izvedli za tri skupine, kot jih predlaga SAMOVA: za vzorce iz Slovenije in Italije (klaster »SLO«), vzorce iz osrednjega Balkana (klaster »SR«) ter vzorce z južnega Balkana (klaster »J«). Zadnji dve skupini smo obravnavali tudi skupaj (klaster »SR+J«). V analizo smo vključili vsa pridobljena nukleotidna zaporedja (priloga D).

Za klaster »J« so vrednosti vseh treh testov pozitivne. Pri klastru »SR« je Fujev Fs test negativen, testa Tajima D in Ramos-Onsins in Rozas R2 pa sta pozitivna. Za klaster »SLO« je Ramos-Onsins in Rozasov R2 test pozitiven, ostala dva testa pa sta negativna.

Vrednost Tajimovega D testa se gibljejo med $-0,68968$ in $+1,55696$. Vrednosti $D < 0$ v Tajimovem testu nakazujejo presežek redkih mutacij, do česar lahko pride zaradi uravnotežene selekcije ali populacijske rasti. Negativne vrednosti so torej pričakovane takrat, ko je bila prisotna recentna populacijska ekspanzija (Fu, 1997; Knowles in sod., 1999). Vrednosti D blizu 0 kažejo na konstantno efektivno velikost populacije, medtem ko $D > 0$ pomeni močno usmerjeno selekcijo ali recentno ozko grlo. Do pozitivne vrednosti pride torej takrat, ko je zaradi dolgotrajne geografske izolacije populacij prišlo do akumulacije mutacijskih razlik med populacijami, ali pa do izravnalne selekcije (Rogers in Harpending, 1992; Marjoram in Donnelly, 1994). Ničto hipotezo $D = 0$ in s

tem ničti model nevtralne genealogije s konstantno efektivno velikostjo populacije lahko zavrzemo takrat, ko je rezultat dve standardni deviaciji stran od povprečja.

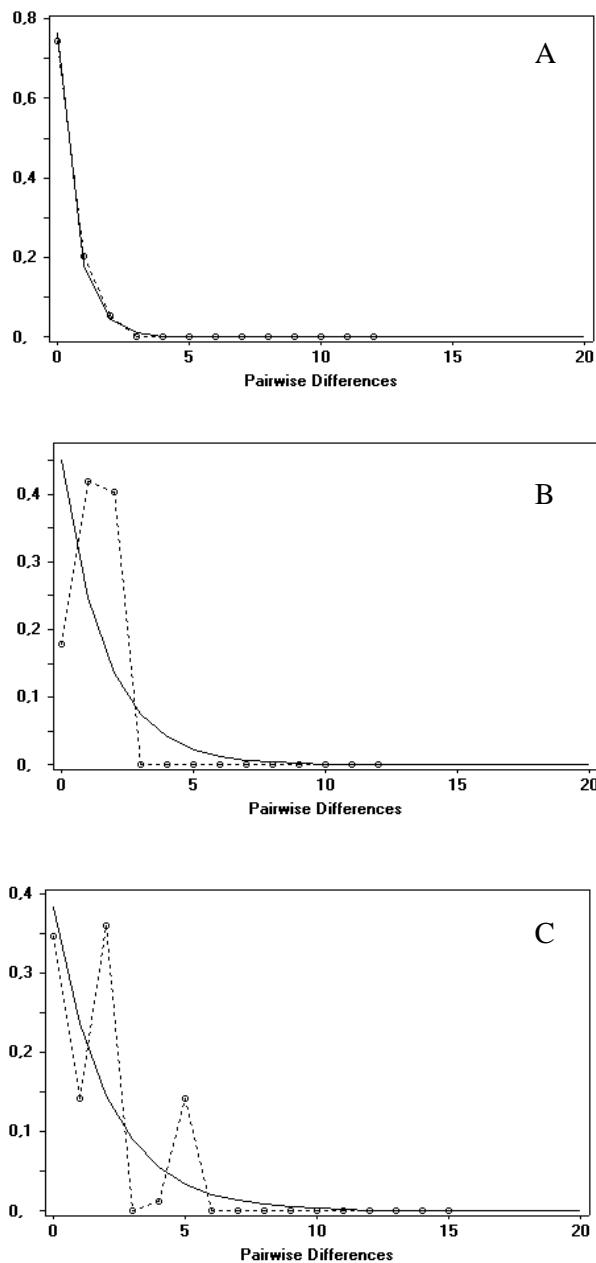
Vrednosti Fujevega Fs testa so med – 1,65732 in + 0,71635 ter vrednosti Ramos-Onsins in Rozasovega R2 testa pa med 0,0778 in 0,1962. Noben od testov ne kaže statistične značilnosti.

Preglednica 11: Rezultati testov nevtralnosti za klastre Blagajevega volčina: test Tajima D, Fu Fs in Ramos-Onsins in Rozas R2.

Table 11: Results of neutrality tests for clusters of *Daphne blagayana*: Tajima's D, Fu's Fs in Ramos-Onsins in Rozas' R2.

	J	SR	SLO	J + SR	Skupaj
Tajima D					
Število nukleotidnih zaporedij	12	43	36	55	91
Št. mest s substitucijami	2	5	2	8	11
Tajima D	1,55696	0,15952	– 0,68968	0,27412	0,18302
Vrednost P	0,95700	0,62200	0,26200	0,64700	0,63000
Fu Fs					
Število alelov	3	7	4	10	14
Theta (Pi)	1,01515	1,43965	0,51429	2,09562	2,98755
Pričakovano št. alelov	3,12643	5,47689	2,81758	7,44631	10,81485
Fs	0,71635	– 0,95748	– 1,00335	– 1,56611	– 1,65732
Vrednost P	0,63100	0,32900	0,21200	0,25000	0,28600
Ramos-Onsins in Rozas R2					
R2	0,1962	0,1224	0,0778	0,1205	0,0942
Vrednost P	0,8770	0,6390	0,11768	0,6760	0,5230

Razporeditve neskladja nukleotidnih zaporedij so za posamezne linije prikazane na sliki 15.

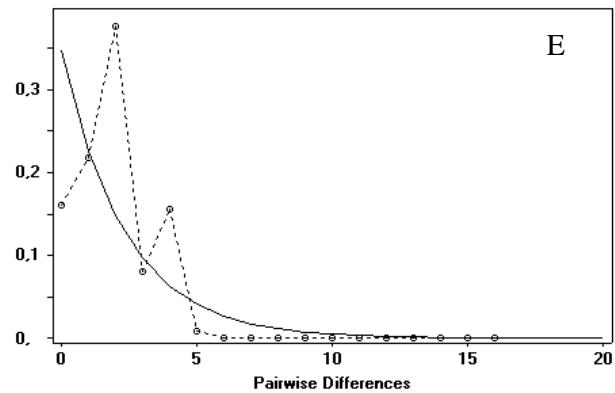
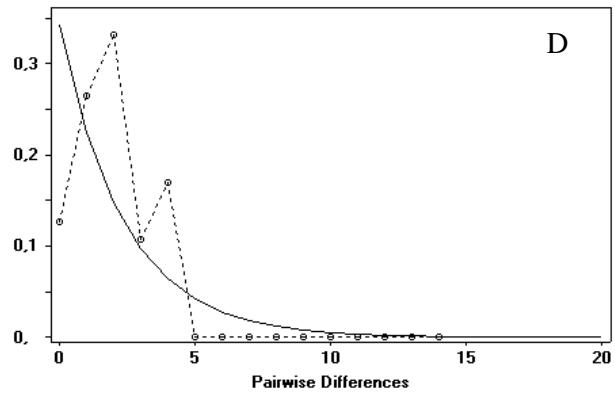


se nadaljuje

Slika 15: Razporeditev neskladja nukleotidnih zaporedij za različne klastre. Polna črta: pričakovana razporeditev, črtkana črta: opažena razporeditev. A) klaster SLO, B) klaster SR C) klaster J, D) združena klastra J in SR, E) vsi vzorci.

Figure 15: Mismatch analysis for different clusters. Full line: expected distribution, dotted line: observed distribution. A) cluster SLO, B) cluster SR, C) cluster J, D) combined clusters J + SR, E) all individuals combined.

nadaljevanje slike 15



4.2 AFLP ANALIZA

Genotipizacija je bila uspešna pri 135 od 195 osebkov. Za uspešno genotipizacijo smo šteli, če nam je pri posameznem vzorcu uspelo genotipizirati vsaj eno od treh kombinacij začetnih oligonukleotidov. Ker je bila pri nekaterih populacijah pomnožitev neuspešna pri večjem številu osebkov, smo tiste populacije izločili iz nadalnjih analiz (iz statistične analize smo izločili tiste lokalitete, za katere smo imeli na voljo manj kot 5 AFLP profilov).

Za nadaljnje analize smo upoštevali 123 osebkov Blagayevega volčina s 13 vzorčnih lokacij, razporejenih po celotnem območju razširjenosti. Uporabili smo 3 kombinacije začetnih oligonukleotidov (preglednica 3). Skupno smo prešteli 84 ponovljivih vrhov (preglednica 12); 26 pri kombinaciji G13, 38 pri kombinaciji G14 in 20 pri kombinaciji B14. Po zgledu Bonina in sod. (2004) smo izračunali stopnjo napake (angl. *error rate*), ki znaša 4,8 %.

4.2.1 Opisna statistika

Pri štirih parih vzorcev smo zaznali enak genotip: vzorca CE4 in CE40 iz populacije CE, vzorce CG24 in CG26 iz populacije CG, vzorce GRA13 in GRA14 ter GRA30 in GRA12 iz populacije GRA.

Genetsko raznolikost smo najprej izračunali kot odstotek polimorfnih lokusov in alelno diverzitetu (ali alelno bogastvo). Odstotek polimorfnih lokusov (brez korekcije velikosti populacij) se giblje med 11,9 in 34,5 % na populacijo s povprečno vrednostjo 22,4 %. Najvišji odstotek imajo populacije MK (34,5), GRA (34,5), BG (28,6), SM in ST (oba 27,4). Najnižji odstotek imajo populacije ITA (11,9), KP (13,1), CE (13,1) in BV (16,7).

Preglednica 12: Število pridobljenih in polimorfnih vrhov za vsako kombinacijo začetnih oligonukleotidov.

Table 12: Number peaks and polymorphic peaks for each of the three primer combinations.

AFLP kombinacija	začetna oligonukleotida	št. pridobljenih	št. polimorfnih
		vrhov	vrhov
B14	EcoRI + ACG – 6-FAM, MseI + CTC	20	18
G13	EcoRI + ACT – VIC, MseI + CTA	26	24
G14	EcoRI + ACT – VIC, MseI + CTC	38	29
skupaj		84	71

Preglednica 13: Izbrani populacijski parametri. N - število vzorčenih osebkov, S – razdelitev v skupino glede na STRUCTURE; Ne - odstotek polimorfnih lokusov izračunan v programu POPGENE (Yeh in Boyle., 1997), He - Neieva genetska diverziteta izračunana v programu AFLPsurv (Vekemans, 2002) pod predpostavko, da so populacije i) v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (He_N) oz. ii) ob predpostavki, da je koeficient inbridinga $F_{IS} = 1$ (He_I).

Table 13: Selected population parameters. N – number of sampled individuals, S – samples belonging to groups according to STRUCTURE; Ne – percentage of polymorphic loci, calculated by POPGENE (Yeh in Boyle, 1997), He – Nei's gene diversity calculated by AFLPsurv (Vekemans, 2002) under the assumption of i) Hardy-Weinberg equilibrium (He_N) or ii) total inbreeding (He_I).

Vzorčna lokaliteta	N	Ne	He_N	He_I	razlika
BG	14	28,57	0,13561	0,10969	0,0259
BV	10	16,67	0,08648	0,08724	- 0,0008
CE	5	13,10	0,13046	0,12766	0,0028
CG	10	23,81	0,13072	0,12502	0,0057
GRC	13	21,43	0,10043	0,08445	0,0160
KR	7	20,24	0,11834	0,10421	0,0141
MK	15	34,52	0,14301	0,1106	0,0324
SM	8	27,38	0,16027	0,13776	0,0225
ST	5	27,38			
TG	11	19,05	0,09797	0,0911	0,0069
GRA	13	34,52	0,16974	0,14534	0,0244
ITA	5	11,90	0,10645	0,11397	- 0,0075
KP	7	13,10	0,08805	0,10667	- 0,0186
povprečje	9,5	22,44	0,1223	0,112	0,0103

Ker sta tako odstotek polimorfnih lokusov kot tudi alelno bogastvo zelo občutljivi na velikost vzorca, smo opravili standardizacijo vrednosti alelnega bogastva (rarefakcijo) na največje možno število osebkov na populacijo / skupino. Program je kot največjo možno standardizirano velikost populacije določil 9 oz. 11 osebkov (pri analizi 7 skupin glede na rezultate programa BAPS). Pri analizi vseh 13 populacij smo sami določili največjo možno velikost populacije na 5, saj je to naša najmanjša velikost vzorčene populacije, ki smo jo uporabili v analizah.

V primeru, ko smo (privatno) alelno bogastvo računali za 13 populacij, kažejo največje vrednosti nekatere populacije iz Bosne in Hercegovine (SM, ST) ter populacija iz Bolgarije, medtem ko imajo najmanjše alelno bogastvo populacije ITA, KP in BV. Privatno alelno bogastvo je največje pri vzorcih BG, ST in GRA in najmanjše za MK in CG.

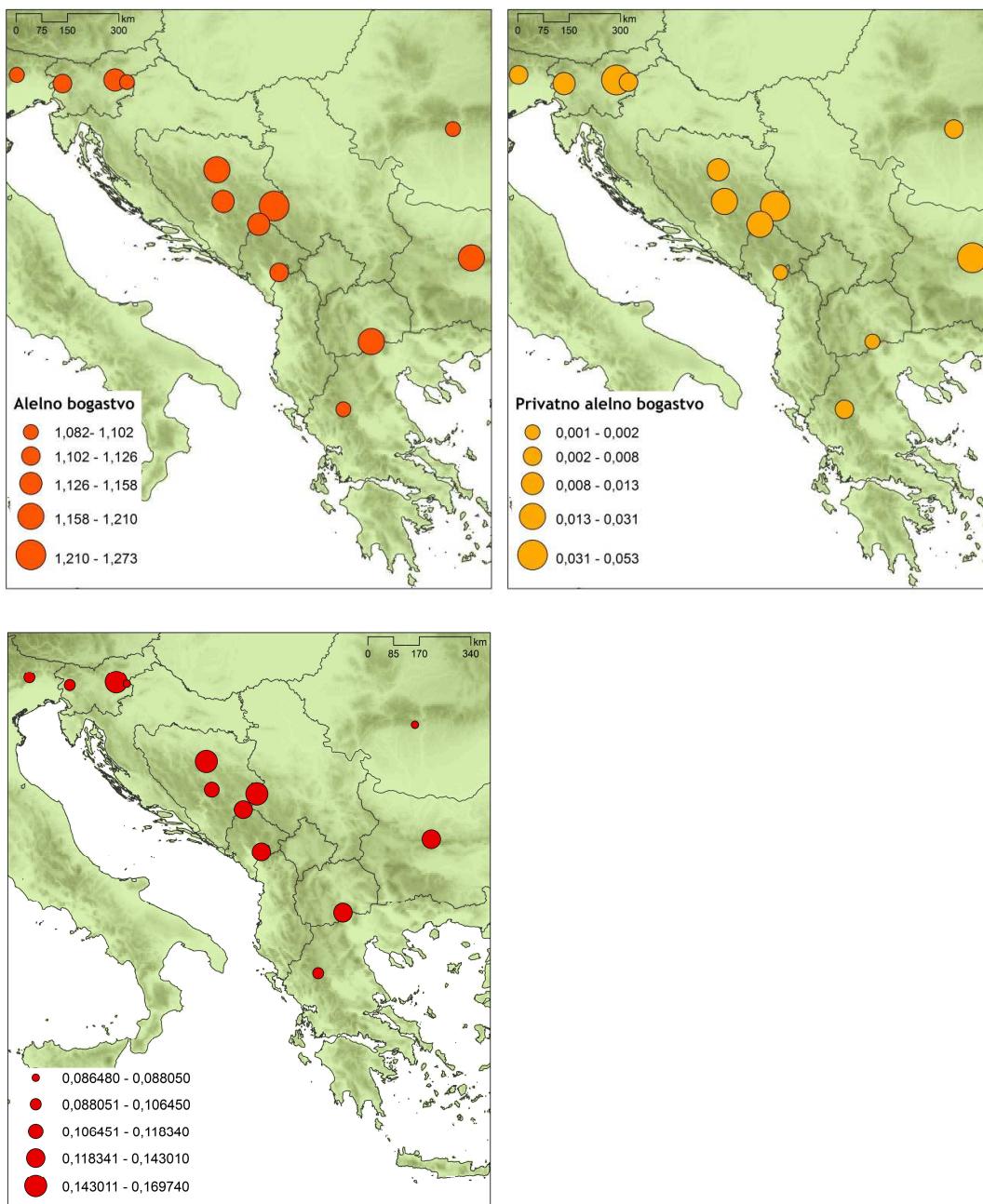
Visoko alelno in privatno alelno bogastvo kažeta populaciji BG in GRA tudi takrat, ko smo združili nekatere populacije v skupine tako, kot predлага program BAPS (7 skupin). Najnižje alelno bogastvo kažejo skupine CE ter TG-ITA-KP.

Kot drugo merilo genetske raznolikosti smo uporabili Neievo genetsko diverziteto. Vrednosti genetske diverzitete, izračunane po predpostavki HWE ali popolnega inbridingu se razlikujejo le malo (največ za 0,026). Neieva genetska diverziteta znaša med 0,086 pri populaciji BV in 0,170 pri populaciji GRA po predpostavki HWE oz. med 0,084 in 0,145 (isti populaciji) pri inbridingu. Vrednosti pod predpostavko HWE so pri večini populacij malenkost višje kot pri inbridingu (med 0,0028 in 0,026), le pri treh populacijah so vrednosti nižje (med 0,0008 in 0,019). Korelacija med ocenama H_{eN} in H_{eI} med vrednostmi je visoka (0.8687, N=12) in signifikantna (P<0,01).

Preglednica 14: Alelno bogastvo in privatno alelno bogastvo po rarefakciji (z * je označena standardizirana velikost populacije), izračunano v programu ADZE 1.0 (Szpiech in Jakobsoon, 2008). Najvišje vrednosti so poudarjene. A – vrednosti izračunane za vsako populacijo posebej, B – vrednosti za skupine populacij, določene v program BAPS.

Table 14: Allelic richness and private allelic richness after rarefaction (the standardized population size is marked with *), calculated by ADZE 1.0 (Szpiech in Jakobsoon, 2008). The highest numbers are highlighted. A – mean values for each population, B – mean values for groups of populations, determined according to BAPS.

		Alezno bogastvo			Privatno alelno bogastvo			
Populacija / skupina	Velikost populacije*	Srednja vrednost	Standardna napaka	Srednja vrednost	Standardna napaka			
A	BG	5	1,209	0,1165	0,04202	0,053	0,0351	0,02307
	BV	5	1,090	0,0667	0,03180	0,008	0,0038	0,00758
	CE	5	1,136	0,1196	0,04257	0,031	0,0298	0,02126
	CG	5	1,122	0,0834	0,03555	0,001	3,3522	0,00071
	GRC	5	1,102	0,0695	0,03245	0,006	0,0022	0,00583
	KR	5	1,147	0,1023	0,03938	0,022	0,0152	0,01519
	MK	5	1,195	0,1050	0,03988	0,002	0,0002	0,00181
	SM	5	1,210	0,1375	0,04564	0,013	0,0068	0,01013
	ST	5	1,273	0,2014	0,05524	0,050	0,0358	0,02331
	TG	5	1,126	0,0849	0,03586	0,010	0,0049	0,00859
	GRA	5	1,158	0,0850	0,03589	0,047	0,0296	0,02118
	ITA	5	1,091	0,0839	0,03566	0,006	0,0000	0,00573
	KP	5	1,082	0,0704	0,03265	0,007	0,0032	0,00696
B	BG	9	1,202	0,1142	0,03903	0,065	0,0371	0,02225
	BV, CG	9	1,174	0,0925	0,03512	0,011	0,0017	0,00472
	CE	9	1,133	0,1171	0,03952	0,040	0,0289	0,01962
	GRC, MK	9	1,195	0,0878	0,03422	0,016	0,0039	0,00718
	KR, SM, ST	9	1,242	0,0963	0,03583	0,039	0,0086	0,01069
	TG, ITA, KP	9	1,171	0,0906	0,03475	0,016	0,0157	0,00793
	GRA	9	1,201	0,1146	0,03909	0,052	0,0297	0,01991



Slika 16: Razporeditev alelnega bogastva (levo zgoraj), privatnega alelnega bogastva (desno zgoraj) in Neieve genetske diverzitete (spodaj) (zemljevid: P. Glasnović).

Figure 16: Distribution of allelic richness (top left), private allelic richness (top right) and Nei's gene diversity (map: P. Glasnović).

4.2.2 Genetske razdalje med populacijami

Neieva genetska razdalja meri, kako daleč narazen sta dve populaciji v n-dimenzionalnem prostoru, kjer vsako dimenzijo predstavlja variabilnost posameznega markerja (Lowe in sod., 2007). Vrednosti se gibljejo med 0 (popolna enakost) in 1 (popolna različnost). Neieve genetske distance za Blagajev volčin obsegajo vrednosti med 0,0237 in 0,1798. Najbolj oddaljeni pari populacij so CE-GRA (0,1798), CE-KP (0,1576), CE-BG (0,1558) in KP-BG (0,1529), najmanjšo genetsko razdaljo pa kažejo pari KR-SM (0,0237), TG-ITA (0,0275), GRC-MK (0,0404) in ITA-KP (0,0466).

Genetsko diferenciacijo smo izračunali kot Wrightov fiksacijski indeks (F_{ST}) ali razmerje med celotno genetsko diverziteto, ki se pojavlja med populacijami proti genetski diverziteti znotraj populacij. Genetsko diferenciacijo smo izračunali ob predpostavki, da je vrsta v Hardy-Weinbergovem ravnovesju (HWE) oz. da je prisoten popoln inbriding. Ob predpostavki HWE znaša vrednost F_{ST} 0,3994; ob popolnem inbridingu ($F_{IS} = 1$) pa 0,4418. Rezultati kažejo na prisotnost precejšnje genetske diferenciacije. Parni F_{ST} med populacijami kažejo vrednosti med 0,1278 in 0,5448. Najvišji parni F_{ST} so prisotni pri parih CE-KP (0,5448), KP-BV (0,5328) in KP-BG (0,5313), najmanjši pa pri parih KR-SM (0,1278), TG-ITA (0,1933) in GRC-MK (0,2237).

Preglednica 15: Populacijska genetska struktura izračunana v programu AFLPsurv (Vekemans, 2002). Hd – celotna genetska diverziteta, Hw – povprečna (mean) genetska diverziteta znotraj populacij (analogno Neievemu Hs), Hb - genetska diferenciacija med populacijami (analogno Nei's Dst), F_{ST} – Wrightov fiksacijski indeks.

Table 15: Population genetic structure calculated in the program AFLPsurv (Vekemans, 2002). Hd - total genetic diversity, Hw - average (mean) of genetic diversity within populations (analogous to Nei's Hs), Hb - genetic differentiation between populations (analogous to Nei's Dst), F_{ST} - Wright's fixation index.

n	Hd_N	Hd_I	Hw_N	Hw_I	Hb_N	Hb_I	Fst_N	Fst_I
12	0,2036	0,2004	0,1223	0,1120	0,0813	0,0884	0,3994	0,4418
S.E.			0,007896	0,005572	0,006707	0,007833	0,062438	0,055565
Var			0,000062	0,000031	0,000045	0,000061	0,003899	0,003088

Preglednica 16: Parni F_{ST} med populacijami, izračunani v programu AFLPsurv.

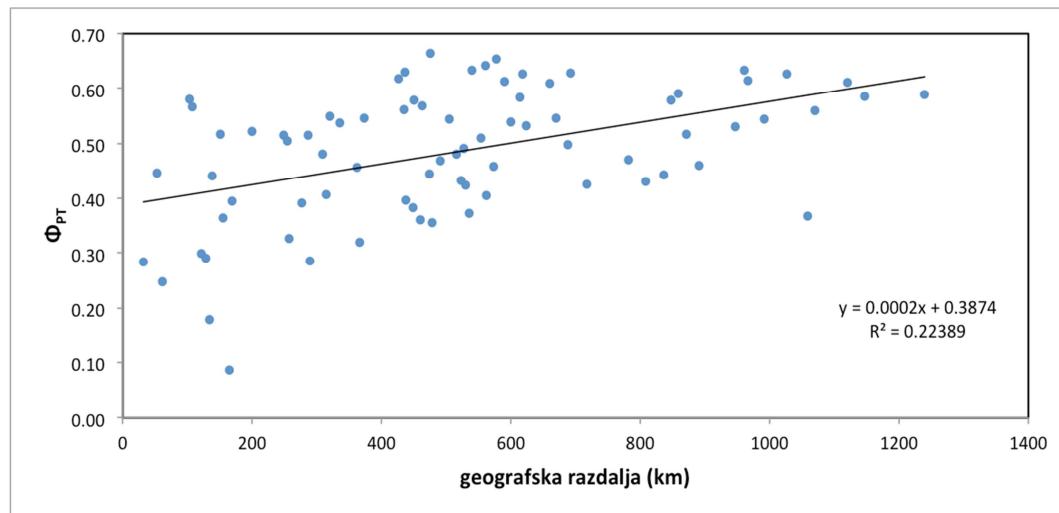
Table 16: Pairwise F_{ST} values between populations, calculated in the programme AFLPsurv.

	BG	BV	CE	CG	GRC	KR	MK	SM	TG	GRA	ITA	KP
BG	0,0000											
BV	0,3662	0,0000										
CE	0,4858	0,5075	0,0000									
CG	0,3874	0,3504	0,4748	0,0000								
GRC	0,4263	0,4523	0,4841	0,4218	0,0000							
KR	0,4177	0,4779	0,3930	0,4197	0,3018	0,0000						
MK	0,3151	0,2881	0,3890	0,3043	0,2237	0,2671	0,0000					
SM	0,3468	0,4320	0,3894	0,4215	0,3141	0,1278	0,2701	0,0000				
TG	0,4687	0,5231	0,5088	0,4299	0,4610	0,4961	0,3917	0,4223	0,0000			
GRA	0,3974	0,3935	0,4838	0,3146	0,3770	0,3434	0,3370	0,3246	0,3719	0,0000		
ITA	0,4283	0,4415	0,4593	0,3654	0,4108	0,4451	0,2571	0,3993	0,1933	0,3148	0,0000	
KP	0,5313	0,5328	0,5448	0,3561	0,4960	0,4419	0,3575	0,4535	0,3605	0,3346	0,2984	0,0000

Preglednica 17: Nejeva genetska razdalja (Lynch in Milligan, 1994), izračunana v programu AFLPsurv.

Table 17: Pairwise Nei's genetic distances between populacijami, calculated in the programme AFLPsurv.

	BG	BV	CE	CG	GRC	KR	MK	SM	TG	GRA	ITA	KP
BG	0,0000											
BV	0,0742	0,0000										
CE	0,1558	0,1329	0,0000									
CG	0,1018	0,0674	0,1452	0,0000								
GRC	0,1041	0,0885	0,1298	0,0996	0,0000							
KR	0,1096	0,1096	0,0960	0,1080	0,0543	0,0000						
MK	0,0771	0,0532	0,1057	0,0716	0,0404	0,0560	0,0000					
SM	0,0962	0,1118	0,1141	0,1317	0,0703	0,0237	0,0681	0,0000				
TG	0,1232	0,1175	0,1424	0,1018	0,0985	0,1264	0,0916	0,1135	0,0000			
GRA	0,1259	0,0986	0,1798	0,0840	0,0981	0,0913	0,0985	0,0994	0,0947	0,0000		
ITA	0,1082	0,0876	0,1205	0,0801	0,0834	0,1065	0,0502	0,1069	0,0275	0,0754	0,0000	
KP	0,1529	0,1148	0,1576	0,0697	0,1075	0,0949	0,0746	0,1237	0,0592	0,0759	0,0466	0,0000



Slika 17: Korelacija med Φ_{PT} in geografskimi razdaljami parov populacij Blagajevega volčina, izračunana v programu GenAlex (Peakall in Smouse, 2012).

Figure 17: Correlation between Φ_{PT} and geographic distances between pairs of populations of *Daphne blagayana* calculated in GenAlex (Peakall in Smouse, 2012).

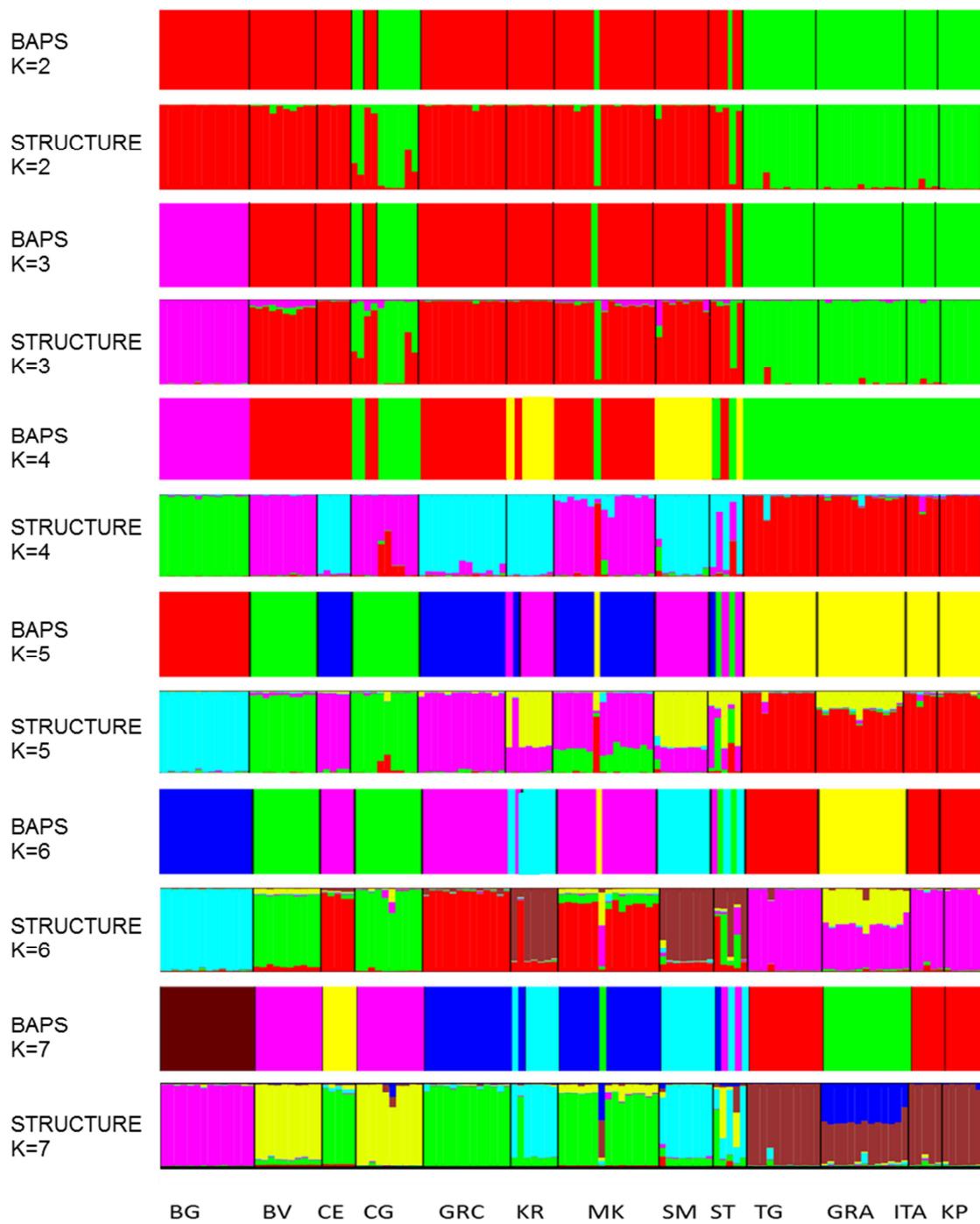
Mantelov test (Slika 17) je razkril pozitivno in signifikantno korelacijo med geografsko in genetsko razdaljo ($r = 0,4732$; $P = 0,001$) na celotnem arealu vrste, kar nakazuje izolacijo zaradi razdalje (angl. *isolation-by-distance*).

4.2.3 Genetska struktura

Program STRUCTURE je vzorce razdelil na dve skupini ($K = 2$; slika 18). V prvi skupini se nahajajo vsi vzorci iz slovenskih populacij (GRA, TG in KP) in iz italijanske populacije (ITA), poleg njih pa še iz vzorci iz Črne Gore. V drugi skupini pa se nahajajo vsi ostali vzorci. Program je vzorce razdelil na dve skupini ne glede na uporabljeni model (correlated / independent allele frequencies, admixture / no admixture model, LOCPRIOR).

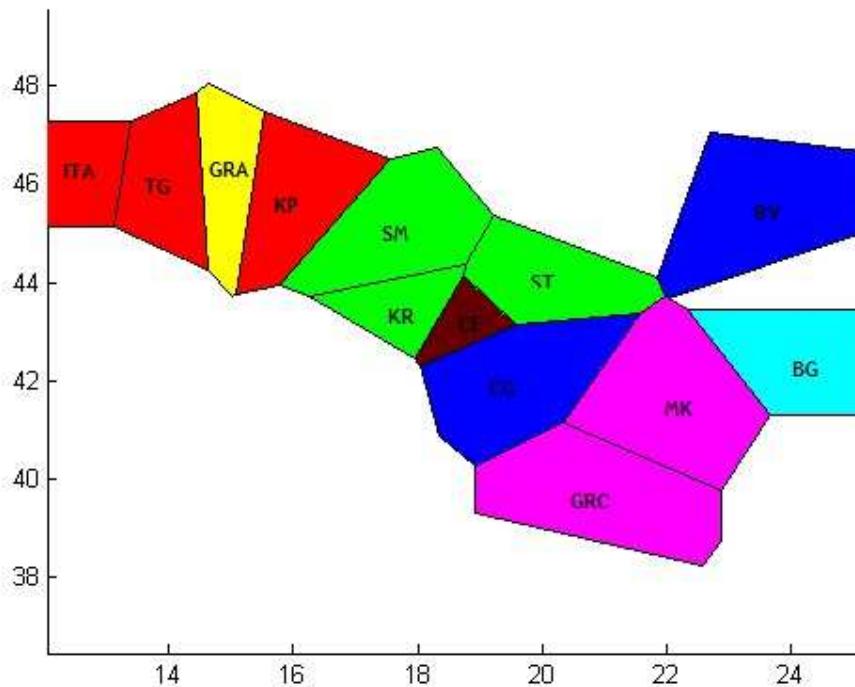
Program BAPS je podatkovni set razdelil v sedem skupin ($K = 7$; slika 18). Zaradi razlik v rezultatih prikazujemo primerjavo rezultatov z obema programoma. Razdelitev na skupine je pri $K = 2$ in $K = 3$ enaka pri obeh programih. Razlike se začnejo pojavljati pri $K = 4$, kjer program STRUCTURE grupira vzorce BV, CG in MK v eno skupino, vzorce CE, GRC KR, SM in deloma ST v drugo skupino, vse slovenske in italijanske vzorce v tretjo skupino in bolgarske vzorce v četrto skupino. Tudi program BAPS razvrsti bolgarske vzorce v ločeno skupino. Slovenske vzorce skupaj z vzorci CG grupira v drugo skupino, tretjo sestavlja vzorci KR, SM in deloma ST, zadnjo pa vsi ostali vzorci: BV, CE, GRC in MK. Pri $K = 5$ in $K = 6$ oba programa grupirata vzorce na enak način. Bolgarski vzorci so ločeni v prvi skupini, BV in CG v drugi skupini, CE, GRC in MK v tretji, KR in SM v četrtni. Pri $K = 6$ se med slovenskimi in italijanskimi vzorci ločijo vzorci GRA, ki jih programa uvrstita v novo skupino, medtem ko so pri $K = 5$ ti vzorci še grupirani v enotno skupino.

Pri $K = 7$ oba programa uvrstita vzorce BG v prvo skupino, vzorce BV in CG v drugo skupino, vzorce KR in SM v tretjo, vzorce TG, ITA in KP v četrto, vzorce GRA pa v peto skupino. Razlike nastanejo v strukturi zadnjih dveh skupin: program STRUCTURE grupira vzorce CE, GRC in MK v tretjo skupino, medtem ko program BAPS grupira posebej vzorce CE.



Slika 18: Populacijska struktura Blagajevega volčina določena z metodami na osnovi Bayesovega algoritma s programi STRUCTURE in BAPS za $K = 2-7$.

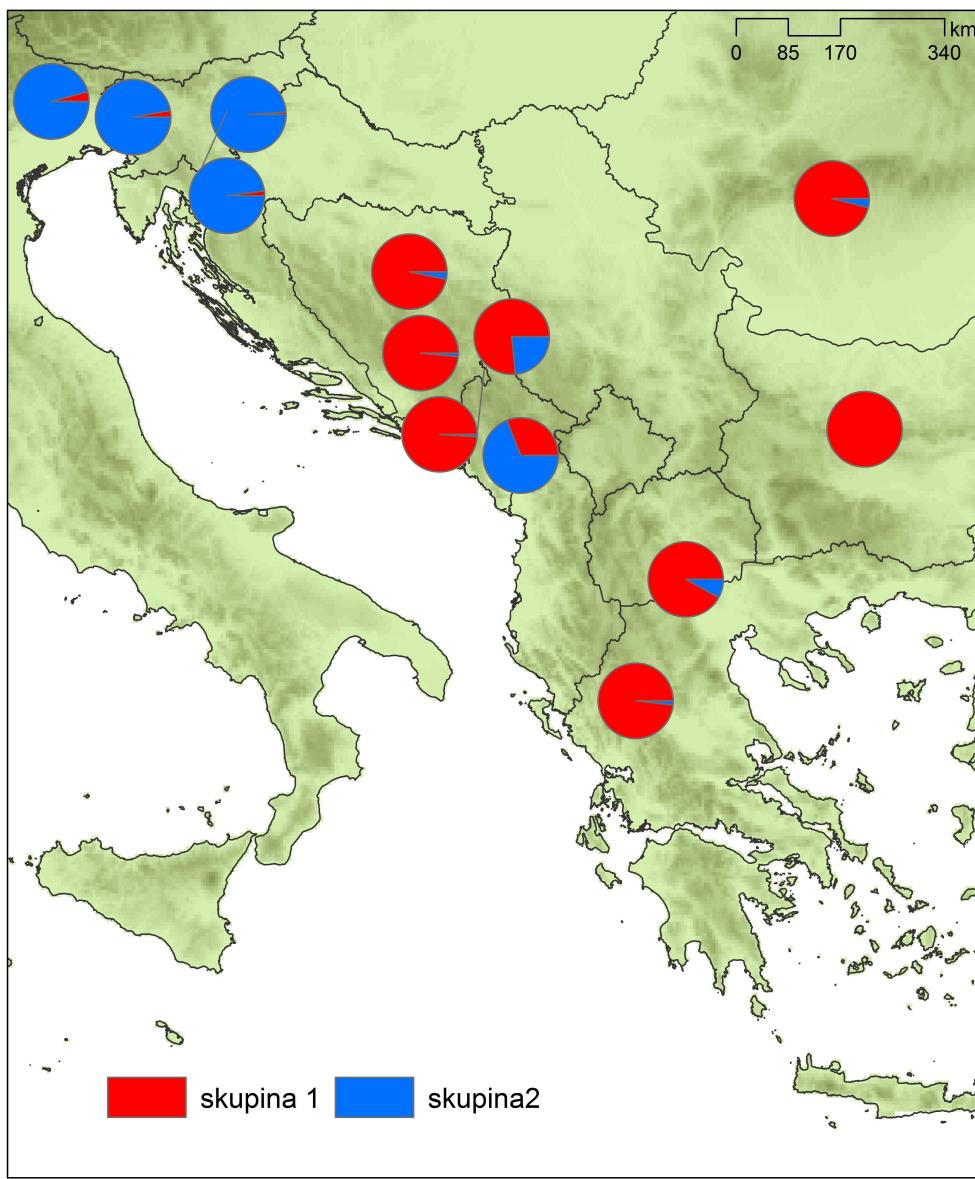
Figure 18: Population structure of *Daphne blagayana* according to Bayesian clustering analyses conducted in STRUCTURE in BAPS for $K = 2-7$.



Slika 19: Analiza prostorskega združevanja (angl. *spatial clustering*) na osnovi Bayesovega algoritma v programu BAPS (Corander in sod., 2008): Voronojev mozaični prostorski graf predstavlja sedem skupin označenih z različnimi barvami: i) rdeča: ITA (Italija), TG in KP (oba Slovenija), ii) rumena: GRA (Slovenija), iii) zelena: SM, KR in deloma ST (vsi BiH), iv) rjava: CE (BiH), v) temno modra: CG (Črna Gora), BV (Romunija) in deloma ST (BiH), vi) vijolična: GR (Grčija) in MK (Makedonije) in vii) svetlo modra: BG (Bolgarija).

Figure 19: Spatial clustering analysis based on Bayesian algorithm calculated in the programme BAPS (Corander in sod., 2008): Voronoi tessellation graph representing seven groups marked with different colors: i) red: ITA (Italy), TG and KP (both Slovenia), ii) yellow: GRA (Slovenia), iii) green: SM, KR and partly ST (all BiH), iv) brown: CE (BiH), v) dark blue: CG (Montenegro), BV (Romania) and partly by ST (BiH), vi) purple: GR (Greece) and MK (Macedonia) and vii) light blue: BG (Bulgaria).

BAPS analizo smo nadgradili s prostorskim modelom, ki vključuje koordinate vzorčnih mest in s tem povečuje zmožnost zaznavanja populacijske strukture. Analiza prostorskega združevanja je kot najbolj optimalno število skupin določilo $K = 7$.



Slika 20: Razporeditev populacij Blagajevega volčina v dve skupini, kot ju predлага program Structure na podlagi metode po Evannu. (zemljevid: P. Glasnović).

Figure 20: The distribution and subdivision of populations of *Daphne blagayana* into two groups, as proposed by the program Structure according to the Evanno method (map: P. Glasnović).

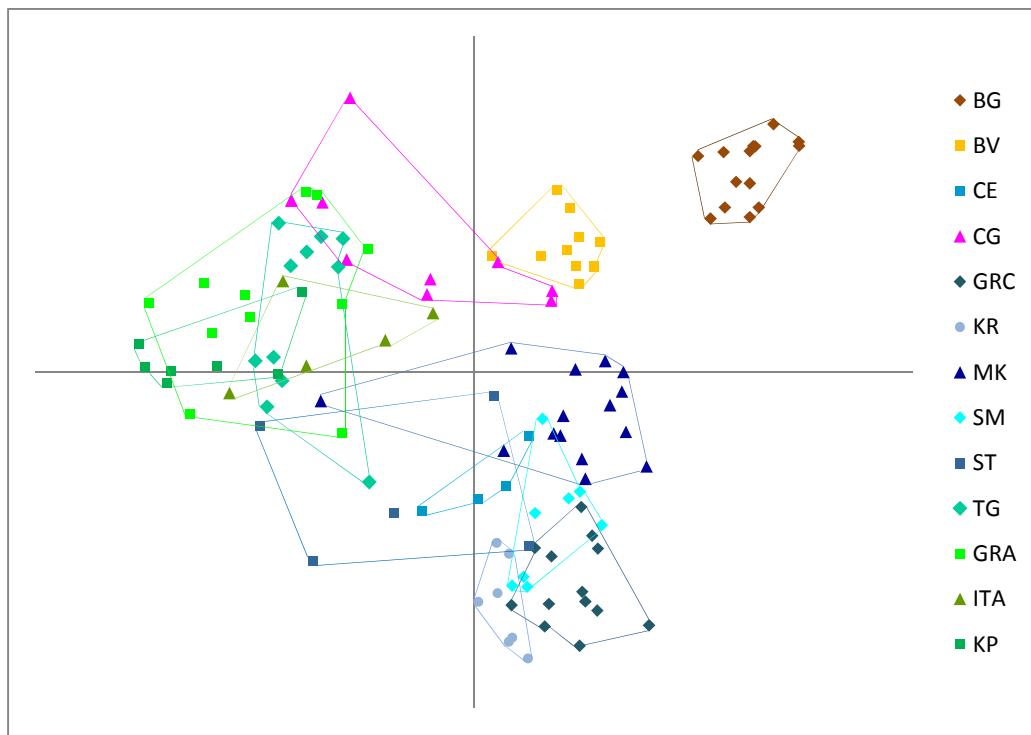
V PCoA se že ob upoštevanju prve osi 123 vzorcev razdeli v dve skupini (slika 21): prva skupina z najvišjimi vrednostmi prve osi ($\text{PCo 1} > 0,4$) vsebuje vzorce iz

bolgarske populacije (BG), vzorci iz vseh drugih populacij (PCo1 < 0,32) pa so razvrščeni v izrazitem postopu, od slovensko-italijanskih populacij (KP, GRA, TG, ITA) prek populacij iz Bosne in Hercegovine in Črne Gore (CE, KR, CG, ST, SM) do najbolj JV populacij (BV, MK, GR). Vzdolž druge osi se z manjšim prekrivanjem vzorci iz Bolgarije še nadalje ločijo od preostalih populacij, preostale JV populacije pa si vzdolž te osi sledijo v postopu v smeri sever-jug (BV, MK, GR). Skupaj 102 osi pojasnita celotno genetsko varianco, od tega prva in druga os pojasnita po 12,14 % in 8,86 % skupne variance, tretja os pa dodatnih 7,26 % (preglednica 18).

Preglednica 18: Rezultati analize glavnih koordinat (PCoA); seznam prvih treh osi (PCo 1–3) z lastnimi vrednostmi, odstotki pojasnjene variance ter kumulativnimi odstotki pojasnjene variance.

Table 18: Results of the principal coordinate analysis (PCoA); list of the first three axes (PCo 1-3) with eigenvalues, percentage of explained variance and cumulative percentage of explained variance.

Os	PCo1	PCo2	PCo3
Lastna vrednost	11,509	8,401	6,877
Odstotek pojasnjene variance	12,14	8,86	7,26
Kumulativni odstotek pojasnjene variance	12,14	21,01	28,26



Slika 21: Projekcija vzorcev 123 rastlin Blagajevega volčina vzdolž prvih dveh osi v analizi primarnih koordinat (PCoA), izdelani v programu GenAlex. Prva os pojasni 11,5 % in druga os 8,4 % skupne genetske variabilnosti.

Figure 21: The projection of 123 samples of *Daphne blagayana* along the two primary axes in the Principal coordinate analysis (PCoA) drawn in the programme GenAlex. The first and the second axes explain 11.5 and 8.4% of the total genetic variability, respectively.

4.2.4 Analiza molekularne variance (AMOVA)

Stopnjo genetske diferenciacije med populacijami smo ocenili z analizo molekularne variance (AMOVA), s katero smo ocenili varianco na treh nivojih: znotraj vzorčenih populacij, med vzorčenimi populacijami ter med 7 skupinami, ki jih predlaga program BAPS. Rezultati kažejo, da se večina genetske variabilnosti pojavlja znotraj populacij (49 %), med populacijami znaša 22 %, med skupinami pa 29 % (preglednica 19). Analizo smo izvedli tudi za različne kombinacije skupin (skupine, ki jih predlaga BAPS med $K = 2-7$), pri čemer je variabilnost znotraj populacij vedno večja od variabilnosti med populacijami (podatki niso prikazani).

Preglednica 19: Analiza molekularne variance Blagajevega volčina na podlagi rezultatov AFLP. df – stopinje prostosti, SS – vsota kvadratov, MS – srednji kvadrat / varianca, Est. Var. – ocena genetske variance, % – odstotek variance

Table 19: Analysis of molecular variance of *Daphne blagayana* based of AFLP results. df – degrees of freedom, SS – sum of squares, MS – mean square, Est. Var. – genetic variance estimates, % – proportion of variance

	df	SS	MS	Est. Var.	%
Med skupinami	6	352,371	58,728	2,230	29
Med populacijami	6	108,152	18,025	1,667	22
Znotraj populacij	110	406,930	3,699	3,699	49
Skupno	122	867,452		7,597	100

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Kljub hitremu razvoju molekularnih tehnik v zadnjih desetletjih in naraščajočemu številu raziskav na področju filogeografije in populacijske genetike rastlin, so tovrstne raziskave na Balkanskem polotoku razmeroma redke. Balkanski polotok velja poleg Iberskega in Apeninskega polotoka za enega izmed treh pomembnejših območij ledenodobnih refugijev Evrope. Zaradi različne orientiranosti gorstev v teh treh refugijalnih območjih (na Balkanskem polotoku poteka v smeri jugovzhod-severozahod, na Apeninskem in Iberskem otoku pa v smeri vzhod-zahod) je bila kolonizacija Evrope iz treh refugijev različna. Številne filogeografske študije so pokazale na kolonizacijo osrednje Evrope iz Balkanskega območja refugijev, čeprav so bile poti širjenja za različne organizme zelo različne.

Prisotnost treh glavnih glacialnih refugijev v južni Evropi podpirajo palinološki podatki in paleoklimatske rekonstrukcije. Vse večje število filogeografskih študij na različnih rastlinskih in živalskih skupinah s teh območij pa je pokazalo, da kažejo nekatere vrste tudi znotraj refugijev močno genetsko strukturo. To pomeni, da so tudi znotraj treh refugijev obstajale izolirane populacije, kar je vodilo v novo interpretacijo filogeografije, kjer igra pomembno vlogo koncept »refugiji znotraj refugija«. Izoliranost populacij, ki je postopoma vodila v genetsko separacijo, je večinoma posledica geoloških in klimatskih diskontinuitet (Grassi in sod., 2009). Visoka diverziteta znotraj južnih refugijev je po predpostavki refugijev znotraj refugija posledica alopatrične diferenciacije ločenih populacij, ki kažejo nizko znotrajpopulacijsko, a močno medpopulacijsko diverzitet. Tak vzorec kažejo na primer *Saxifraga callosa* Sm. ex Dicks. na Apeninskem polotoku (Grassi in sod., 2009), bukev (*Fagus sylvatica* L.) (Brus, 2010) ter *Edraianthus tenuifolius* A.DC. in *E. serpyllifolius* (Vis.) A.DC. na Balkanskem polotoku (Surina in sod., 2011) ali vednozeleni hrasti (*Quercus suber* L., *Q. ilex* L. in *Q. coccifera* L.) na Iberskem polotoku (López de Heredia in sod., 2009).

Seveda pa omenjena tri refugialna območja niso edini obstoječi ledenodobni refugiji v Evropi. Med pomembnejše refugije za bukev spada območje današnje Slovenije, južne

Francije in Češke. Na teh območjih je evoluirala izvorna populacija in se nato razširila v osrednji Evropi, medtem ko trije južni polotoki niso prispevali k širjenju bukve na severu (Magri in sod., 2006). Omejena območja v severni Evropi, kjer se je zaradi lokalne topografije ohranjala stabilna mikroklima (Stewart in Lister, 2001), imenujemo kriptični refugiji.

Varstvena genetika ponuja nov vpogled v varovanje vrst in postaja vedno bolj nepogrešljivo orodje pri upravljanju z ogroženimi vrstami ter pri načrtovanju varstvenih akcij. V disertaciji smo predstavili filogeografsko analizo in populacijsko genetsko strukturo Blagajevega volčina (*Daphne blagayana*), rastlinske vrste z razširjenostjo, omejeno predvsem na Balkanski polotok. Pridobljeni podatki prispevajo k razumevanju razširjenosti in potencialne ogroženosti vrste in bodo lahko prispevali k uspešnejšemu varovanju populacij v primeru, ko bi prišlo do večjih sprememb o okolju. Poleg uničevanja habitatov, ki mu botrujejo predvsem dejavnosti človeka, predstavlja eno izmed groženj tudi globalno segrevanje ozračja, saj je Blagajev volčin prilagojen na uspevanje v hladnejših predelih.

5.1 UPORABA MONONUKLEOTIDNIH MIKROSATELITOV KLOROPLASTNE DNA V FILOGEOGRAFSKIH RAZISKAVAH

Čeprav sodi kloroplastna DNA med najpogosteje uporabljene markerje v filogeografskih in filogenetskih raziskavah rastlin, je stopnja substitucij znotraj kloroplastnega genoma približno desetkrat nižja kot v živalskem mitohondrijskem genomu. Razmerje med stopnjo substitucije pri mitohondrijski, kloroplastni in jedrni DNA rastlin znaša približno 1:3:12 (Li, 1997). Med najpogostejšimi oblikami mutacij kloroplastne DNA so mononukleotidni mikrosateliti.

Kljub temu, da se študije, ki temeljijo na kloroplastnih mikrosatelitih, pojavljajo že približno 20 let (na primer Powell in sod., 1995; Provan in sod., 2001), večina filogeografskih raziskav mononukleotidne ponovitve (poli-A in poli-T) izloča iz raziskav zaradi možnih napak pri sekvenciranju, napak pri branju nukleotidnih zaporedij ali zaradi suma na homoplazijo. Jakobsson in sod. (2007) so na primeru

modelne vrste *Arabidopsis thaliana* znotraj 60 različnih odsekov kloroplastne DNA določili 244 mest s ponovitvami, daljšimi od 5 bp. Med njimi je bilo kar 235 mononukleotidnih ponovitev in le 9 dinukleotidnih ali daljših ponovitev. Pokazali so, da zaporedja dolžine med 5 in 6 bp ne kažejo variabilnosti; ta se začne pojavljati pri lokusih dolžine ≥ 7 bp in narašča do dolžine 12 bp. Pri zaporedjih, daljših, od 12 bp, so variabilni skoraj vsi lokusi.

Na podlagi študije Jakobssona in sod. (2007) lahko sklepamo, da uporaba mononukleotidnih mikrosatelitov zmanjšuje zanesljivost rezultatov, kadar gre za daljše ponovitve (nad 12 bp). Pri krajših ponovitvah pa lahko ta zaporedja predstavljajo doprinos k variabilnosti relativno ohranjenih kloroplastnih regij.

V analizi petih kloroplastnih odsekov Blagajevega volčina v skupni dolžini 3512 bp smo zaznali 8 variabilnih mononukleotidnih zaporedij (poli-A oz. poli-T). Vsa variabilna zaporedja so bila dolga najmanj 7 bp, kar potrjuje rezultate Jakobssona in sod. (2007), da se variabilnost mononukleotidnih odsekov začne pri dolžini 7 bp. Le dve izmed regij imata dolžino nad 12 bp. Zanimiva je poli-A regija v medgenskem vmesniku *psbA-trnH*, ki obsega dolžine 10, 11, 12, 14, 15 in 23 bp. Glede na model postopnih mutacij (angl. *stepwise mutation model* - SMM; Ohta in Kimura, 1973) lahko predvidevamo, da je v zaporedju prišlo do postopnega kopiranja adeninov. Pri tem se nam poraja vprašanje, ali bi na ta način lahko sledili populacijski dinamiki vrste v preteklosti. V tem primeru bi bilo smiselno primerjati, ali se vzorec ponavlja tudi pri drugih mononukleotidnih mikrosatelitih, predvsem pri tistih, ki kažejo veliko variabilnost v številu mononukleotidnih ponovitev.

Zaradi večinskega mnenja raziskovalcev, ki zagovarjajo izključitev mononukleotidnih mikrosatelitov iz analiz, smo se tudi v naši raziskavi odločili, da mononukleotidnih mikrosatelitov ne bomo vključili v analize. Izjemo smo naredili le pri analizi haplotipov, kjer smo mononukleotidne mikrosatelite vključili, ko smo analizirali posamezne odseke kloroplastne DNA. Prav tako smo poli-A/T zaporedja vključili v analizo haplotipov, v kateri smo združili vseh pet odsekov in dobljeno mrežo haplotipov primerjali z mrežo haplotipov, iz katere smo poli-A/T zaporedja izključili. Bistvene razlike v strukturi mrež haplotipov niso opazne.

5.2 NEUSKLAJENOST FILOGEOGRAFSKIH VZORCEV PRI KLOROPLASTNIH IN JEDRNIH MARKERJIH

Organelni genomi prinašajo nov hierarhični vpogled v populacijsko genetiko. Jedrni genom diploidnih organizmov se v vsaki somatski celici nahaja v dveh kopijah, od katerih se na potomce prenese po ena kopija z vsakega od staršev. Mitohondrijski in kloroplastni genom, oba haploidna, se v celicah nahajata v več kopijah, zaradi prisotnosti le enega alela v celici oz. organizmu pa je rekombinacija odsotna. Način prenosa organelnih genomov (po materini ali očetovi liniji ali po obeh) močno vpliva na populacijsko strukturo vrste. Zaradi haploidnosti je efektivna velikost populacije za organelne genome manjša kot za jedrni genom.

Številne raziskave so pokazale, da uporaba različnih markerskih sistemov ne pripelje nujno do odkritja enake genetske strukture vrste. Ker se kloroplastna DNA deduje enostarševsko (po materini liniji pri večini cvetnic) preko semen, ki se širijo preko kratkih razdalj, ponavadi pri njej zaznamo močnejšo genetsko diferenciacijo, medtem ko kaže jedrna DNA zaradi biparentalnega načina dedovanja šibkejšo diferenciacijo. Kljub temu so raziskave pokazale, da lahko jedrni markerji zaznajo prisotnost dodatnih prepoznavnih skupin, ki jih kloroplastna DNA ne detektira (Heuertz in sod., 2004; Magri in sod., 2006). Uporaba različnih genetskih markerjev (na primer kloroplastne oz. mitohondrijske DNA in jedrne DNA) je tako izjemnega pomena pri določanju filogeografske strukture.

Če obstaja genski pretok med populacijami, bo ta pri jedrni DNA (ki se prenaša tako preko peloda kot preko semen) vplival na zmanjševanje genske divergence populacij. Genski pretok pri kloroplastni DNA, ki se pri večini kritosemenk deduje po materini strani, pa je odvisen samo od prenosa semen. Nedvoumen genetski signal lahko pričakujemo samo takrat, ko obstaja dolgotrajna izolacija med populacijami.

Tudi pri Blagajevem volčinu, kot na primer pri jesenu (Heuertz in sod., 2004) ali bukvi (Magri in sod., 2006), kloroplastna DNA in AFLP (ki ga lahko upoštevamo kot jedrni marker) ne kažeta popolnoma enakega filogeografskega vzorca. Analiza molekularne

variance AMOVA je pokazala, da kaže kloroplastna DNA veliko močnejšo genetsko strukturo kot AFLP, kar so dokazale tudi druge študije na različnih rastlinskih vrstah (npr. Naydenov in sod., 2005).

Oba markerska sistema kažeta, da so vzorci iz Slovenije in Italije jasno ločeni od ostalih vzorcev. Predvidevamo, da je v preteklosti prišlo do fragmentacije populacij med severnim in osrednjim Balkanom in je od takrat genski pretok med tem skupinama prekinjen. Slovenska skupina kaže veliko manjšo haplotipno raznovrstnost (25,7 %) kot osrednja Balkanska skupina (82,1 %), kar bi lahko nakazovalo obstoj genetskega zdrsa nekoč v preteklosti. Populacije so verjetno ostale izolirane in zaradi majhnosti je naključna izguba alelov lahko vplivala na njihov genetski makeup. Analiza neskladja nakazuje možnost nedavne populacijske ekspanzije v Sloveniji, ki bi lahko sčasoma privedla do nastanka novih haplotipov (ob upoštevanju poli-A/T regij), ki se v slovenskih populacijah skoraj ne mešajo (v populacijah se pojavljajo edinstveni haplotipi, značilni za posamezne populacije). Glede na to, da se mutacije v slovenskih in italijanski populaciji pojavljajo predvsem v obliki poli-A/T zaporedij, to dodatno podpira možnost recentne ekspanzije na tem območju, ki je morda potekala iz enega ali več bližnjih lokalnih ledenodobnih refugijev. Mutacije v kloroplastnih mononukleotidnih mikrosatelitih (zlasti pri dolzinah ≥ 12 bp) se kopijo hitreje kot druge mutacije (npr. substitucije), zato lahko pri populacijah, ki vsebujejo daljše mononukleotidne mikrosatelite, pričakujemo večje število haplotipov, kar je razvidno tudi iz slovenskih vzorcev.

Vzorci iz Gračnice se glede na rezultate analize AFLP razlikujejo od ostalih, saj so prepoznani kot samostojna skupina, ki jo predlaga program BAPS, medtem ko so kloroplastni haplotipi, ki se pojavljajo v populaciji iz Gračnice, prisotni tudi v nekaterih drugih populacijah. Razporeditev slovenskih in italijanskih populacij v enotno skupino nakazuje odsotnost genskega pretoka tako na nivoju semen kot tudi peloda, saj oba markerska sistema kažeta enak filogeografski vzorec.

Neusklenjenost filogeografskega vzorca je očitna pri bolgarski populaciji, ki jo glede na AFLP tako program BAPS kot tudi program STRUCTURE zaznata kot samostojno skupino, medtem ko so glede na kloroplastno DNA ti haplotipi uvrščeni v skupino

osrednjega Balkana. Populaciji iz Grčije in Makedonije sta glede na AFLP uvrščeni v isto skupino, kar sovpada tudi z geografsko bližino. Ena od možnih razlag je, da je pri teh dveh populacijah prihajalo do občasnega prenosa peloda, čeprav je razdalja med njima razmeroma velika (več kot 150 km). Kloroplastna DNA po drugi strani ti dve populaciji uvršča v različna klastra, makedonske vzorce v klaster južnega Balkana, grške pa v osrednji klaster. Prenos semen, v katerih se prenaša jedrna DNA, je bolj učinkovit na krajše razdalje, medtem ko je prenos cvetnega prahu (in z njim kloroplastne DNA) omogočen na daljše razdalje.

Iz tega lahko sklepamo, da je bil Blagajev volčin v preteklosti na Balkanskem polotoku splošno razširjen, njegovo preživetje tekom ledenih dob je bilo zajeto znotraj refugijev Balkanskega polotoka (t.i. refugiji znotraj refugija). Velike divergence posameznih skupin lahko po eni strani pripisemo dolgotrajni geografski in klimatski izolaciji - Naydenov in sod. (2005) na primer v raziskavi rdečega bora (*Pinus sylvestris* L.) v Bolgariji kot ključen razlog za populacijsko diferenciacijo znotraj omejenega prostora omenjajo topografijo in visoke nadmorske višine med razvodji tekom glacialne depresije, kar je onemogočilo genski pretok med populacijami - ter dodatno še morebitnemu prehodu na vegetativni način razmnoževanja, do katerega lahko pride, ko vrsta v določenem habitatu ne dosega svojega ekološkega optimuma.

5.3 GENETSKA DIVERZITETA POPULACIJ IN POVEZAVA Z NAČINOM RAZMNOŽEVANJA

Genetska diverziteta, alelno bogastvo in privatno alelno bogastvo pri populacijah Blagajevega volčina ne kažejo konsistentnega vzorca vzdolž linije sever-jug ali vzhod-zahod. Tablerlet in sod. (1998) so v primerjalni filogeografski študiji desetih evropskih živalskih in rastlinskih vrst pokazali, da imajo južnejše populacije ponavadi višjo genetsko diverziteto in alelno bogastvo. Hewitt (1996) je ta trend, ki naj bi veljal na regionalni ravni, imenoval »južno bogastvo napram severni čistosti« (angl. »southern richness vs. northern purity«)³. Petit in sod. (2003) so pokazali, da trend ne velja na

³ Trend je bil opisan pri številnih drevesnih in grmovnih vrstah zmernega pasu, katerih južna meja areala sega v sredozemski prostor.

znotrajpopulacijskem nivoju, saj imajo lahko celo bližnje populacije zelo različno genetsko strukturo. Vendar omenjeni trend »južnega bogastva napram severni čistosti« ne drži zmeraj in je lahko tudi drugačen. Tako so na primer Grdiša in sod. (2014) pokazali, da sta pri vrsti *Tanacetum cinerariifolium*, razširjeni vzdolž vzhodne jadranske obale, vrednosti genetske diverzitete in privatnih alelov višji pri severnejših populacijah, kar razlagajo s potencialno recentnejšim izvorom južnih populacij.

Pri Blagajevem volčinu lahko zaznamo nižjo genetsko diverziteto, alelno bogastvo in privatno alelno bogastvo pretežno v bolj robnih populacijah (npr. ITA, TG, KP, BG in GRC), medtem ko imajo populacije iz osrednjega dela areala ponavadi višjo vrednosti teh parametrov. Populacije z visoko genetsko diverziteto imajo ponavadi visoko alelno in privatno alelno bogastvo in obratno. Izjema sta makedonska in črnogorska populacija, ki kljub razmeroma visoki genetski diverziteti kaže nizko privatno alelno bogastvo.

Bolgarska populacija kljub svoji geografski izoliranosti kaže visoke vrednosti vseh treh parametrov; zlasti pa privatnega alelnega bogastva, ki je najvišje od vseh analiziranih populacij. Visoko število privatnih alelov / alelno bogastvo je pričakovano v populacijah z omejenim genskim pretokom, medtem ko imajo vrste z visokim genskim pretokom nizko alelno bogastvo. Pri bolgarski populaciji, ki kaže najvišje alelno bogastvo, lahko to torej razlagamo z izoliranostjo in omejenim genskim pretokom.

Rastline kažejo izjemno raznolikost v strategijah razmnoževanja, ki so vezane bodisi na okoljske dejavnike, bodisi na genetsko predispozicijo vrste. Vegetativno ali klonsko razmnoževanje je razmeroma pogost in evolucijsko star pojav pri rastlinah (Mogie in Hutchings, 1990), saj ima za rastline določene prednosti, na primer zmožnost hitrega povečanja populacije, mobilnost ali zmanjšanje »stroškov« zaradi redukcije organov, ki sodelujejo pri spолнem razmnoževanju (Silvertown in Charlesworth, 2001). Redukcija spолнega razmnoževanja pri rastlinah je še posebno pogosta pri populacijah, ki živijo na robu svojega areala (Eckert, 2011). Tudi zmožnost samooploditve ima za rastline prednosti, zlasti ko so rastline izolirane in med njimi težko pride do stika

(navzkrižne opašitve). Hkrati pa ima samooploditev za posledico genetsko uniformnost in s tem ranljivost ob pojavu naključnih dogodkov, na primer bolezni.

Blagajev volčin izkazuje oba načina razmnoževanja, tako spolno kot vegetativno. Z izjemo diplomske naloge iz 50ih let 20. stoletja (Brunsteiner, 1957), v kateri je opisano razmnoževanje Blagajevega volčina v Sloveniji, pa so podatki o načinu razmnoževanja skopi. Posamezni avtorji omenjajo odsotnost (Costalonga in Bruna, 2006; Martini in Poldini, 1990; Brunsteiner, 1960) ali prisotnost (Jeglič, 1963) spolnega razmnoževanja v določenih populacijah. Različni načini razmnoževanja v različnih populacijah iste vrste so pogosti (Wang in sod., 2004), spreminja se v času in so najverjetneje posledica okoljskih dejavnikov.

Ocenjevanje stopnje klonskega razmnoževanja pri rastlinah ni enostavno. Ker lahko vrste prehajajo od spolnega k vegetativnemu načinu razmnoževanja in obratno, za merilo ne moremo uporabiti zgolj genetske variabilnosti populacij; vrste, ki se danes na primer razmnožujejo vegetativno, v preteklosti pa so se spolno, lahko kažejo visoko genetsko diverziteto. Tudi samo občasna tvorba semen lahko pomembno vpliva na genetsko diverziteto populacije. Na ta način Bauert in sod. (2007) na primer razlagajo visoko stopnjo genetske variabilnosti danes klonske vrste *Saxifraga cernua*. Pri vrsti *Cladium jamaicense*, ki ima sposobnost spolnega in vegetativnega razmnoževanja, so Ivey in Richards (2001) odkrili nizko stopno variabilnosti v primerjavi z drugimi rastlinami v njihovi okolici. Le ena od 18 populacij je bila monomorfna, pri ostalih so rastline kazale več kot en genotip; različni genotipi pa so bili v večini primerov prisotni že na površini 1 m². Balloux in sod. (2003) ocenjujejo, da mešanih populacij, pri katerih je prisotno tako spolno kot klonsko razmnoževanje, praktično ne moremo razlikovati od subpopulacij, ki se razmnožujejo striktno spolno.

Genetska diverziteta Blagajevega volčina je nizka ($H_e = 0,088\text{--}0,170$), vendar nobena analizirana populacija ni monomorfna. Kljub temu, da smo popolnoma enake AFLP genotipe zasledili le pri nekaterih vzorcih iz populacij CG, CE in GRA, ravno te populacije presenetljivo kažejo visoke vrednosti Neieve genetske diverzitete ($H_e(CG) = 0,131$; $H_e(CE) = 0,130$; $H_e(GRA) = 0,170$) v primerjavi z drugimi populacijami.

Populacija TG, ki je po velikosti populacije najmanjša izmed vzorčenih populacij (lastno opažanje) in pri kateri smo ob nabiranju opazili skoraj popolno odsotnost cvetenja, sicer kaže nizko genetsko variabilnost ($He = 0,098$), vendar kažejo podobno ali še nižjo genetsko variabilnost populacije BV ($He = 0,086$), KP ($He = 0,088$), GRC ($He = 0,104$) in ITA ($He = 0,106$), pri katerih je cvetenje prisotno. Zaradi zgoraj omenjenih dejstev genetske diverzitete ne moremo neposredno povezovati z načinom razmnoževanja.

5.4 GENSKI PRETOK MED POPULACIJAMI

Genski pretok je prenos alelov med populacijami preko migrantov in diaspor. Stopnja širjenja diaspor se z razdaljo zmanjšuje, zato ponavadi genetska razlika narašča z razdaljo, kar opisujemo s pojmom »izolacija zaradi razdalje« (angl. *isolation by distance*).

Mantelov test, ki prikazuje korelacijo med Φ_{PT} in geografskimi razdaljami parov populacij Blagajevega volčina, potrjuje, da je prisotna izolacija zaradi razdalje. To je sicer pričakovan pojav pri vrstah, ki obsegajo večji areal in pri katerih je disperzija omejena, čemur Blagajev volčin ustreza. Nasprotno pa izolacije zaradi razdalje ne pričakujemo pri vrstah, ki imajo velik disperzijski potencial in kjer so razdalje med populacijami kratke, čeprav lahko populacije kažejo izolacijo zaradi razdalje tudi na kratke razdalje (pri endemični travi *Arctophyla fulva* var. *pendulina* z obale Baltskega morja se izolacija kaže na primer že pri razdaljah večjih od 1 km (Kreivi, 2005)).

Genetska diferenciacija je pri Blagajevem volčinu visoka ($F_{ST} = 0,4$), kar nakazuje izoliranost posameznih populacij in omejen genski pretok med njimi. Parni F_{ST} pa presenetljivo niso nujno največji med geografsko najbolj oddaljenimi populacijami; največji parni F_{ST} se pojavljajo med pari CE in (TG, KP, BV), BV in (KP, TG) ter KP in BG.

Tudi rezultati analize AMOVA kažejo na precejšnjo diferenciacijo med populacijami. Na podlagi AFLP se približno polovica variabilnosti pojavlja znotraj populacij, polovica pa med populacijami; če dodamo še nivo skupin populacij, ta doseže diferenciacija med skupinami 29 %. Kloroplastna DNA kaže v primerjavi z AFLP

izjemno majhno variabilnost znotraj populacij (okoli 5 %). Velike razlike v vrednostih pri obeh markerskih sistemih lahko razložimo z načinom prenosa kloroplastne oz. jedrne DNA in njegovim vplivom na diferenciacijo populacij, ki ga omenjamo v podpoglavlju 5.2.

5.5 RAZREŠEVANJE TAKSONOMSKIH NEJASNOSTI IN NARAVOVARSTVENE IMPLIKACIJE

Taksonomske kategorije pod nivojem vrste predstavljajo že desetletja predmet razprav. V preteklosti so bile skupine sorodnih osebkov, ki se geografsko izključujejo, opredeljene bodisi kot vrste ali kot nižje taksonomske enote, na primer podvrste, varietete ali forme (Mallet, 2007). Medtem ko se je v zoologiji v začetku 20. stoletja kot edina veljavna taksonomska kategorija pod nivojem vrste uveljavila kategorija geografske podvrste, se v botaniki še vedno uporabljajo (in so po Kodeksu botanične nomenklature veljavne) tudi druge kategorije. Hamilton in Reichard (1992) ugotavljata, da se v botaniki najpogosteje uporabljeni podvrstni katergoriji (podvrsta in varietetata) uporabljata za isto kategorijo, pri čemer ameriški taksonomi uporabljajo večinoma kategorijo varieteta, ostali (tudi evropski) pa podvrsta. V nasprotju s podvrsto in varieteto, ki naj bi do neke mere predstavljali koherentno evolucijsko podskupino (z geografsko, ekološko in/ali filogenetsko poripadnostjo), forma vključuje edinstvene fenotipe, ki pa se ne ohranjajo znotraj populacij (Cronquist, 1988). Kot ekstremen primer veljavnega botaničnega imena lahko navedemo primer kamnokreča *Saxifraga aizoon* var. *aizoon* subvar. *brevifolia* f. *multicaulis* subf. *surculosa* (Mallet, 2007).

V nasprotju z zoološko botanična podvrsta ne odraža nujno geografske omejenosti. Oba kodeksa, botanični in zoološki, sicer ne zapovedujeta, v katero kategorijo naj se uvrsti posamezna prepoznavna populacija, temveč se osredotočajo le na pravila poimenovanja, ko je odločitev o taksonomski kategoriji sprejeta (Mallet, 2007).

Čeprav se je koncept podvrste s časom spremenjal, je veljavnost podvrste kot taksonomske enote podvržena kritikam že od sredine 20. stoletja (Burbrink, 2000). V

preteklosti koncept podvrste ni zavzemal evolucijske komponente (Mayr, 1942), temveč je šlo zgolj za osebke, ki se morfološko nekoliko razlikujejo od ostalih osebkov iste vrste. V današnjem času je v uporabi razlaga, da so podvrste skupine populacij znotraj vrste, ki zasedajo geografsko opredeljeno območje ali habitat in se od ostalih populacij razlikujejo v več genetskih značilnostih. Gre za skupine populacij, ki so v evolucijskem procesu nastajanja novih vrst (ang. *incipient species*).

Zaradi bolj subjektivnega uvrščanja v različne taksonomske kategorije v preteklosti je uporaba genetskih metod v današnjem času razkrila, da številne podvrste ne kažejo nikakršne filogenetske različnosti, zato je ta klasifikacija (če upoštevamo evolucijsko komponento) vprašljiva za številne taksonome, ki so bili prepoznani v preteklosti.

Pravilna opredelitev taksonomskega statusa ni pomembna samo z vidika poznavanja odnosov med taksoni, temveč ima tudi praktični pomen v varstveni biologiji. Ob nepravilni opredelitvi statusa lahko pride do sprejemanja napačnih upravljavskih odločitev, bodisi da nekatere vrste (ali podvrste) niso prepoznane in tako niso vključene v sistem varovanja, bodisi se varovanje osredotoča na nepravilno definirane taksonome, za katere varstvo ne bi bilo potrebno (Frankham in sod., 2012). Takim nepravilnostim se lahko izognemo, če kot osnovno enoto varstva uporabimo evolucijsko pomembne enote - to so populacije, ki so genetsko ločene od ostalih populacij in tako zahtevajo ločeno genetsko upravljanje (kar v mnogih primerih, ne pa nujno, ustreza konceptu podvrste).

O morebitni znotrajvrstni diferenciaciji Blagajevega volčina ni veliko zapisov. V literaturi se omenjajo tri podvrste: subsp. *lerchenfeldiana* (Schur) za romunske Karpate, subsp. *kellereri* Stoj. & Stef. za Bolgarijo in subsp. *zogovićii* Lakušić. Sledno smo zasledili samo v Zborniku s simpozija o flori in vegetaciji jugovzhodnih Dinaridov, kjer je omenjena kot endemična podvrsta severovzhodnih Prokletij (Lakušić, 1973). Podatka o tem, kako se podvrsta morfološko razlikuje od drugih populacij, nismo našli, prav tako z območja Prokletij nismo uspeli pridobiti vzorcev rastlin, zato podvrste *zogovićii* ne moremo komentirati.

Podvrsti ssp. *lerchenfeldiana* in ssp. *kellereri* naj bi se ločili po listih; pri ssp. *kelleri*

naj bi bili zgornji listi topi, zaokroženi, na zgornji strani temno zeleni in spodnji modrikasti oziroma sivkasti (Praprotnik 2004). Ob natančnem pregledu literature se je izkazalo, da podvrsta *lerchenfeldiana* pravzaprav ne obstaja, saj so nekateri avtorji sinonim vrste zapisali kot podvrsto, napako pa so večkrat povzeli različni avtorji (npr. Fukarek, 1969).

Tudi z genetskega vidika omenjenih podvrst ne moremo potrditi. Vzorci Blagajevega volčina, nabrani v romunskih Karpatih, se glede na kloroplastno DNA nahajajo v treh haplotipih: v 1) osrednjem »Balkanskem« haplotipu (skupaj z vzorci iz Grčije in treh populacij iz Bosne in Hercegovine), ter v 2) dveh samostojnih haplotipih, ki izhajata iz osrednjega »Balkanskega«. Analiza AFLP je vključevala samo vzorce iz parka Buila Vanturarita. Glede na analizo STRUCTURE ($K = 2$) ti vzorci ne tvorijo enotne skupine, temveč so uvrščeni v skupino skupaj z vzorci iz osrednjega Balkana. Tudi pri razporeditvi vzorcev v 7 skupin, kot jih predlaga program BAPS, so romunski vzorci uvrščeni v skupino skupaj z vzorci iz Črne gore. Karpatske podvrste torej na podlagi tako kloroplastne kot jedrne DNA ne moremo potrditi.

Vzorci iz Bolgarije sicer pri nekaterih posameznih kloroplastnih regijah (*trnL-F*, *trnK*) kažejo samostojen haplotip, pri drugih pa so uvrščeni v osrednje haplotipe, skupaj z vzorci iz Grčije, Romunije ter Bosne in Hercegovine. V kombinirani analizi vseh petih kloroplastnih odsekov so uvrščeni v haplotip skupaj z vzorci iz Grčije in Smolina (BiH). Bolgarski vzorci se od ostalih ločijo, če v analizo vključimo poli-A/T regije. Takrat dobimo samostojen bolgarski haplotip, ki se prek manjkajočega haplotipa loči od osrednjebalkanskih in slovenskih haplotipov. Presenetljivo pa kaže analiza AFLP bolj jasno definirano pozicijo bolgarskih vzorcev, saj se že ob $K = 3$ (tako pri analizi v programu STRUCTURE kot tudi v programu BAPS), ti ločijo od vseh ostalih populacij in tako nakazujejo samostojno enoto. Na podlagi genetskih rezultatov ne moremo potrditi, da bolgarski vzorci pripadajo samostojni podvrsti. Vsekakor bi bilo za dokončne sklepe potrebno vključiti tudi morfološke podatke in morfometrijsko analizo.

Glede na pridobljene rezultate predlagamo, da se kloroplastne linije Blagajevega volčina obravnava kot evolucijsko pomembne enote (ESU). Glede na kloroplastno

DNA lahko potrdimo obstoj najmanj dveh oz. treh ESU: v prvo enoto (ESU1) sodijo severne populacije (Slovenija, Italija), v drugo (ESU2) populacije iz osrednjega Balkana, v tretjo (ESU3) pa lahko uvrstimo populacije iz Makedonije, Črne gore in jugovzhodne Bosne in Hercegovine (Stolac). Bolgarsko populacijo, ki kaže glede na AFLP analizo drugačne frekvence alelov (visoko privatno alelno bogastvo), pa predlagamo kot ločeno upravljavsko enoto (MU).

5.6 SKLEPI

Na podlagi genetskih rezultatov lahko deloma potrdimo hipotezo, da delitev Blagajevega volčina na konvencionalne podvrste (subsp. *lerchenfeldiana*, subsp. *kellereri*, subsp. *zogovićii*) ne odraža dejanske filogeografske strukture vrste. Čeprav smo pri osebkih iz Bolgarije (potencialna podvrsta *kellereri*) z metodo AFLP zaznali samostojno skupino, s kloroplastno DNA te skupine nismo potrdili. Potencialna podvrsta *zogovićii* ni bila uradno nikjer opisana, prav tako z območja Prokletij nismo uspeli pridobiti vzorcev rastlin, zato podvrste *zogovićii* ne moremo komentirati.

Delitev Blagajevega volčina na tri klastre (cpDNA) nakazuje, da je na Balkanskem polotoku najverjetnejše obstajalo več območij ledenodobnih refugijev: območje refugijev v osrednjem delu areala, območje refugijev na jugozahodu areala (območje med južno BiH in Makedonijo) ter območje refugijev na severu (območje Slovenije).

Visoka genetska diferenciacija Blagajevega volčina nakazuje, da so posamezne populacije Blagajevega volčina izolirane in med njimi ni genskega pretoka. Diferenciacijo potencialno povečuje tudi prisotnost vegetativega razmnoževanja v nekaterih populacijah, čeprav zanesljivi podatki o načinu razmnoževanja ne obstajajo.

Otočkasta razporeditev osrednjih in južnih populacij Blagajevega volčina je predvidoma posledica fragmentacije v preteklosti strnjenega areala, kar nakazujejo nekateri haplotipi, ki se pojavljajo pri geografsko oddaljenih populacijah. Za severne populacije pa lahko sklepamo o disperziji, kar nakazuje razporeditev neskladja nukleotidnih zaporedij ter kopiranje adeninov/timinov v mononukleotidnih mikrosatelitih (model postopnih mutacij), ki imajo za posledico prisotnost več haplotipov. Te smo zaznali v haplotipni analizi ob upoštevanju poli-A/T zaporedij.



Slika 22: Spomenik ob vznožju Sv. Lovrenca v bližini Polhovega Gradca, posvečen obisku saškega kralja Friderika Avgusta II.

Figure 22: Monument at the foothills of Sv. Lovrenc near Polhov Gradec, in memory of the visit of Frederick August II., the King of Saxony

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Namen naloge je bil ovrednotiti varstveni status Blagajevega volčina (*Daphne blagayana*) na celotnem območju razširjenosti. Kot orodje za oceno varstvenega statusa smo uporabili kloroplastno DNA ter AFLP markerje.

Blagajev volčin je nizka polegla grmovnica iz družine volčinovk (Thymelaeaceae). Zaradi svoje redkosti je praktično v vseh državah, v katerih se pojavlja, zavarovan z nacionalnimi akti. Današnji areal Blagajevega volčina je fragmentiran in obsega Balkanski polotok in južne romunske Karpaty. Način nastanka fragmentiranih nahajališč ni znan. Po eni od razlag naj bi Blagajev volčin v interglacialu zasedal strnjen areal in se iz njega širil proti severu in severozahodu, po drugi pa naj bi bila fragmentirana severna nahajališča posledica razkosanja v glacialu in kot taka naj bi se ohranila do danes. Način nastanka izoliranih populacij igra vlogo pri znotrajpopulacijski genski variabilnosti populacij, kar posledično vpliva tudi na varstvo vrste.

Vzorčenje Blagajevega volčina je potekalo na 21 lokacijah znotraj celotnega areala vrste med letoma 2009 in 2010. Za potrebe raziskave smo nabrali nekaj svežih listov, iz katerih smo v laboratoriju izolirali celokupno DNA. Prvi del raziskav je obsegal filogeografsko analizo, v katero smo vključili 95 rastlin iz 21 populacij s celotnega areala vrste: iz Slovenije, Italije, Bosne in Hercegovine, Črne gore, Makedonije, Grčije, Bolgarije in Romunije. Raziskava je temeljila na analizi petih regij kloroplastne DNA: štirih medgenskih vmesnikov *rpl20–rps12*, *atpB–rbcL*, *trnL–F*, *psbA–trnH* ter vmesnika *trnK–matK* skupaj z genom *matK*. Analiza je pokazala na prisotnost 9 substitucij (4 tranzicije in 5 transverzij), 8 mutacij v poli-A/T regijah, 2 indela v dolžini 1 bp, 1 indel v dinukleotidnem mikrosatelitu (TA), 1 insercijo dolžine 13 bp, in inverzijo dolžine 5 bp. Najbolj variabilno zaporedje predstavlja vmesnik *trnK–matK* skupaj z genom *matK*, najmanj variabilno pa vmesnik *rpl20–rps12*.

Ob združitvi vseh petih odsekov kloroplastne DNA v 3512 bp dolgo nukleotidno zaporedje je program DNAsp vzorce razporedil v 13 (ob neupoštevanju poli-A/T regij) oz. 27 haplotipov. V programu Network smo izrisali mrežo haplotipov, ki kaže na obstoj treh klastrov: severnega klastra (SLO), ki vključuje slovenske in italijanske populacije, južnega klastra (J), ki vključuje populacije iz Makedonije, Črne gore in Stolca (BiH) ter osrednjega klastra (SR), ki vključuje ostale vzorčene populacije. Razdelitev na tri klastre potrjuje tudi analiza v programu SAMOVA. Tako haplotipna kot nukleotidna raznovrstnost sta najvišji klastru SR, najnižji pa v klastru SLO. Iz tega lahko sklepamo, da je bil Blagajev volčin v preteklosti na Balkanskem polotoku splošno razširjen, njegovo preživetje tekom ledenih dob je bilo vezano na refugije Balkanskega polotoka. Velike divergence posameznih skupin lahko pripisemo dolgotrajni izolaciji ter dodatno še morebitnemu prehodu na vegetativni način razmnoževanja, do katerega lahko pride, ko vrsta v določenem habitatu ne dosega svojega ekološkega optimuma.

V drugem delu raziskave smo s pomočjo dominantnih AFLP markerjev ocenili genetsko strukturo 13 populacij ter genski pretok med njimi. Rezultati kažejo na razmeroma močno genetsko diferenciacijo vrste ($F_{ST} = 0,4$) in na odsotnost genskega pretoka med oddaljenimi populacijami. S pomočjo programov STRUCTURE in BAPS smo populacije razvrstili v skupine. Medtem ko predlaga program STRUCTURE razdelitev populacij na 2 skupini, je program BAPS vzorce razvrstil v kar 7 skupin. Skupine glede na rezultate AFLP niso popolnoma usklajene s klastri kloroplastne DNA. Neusklenost vzorcev, ki ju kažeta kloroplastna DNA in AFLP, lahko pripisemo različnim načinom razmnoževanja posameznih populacij ter različnemu načinu dedovanja kloroplastne in jedrne DNA. Najbolj opazna razlika se kaže pri bolgarski populaciji, ki kaže glede na AFLP analizo drugačne frekvence alelov (visoko privatno alelno bogastvo), medtem ko je glede na kloroplastno DNA uvrščena v osrednji klaster.

S pomočjo molekularnih metod smo skušali opredeliti, ali delitev Blagajevega volčina na konvencionalne podvrste odraža filogeografsko strukturiranost vrste ali ne. Podvrste *zogovićii*, ki naj bi uspevala na območju Prokletij, ne moremo komentirati, saj zanje

nismo uspeli pridobiti vzorcev rastlin. Karpatske podvrste (subsp. *lerchenfeldiana*) ne moremo potrditi ne na podlagi kloroplastne niti na podlagi jedrne DNA (AFLP). Prav tako na podlagi genetskih rezultatov ne moremo trditi, da bolgarski vzorci pripadajo samostojni podvrsti (subsp. *kellereri*), čeprav jih programa BAPS in STRUCTURE že ob $K = 3$ ločita na samostojno skupino.

Na podlagi obeh markerskih sistemov lahko za Blagajev volčin predlagamo identifikacijo treh evolucijsko pomembnih enot (ESU): v prvo (ESU1) sodijo severne populacije (Slovenija, Italija), v drugo (ESU2) populacije iz osrednjega Balkana, v tretjo (ESU3) pa lahko uvrstimo populacije iz Makedonije, Črne gore in jugovzhodne Bosne in Hercegovine (Stolac). Bolgarsko populacijo, ki kaže glede na AFLP analizo drugačne frekvence alelov (visoko privatno alelno bogastvo), pa predlagamo kot ločeno upravljavsko enoto (MU).

6.2 SUMMARY

The aim of this work was to assess the conservation status of Blagay's daphne (*Daphne blagayana*) throughout its distribution range, using chloroplast DNA (cpDNA) and AFLP markers.

Daphne blagayana is a small decumbent bush from the family Thymelaeaceae. Due to its rarity it is protected by national legislation in almost all countries within its range. The present distribution of *Daphne blagayana* is fragmented and comprises the Balkan Peninsula and the southern Romanian Carpathians. However, the mechanism leading to such fragmented distribution range is not well understood. According to one interpretation, *Daphne blagayana* had a smaller distribution range during the interglacial, after which it expanded north and northwest. According to another interpretation, the fragmented areal is the result of fragmentation during the glacial and is still preserved today. The mechanisms leading to isolated populations play an important role in within-population genetic structure, which in turn is relevant to species conservation.

Sampling of *Daphne blagayana* was conducted at 21 locations across the entire distribution range in 2009 and 2010. We collected fresh leaves from which we extracted total DNA. The first part of research consisted of a phylogeographic analysis. We included 95 plants from 21 populations (Slovenia, Italy, Bosnia and Herzegovina, Montenegro, Macedonia, Greece, Bulgaria and Romania). The study was based on the analysis of five cpDNA regions: four spacer regions (*rpl20-rps12*, *atpB-rbcL*, *trnL-F*, *psbA-trnH*) and the *trnK-matK* spacer with the *matK* gene. The results revealed the presence of 9 substitutions (4 transitions and 5 transversions), 8 mutations in poly-A/T regions, 2 indels of 1 bp, one indel in a dinucleotide microsatellite region (TA), 1 insertion of 13 bp, and 1 inversion of 5 bp. The *trnK-matK* spacer with the *matK* gene proved to be the most variable region, while the intergenic spacer *rpl20-rps12* was the least variable.

By merging the five cpDNA regions into a 3512 bp long sequence the program DNAsp allocated the samples into 27 or 13 haplotypes, depending on whether poly-A/T

regions were taken into account in the analysis or not. The program Network produced a haplotype network, which suggests the existence of three clusters: the northern cluster (SLO), including Slovenian and Italian populations, the southern cluster (J), including populations from Macedonia, Montenegro and Stolac (BiH), and the central cluster (SR), including the remaining populations. The division into three clusters was also corroborated by the SAMOVA analysis. Both haplotype and nucleotide diversity were highest in the central cluster and lowest in the northern cluster. Based on these results we hypothesise that *Daphne blagayana* was widespread in the Balkan Peninsula in the past, and its survival during the glacials was limited to refugial areas within the Balkan Peninsula. The divergence of populations can be attributed to prolonged isolation and a possible transition to vegetative propagation, which can occur when the species does not reach its ecological optimum in a given habitat.

In the second part of the study we assessed genetic structure and gene flow between 13 selected populations using dominant AFLP markers. The results showed a relatively strong structuring ($F_{ST} = 0.4$) and absence of gene flow among distant populations. Using programs STRUCTURE and BAPS populations were subdivided into 2 and 7 groups, respectively. The groupings proposed by STRUCTURE and BAPS are not fully congruent with cpDNA clusters. This incongruence might be attributed to different reproduction strategies within populations, and to different modes of inheritance of chloroplast and nuclear DNA. The most prominent difference can be observed in the Bulgarian population, which showed different allele frequencies (high private allelic richness) in the AFLP analysis, while being assigned to the central cluster using cpDNA.

Using molecular methods, we tried to determine whether the division of Blagay's daphne into conventional subspecies reflects its phylogeographic structure. We were unable to comment the subsp. *zogovići*, which should thrive in the Prokletije Mountains, due to the lack of plant material from the area. The Carpathian subspecies (subsp. *lerchenfeldiana*) can not be confirmed on the basis of chloroplast or nuclear DNA (AFLP). We also could not confirm the putative subsp. *kellereri* based on

cpDNA, although BAPS and STRUCTURE separated them into a distinct group when $K \geq 3$.

Based on both marker systems we can suggest the identification of three evolutionarily significant units (ESU): the first (ESU1) consists of northern populations (from Slovenia and Italy), the second (ESU2) of populations from central Balkan Peninsula, while the third potential ESU (ESU3) consists of populations from Macedonia, Montenegro and south-eastern Bosnia and Herzegovina (Stolac). The Bulgarian population, which shows different allele frequencies (high private allelic richness) in the AFLP analysis, should be treated as a separate management unit (MU).

7 VIRI

- Ajmone-Marsan P., Negrini R., Crepaldi P., Milanesi E., Gorni C., Valentini A., Cicogna M. 2001. Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. *Animal Genetics*, 32: 281-288
- Aldén B. 1991. *Daphne L. V: Mountain flora of Greece*. Vol. 2. Strid A. in Tan K. (eds.). Edinburgh, Edinburgh University Press: 591-594
- Ali M.A., Al-Hemaid F.M., Al-Qurainy F., Tarroum M., Khan S. 2011. Assessment of genetic diversity among Indian populations of *Cuscuta reflexa* based on ITS sequences of nrDNA. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 7: 1217-1223
- Ali M.A., Al-Hemaid F.M.A., Lee J., Choudhary R.K., Al-Harbi N.A., Kim S-Y. 2011. Genetic diversity assessment of *Diplocyclos palmatus* (L.) C. Jeffrey from India using internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *African Journal of Biotechnology*, 10, 72: 16145-16151
- Alvarez A., Wendel J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 417-434
- Andreev N., Ančev M., Kožuharov S.I., Markova M., Peev D., Petrova A. 1992. *Opredelitel na visšite rastenija v Bălgarija*. Sofija, Nauka i izkustvo: 787 str.
- Avise J., Laerm J. 1982. The pocket gopher. *Florida Naturalist*, 55, 2: 7-10
- Avise J.C. 2001. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press: 447 str.
- Avise J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates: 684 str.
- Avise J.C. 2005. Phylogenetic units and currencies above and below the species level. V: *Phylogeny and conservation*. Purvis A., Gittleman J.L., Brooks T. (eds.). Cambridge, New York, Cambridge University Press: 76-100

- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A.,
Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge
between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and
Systematics, 18: 489-522
- Axelrod D. 1975. Evolution and Biogeography of Madrean-Tethyan Sclerophyll
Vegetation. Annals of the Missouri Botanical Garden, 62, 2: 280-334.
- Balloux F., Lehmann F., de Meeûs T. 2003. The population genetics of clonal and
partially clonal diploids. Genetics, 164: 1635–1644
- Barthet M.M. 2006. Expression and Function of the Chloroplast-encoded Gene *matK*:
doctoral dissertation. (Virginia Polytechnic Institute in State University). Blacksburg,
Virginia, self-published: 202 str.
[http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-02232006-012016/unrestricted/
FinalMMBdissertation.pdf](http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-02232006-012016/unrestricted/FinalMMBdissertation.pdf) (20. 8. 2012)
- Bauert M.R., Kälin M., Baltisberger M., Edwards P.J. 1998. No genetic variation
detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using
RAPD markers. Molecular Ecology, 7: 1519-1527.
- Bauert M.R., Kälin M., Edwards P.J., Baltisberger M. 2007. Genetic structure and
phylogeography of alpine relict populations of *Ranunculus pygmaeus* and *Saxifraga
cernua*. Botanica Helvetica, 117: 181-196
- Beebee T.J.C., Rowe G. 2004. An introduction to molecular ecology. Oxford, Oxford
University Press: 346 str.
- Bengtsson B.O. 2003. Genetic variation in organisms with sexual and asexual
reproduction. Journal of Evolutionary Biology, 16: 189-199
- Bilz M., Kell S.P., Maxted N., Lansdown R.V. 2011. European Red List of Vascular
Plants. Luxembourg, Publications Office of the European Union: 130 str.
- Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P., Pompanon F., Brochmann C., Taberlet P.

2004. How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Molecular Ecology*, 13: 3261-3273
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32: 314-333
- Brown T.A. 2007. Genomes 3. 3rd ed. New York, Garland Science: 713 str.
- Brunsteiner T. 1957. Razmnoževanje vrste *Daphne blagayana* v Sloveniji: diplomska naloga. (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo). Ljubljana, samozal: 39 str.
- Brus R. 2010. Growing evidence for the existence of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica* L.) in the south-eastern Alps and north-western Dinaric Alps. *Periodicum Biologorum*, 112, 3: 239–246
- Brus R. 2001. *Daphne blagayana* (Freyer) 1838. V: Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie. 26. erg. Lfg. 12/01. Roloff A., Schütt P. (eds.). Landsberg am Lech, EcoMed: 6 str.
- Buia A. 1956. Thymelaeaceae. V: Flora R.P.R. Săvulescu T. (ed.). IV. Bucureşti, Editura Academiei Republicii Populare Române: 148-156
- Burbrink F.T., Lawson R., Slowinski J.B. 2000. Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution*, 54, 6: 2107-2118
- Burke J.M., Bulger M.R., Wesselingh R.A., Arnold M.L. 2000. Frequency and spatial patterning of clonal reproduction in Louisiana *Iris* hybrid populations. *Evolution*, 54: 137-144
- Chiang T.-Y., Schaal B.A., Peng C.-I. 1998. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39: 245-250

Ciocârlan V. 2009. Illustrated Romanian Flora: Pteridophyta et Spermatophyta.
Bucureşti, Ceres: 1138 str.

Conti F., Manzi A., Pedrotti F. 1997. Liste Rosse Regionali delle Piante d'Italia. TIPAR
Poligrafica Editrice: 139 str.

Corander J., Sirén J., Arjas E. 2008. Bayesian spatial modelling of genetic population
structure. Computational Statistics, 23: 111-129

Costalonga S., Bruna A. 2006. Una pianta particolare in provincia di Pordenone:
Daphne blagayana Freyer. Bollettino Societa Naturalisti "Silvia Zenari", Pordenone,
30: 53-62.

Cronquist A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. 2nd ed. New
York, Botanical Garden Bronx: 555 str.

Dakskobler I. 2000. Blagayev volčin *Daphne blagayana* nad Gačnikovo grapo v dolini
Trebuše. Idrijski razgledi, 2: 91-94

Dakskobler I., Vončina A., Gantar T. 2011. Rastišča in združbene razmere vrste *Daphne*
blagayana v povodju Idrijce. Hladnikia, 28: 3-16

Danciu M., Gurean D., Indreica A. 2007. Plante vasculare periclitate, vulnerabile și rare
din pădurile României. Bucureşti, Editura Tehnică Silvică: 258 str.

Demasure B., Sodzi N., Petit R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of
polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants.
Molecular Ecology, 4: 129-131

Downie S.R., Palmer J.D. 1992. Restriction site mapping of the chloroplast DNA
inverted repeat: a molecular phylogeny of the Asteridae. Annals of the Missouri
Botanical Garden, 79, 2: 266-283

Dumolin-Lapègue S., Demasure B., Fineschi S., Le Come V., Petit R.J. 1997.
Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent.
Genetics, 146: 1475-1487

- Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571-2581
- Earl D.A., von Holdt B. M. 2012. Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 2: 359-361
- Eastwood W.J. 2004. East Mediterranean vegetation and climate change. V: Balkan Biodiversity. Pattern and Process in the European Hotspot. Griffiths H.I., Kryštufek B., Reed J.M. (eds.). Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 25-48
- Eckert C.G. 2002. The loss of sex in clonal plants. *Evolutionary Ecology*, 15: 501-520
- Ellstrand N.C., Elam D. R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 24: 217-242
- Ellstrand N.C., Roose M.L. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany*, 74: 123-131
- Ettingshausen C. 1872. Die fossile Flora von Sagor in Krain I. Wien, Denkschriften / Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse, 32: 159-202
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-91
- Excoffier L., Lischer H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567

Flora Croatica Database. 2013. Nikolić T. (ur.) Zagreb, Botanički zavod, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. 2012. Introduction to Conservation Genetics.
New York, Cambridge University Press: 618 str.

Fu Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925

Fukarek P. 1965. Nalazišta i staništa borike na Bosansko-Hercegovačkim planinama (*Daphne blagayana* Frey: separat godišnjaka Naše starine, X. Priština, [s. n.]: 231-234.

Fukarek, P. 1969. Betrachtungen über einige dem Gebiete der Balkanländer und Rumänien gemeinsame Baum- und Straucharten. *Review Roumain de Biologie – Botanique*, 14(1): 33-46

Funk H.T., Berg S., Krupinska K., Maier U.G., Krause K. 2007. Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*. *BMC Plant Biology*, 7: 45

Gao Q., Zhang D., Chen S., Duan Y., Zhang F., Li Y., Chen S. 2009. Chloroplast DNA phylogeography of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) in the Qinghai–Tibet Plateau. *Botany*, 87, 11: 1077-1088

Goertzen L.R., Cannone JJ, Gutell RR, Jansen RK. 2003. ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 2: 216-34

Grassi F., Minuto L., Casazza G., Labra M., Sala F. 2009. Haplotype richness in refugial areas: phylogeographical structure of *Saxifraga callosa*. *Journal of Plant Research*, 122: 377–387

Grdiša M., Liber Z., Radosavljević I., Carović-Stanko K., Kolak I., Satovic Z. 2014. Genetic Diversity and Structure of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*

- Trevir. /Sch./ Bip., Asteraceae) within the Balkan Refugium. PLoS ONE 9, 8: e105265. doi:10.1371/journal.pone.0105265
- Hably L. 1994. Egerian plant fossils from Pomáz, Hungary. Fragmenta Mineralogica Et Paleontologica, 17: 5-70
- Halda J.J. 1998. Some taxonomic problems in the genus *Daphne* L. Acta musei Richnoviensis, Sectio Naturalis, 5: 133-160
- Hamilton C.W., Reichard S.H. 1992. Current Practice in the Use of Subspecies, Variety, and Forma in the Classification of Wild Plants. Taxon, 41, 3: 485-498
- Hamilton M.B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. Molecular Ecology, 8: 521-523
- Hamrick J.L., Godt M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, 351: 1291-1298
- Hao D.C., Huang B.L., Chen S.L., Mu J. 2009. Evolution of the chloroplast *trnL-trnF* region in the gymnosperm lineages Taxaceae and Cephalotaxaceae. Biochemical Genetics, 47: 351-369
- He J.X., Wen J.Q., Chong K., Liang H.G.. 1998. Changes in transcript levels of chloroplast *psbA* and *psbD* genes during water stress in wheat leaves. Physiologia Plantarum, 102: 49-54
- Heywood V.H. 1995. Cvetnice. Kritosemenke sveta. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 335 str.
- Hilu K., Liang H. 1996. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. American Journal of Botany, 84: 830-839
- Hilu K.W., Borsch T., Muller K., Soltis D.E., Soltis P.S., Savolainen V., Chase M.W., Powell M.P., Alice L.A., Evans R., Sauquet H., Neinhuis C., Slotta T.A.B., Rohwer J.G., Campbell C.S., Chatrou L.W. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK*

- sequence information. American Journal of Botany, 90: 1758-1776
- Huntley B., Birks H.J.B. 1983. An Atlas of Past and Present Pollen Maps for Europe: 0-13000 years ago. Cambridge, Cambridge University Press: 688 str.
- Huotari T, Korpelainen H. 2012. Complete chloroplast genome sequence of *Elodea canadensis* and comparative analyses with other monocot plastid genomes. Gene, 508, 1: 96-105
- Ivey C.T., Richards J.H. 2001. Genotypic diversity and clonal structure of Everglades sawgrass, *Cladium jamaicense* (Cyperaceae). International Journal of Plant Sciences, 162: 1327-35
- Jarni K., Jakše J., Brus R. (v tisku). Vegetative propagation, linear barriers and somatic mutation affect the genetic structure of a *Prunus avium* L. stand. Forestry.
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics, 23: 1801-1806
- Jakobsson M., Sall T., Lind-Halldén C., Halldén C. 2007. Evolution of chloroplast mononucleotide microsatellites in *Arabidopsis thaliana*. Theoretical and Applied Genetics, 114: 223-235.
- Jeglič C. 1963. Alpinum Juliana. Ljubljana, Prirodoslovni muzej: 125 str.
- Johnson L. A., Soltis D. E. 1994. *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s.str. Systematic Botany, 19: 143-156
- Johnson L.A., Soltis D.E. 1995. Phylogenetic inference using *matK* sequences. Annals of the Missouri Botanical Garden, 82: 149-175
- Josifović M., Stjepanović L., Kojić M., Diklić N. 1972. Flora SR Srbije. Vol. 4. Beograd, Srpska akademija nauka i umetnosti, Odeljenje prirodno-matematičkih nauka: 584 str.

- Kalinowski S.T. 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*, 5: 539-543
- Keissler C. 1896. Über eine neue Daphne-Art und die geographische Verbreitung derselben, sowie die ihrer nächsten Verwandten. *Verhandlungen der kaiserlich-königlichen zoologische-botanisch Gesellschaft*: 214-223
- Keissler C. 1898. Die Arten der Gattung *Daphne* aus der Section *Daphnanthes*. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 25: 44-49
- Kerner A. 1891. *Pflanzenleben*. 2: 702-703
- Kerner A. 1895. *The Natural History of Plants: their forms, growth, reproduction, and distribution*. Half-volume IV. New York, Henry Holt and Company: 983 str.
- Knapp E.E., Connors P.G. 1999. Genetic consequences of a single-founder population bottleneck in *Trifolium amoenum* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 86, 1: 124-130
- Knowles L.L., Futuyma D.J., Eanes W.F., Rannala B. 1999. Insight into speciation from historical demography in the phytophagous beetle genus *Ophraella*. *Evolution*, 53: 1846-56
- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 23: 8369-8374
- Kryštufek B., Reed J.M. 2004. Pattern and process in Balkan Biodiversity – an overview. V: *Balkan Biodiversity. Pattern and Process in the European Hotspot*. Griffiths H.I., Kryštufek B., Reed J.M. (eds.). Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 1-8
- Lakušić R. 1974. Specifičnost flore i vegetacije Komova i Prokletija. *Tokovi*, 9: 51.
- Lande R., Shannon S. 1996. The role of adaptation and population persistence in a

- changing environment. *Evolution*, 50: 434-437
- Lande, R. and Sh Moritz C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Sysematic Biology*, 51, 2: 238-254
- Latch E.K., Dharmarajan G., Glaubitz J.C., Rhodes O.E. 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics*, 7: 295-302
- Lesica P., Allendorf F. 1995. When Are Peripheral Valuable Populations for Conservation? *Conservation Biology*, 9, 4: 753-760
- Lewis P.O., Crawford D.J. 1995. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*, 82, 2: 141-149
- Li W.H. 1977. Distribution of nucleotide differences between two randomly chosen cistrons in a finite population. *Genetics*, 85, 2: 331-337
- Li W.H. 1997. Molecular evolution. Sunderland, Sinauer Associates: 487 str.
- Lian C., Oishi R., Miyashita N., Hogetsu T. 2004. High somatic instability of a microsatellite locus in a clonal tree, *Robinia pseudoacacia*. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 836-841.
- Liang H., Hilu K.W. 1996. Application of the *matK* gene sequences to grass systematics. *Canadian Journal of Botany*, 74: 125-134
- List on protected of certain plant and animal species in Montenegro. 2009. Annex 27: 45 str.
- Long, D.G., Möller, M., Preston J. 2000. Phylogenetic Relationships of *Asterella* (Aytoniaceae, Marchantiopsida) inferred from chloroplast DNA sequences. *The Bryologist* 103, 4: 625-644

- López de Heredia U., Carrión J.S., Jiménez P., Collada C., Gil L. 2007. Molecular and palaeoecological evidence for multiple glacial refugia for evergreen oaks on the Iberian Peninsula. *Journal of Biogeography*, 34: 1505–1517
- Loveless M.D., Hamrick J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 65-95
- Lowe A., Harris S., Ashton P. 2007. *Ecological Genetics. Design, Analysis, and Application*. Malden, Oxford, Calden, Blackwell Publishing: 326 str.
- Lynch M., Milligan B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91-99
- Mai D.H. 1987. Development and regional differentiation of the European vegetation during the Tertiary. *Plant Systematics and Evolution*, 162: 79-91
- Mallet J. 2007. Subspecies, semispecies, superspecies. V: *Encyclopedia of Biodiversity*. Levin S. (ed.). Academic Press: 523-526
<https://enviro.doe.gov.my/lib/digital/1386226355-3-s2.0-B0122268652002613-main.pdf>. (20. 2. 2015)
- Marjoram P., Donnelly P. 1994. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in subdivided populations and implications for early human evolution. *Genetics*, 136: 673-683
- Markova M., Cherneva Zh. 1979. Thymelaeaceae. V: *Flora of the People's republic of Bulgaria*. Vol. 7. Yordanov D., Kuzmanov B. (eds). Sofia, Bulgarian Academy of Sciences: 326-334
- Martini F., Poldini L. 1990. *Daphne blagayana* Freyer (Thymelaeaceae), nuova per la flora d'Italia. *Webbia*, 44, 2: 295-306
- Mayr E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. NewYork, Columbia University Press: 334 str.
- Meusel H. 1969. Zur ökogeographischen Stellung von *Daphne blagayana*. *Review*

Roumain de Biologie – Botanique, 14: 51-56

Micevski K. 1998. The flora of Republic of the Republic of Macedonia 1(4). Skopje,
Macedonian Academy of Sciences and Arts: 332 str.

Millaku F., Rexhepi F., Krasniqi E., Pajazitaj Q., Mala X., Berisha N. 2013. Priština,
Libri i kuq i florës vaskulare të republikës së Kosovës: 19 str.

Milne R.I. 2006. Northern hemisphere plant disjunctions: a window on tertiary land
bridges and climate change? Annals of Botany, 98: 465-472

Mogie M., Hutchings M.J. 1990. Phylogeny, ontogeny and clonal growth in vascular
plants. V: Clonal growth in plants: regulation and function. Van Groenendel J.M., de
Kroon H. (eds.). The Hague, SPB Academic Publishing: 3-22

Moritz C. 1994. Defining ‘evolutionary significant units’ for conservation. Evolution,
9: 373–375

Moritz C. 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. Philosophical
Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences, 349: 113-
118

Mosseler A.J., Egger K.N., Innes D.J. 1993. Life history and the loss of genetic
diversity in red pine. American Journal of Botany, 80, 6: 81-82

Naydenov K.D., Tremblay F.M., Alexandrov A., Fenton N.J. 2005. Structure of *Pinus*
sylvestris L. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and
terpenes analysis: Provenance tests. Biochemical Systematics and Ecology, 33: 1226-
1245

Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia University Press:
512 str.

Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of
restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
76: 5269-73

Nickrent D.L., Soltis D.E. 1995. A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear *18S* rDNA and *rbcL* sequences. *Annales of the Missouri Botanical Garden*, 82: 208-234.

<http://hirc.botanic.hr/fcd> (12. 12. 2014)

Norman C., Ellstrand N.C., Diane R.E. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 217-242

Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143–1155

Oberlander K.C., Roets F., Dreyer L.L. 2012. Chloroplast phylogeography of threatened aquatic *Oxalis* (Oxalidaceae): significant inter-population structure, divergent haplotypes and conservation implications. *Conservation Genetics*, 13: 789-799

Odlok o zavarovanju redkih ali ogroženih rastlinskih vrst. 1976. Ur. I. SRS, št. 15/76

Oltean M., Negrean G., Popescu A., Roman N., Dihoru G., Sanda V., Mihăilescu S. 1994. Lista Roșie a plantelor superioare din România. (Studii, sinteze, documentații de ecologie, I/1994), Bucuresti, Institutul de biologie al Academiei Române: 52 str.

Omejc J. 2005. Blagajev volčin (*Daphne blagayana*) in njegovo varstvo v gozdovih osrednje Slovenije: diplomska naloga. (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire). Ljubljana, samozal: 106 str.

Omejc J., Brus R. 2005. Varstvo Blagajevega volčina (*Daphne blagayana* Freyer) v gozdnogospodarskem območju Ljubljana. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 77: 61-83

Oprea A. 2005. Lista critică a plantelor vasculare din România. Iași, Editura Universitatii "Alexandru Ioan Cuza": 668 str.

Palmarev E. 1989. Paleobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora. *Plant Systematics and Evolution*, 162: 93-107

Palmer J.D., Thompson W.F. 1982. Chloroplast DNA rearrangement are more frequent

- when a large inverted repeat sequence is lost. *Cell*, 29: 537-550
- Paulin A. 1902. Über die geographische Verbreitung von *Daphne blagayana* Freyer.
Laibach, Kleinmayr & Bamberg: 95-102
- Peakall R., Smouse P.E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population
genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28, 19: 2537-
2539
- Pelsy F. 2010 Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine
varieties. *Heredity*, 104: 331-340.
- Peterson B. 1978. Thymelaeaceae. V: Flora of Tropical East Africa. Polhill R. M. (ed.).
London, Crown Agents for Oversea Governments and Administrators: 1-37
- Petit R.J., Vendramin G.G. 2007. Plant phylogeography based on organelle genes: an
introduction. V: Phylogeography of Southern European Refugia. Weiss S., Ferrand
N. (eds.). Dordrecht, Springer: 23-97
- Petit R.J., Aguinagalde I., de Beaulieu J.L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos
R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Müller-Starck G., Demesure-
Musch B., Palmé A., Martín J.P., Rendell S., Vendramin G.G. 2003. Glacial Refugia:
Hotspots But Not Melting Pots of Genetic Diversity. *Science*, 300: 1563-1565
- Petrova A., Vladimirov V. (eds). 2009. Red list of Bulgarian vascular plants. *Phytologia
Balcanica*, 15: 63-94
- Pilar G. 1883. Flora fossilis Susedana (Susedska fosilna flora – Flore fossile de Sused).
Zagreb, Academia scientiarum et artium Slavorum meridionalium: 163 str.
- Pleines T., Jakob S.S., Blattner F.R. 2008. Application of non-coding DNA regions in
intraspecific analyses. *Plant Systematics and Evolution*. online version DOI
10.1007/s00606-008-0036-9.
- Powell W., Morgante M., Andre C., McNicol J.W., Machray G.C., Doyle J.J., Tingeyt
S.V. Rafalski J.A. 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of

polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, 5: 1023-1029

Praprotnik N. 2004. Blagajev volčin – naša botanična znamenitost. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije: 65 str.

Pritchard S., Stephens M., Donnelly J.K. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945–959

Provan J., Powell W., Hollingsworth P.M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 142-147

Rdeči seznam praprotnic in semenk, priloga Pravilnika o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. 2002. Ur. 1. RS, št. 82/2002

Reed J.M., Kryštufek B., Eastwood W.J. 2004. The physical geography of the Balkans and nomenclature of place names. V: Balkan Biodiversity. Pattern and Process in the European Hotspot. Griffiths H.I., Kryštufek B., Reed J.M. (eds.). Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 9-22

Renner S.S., Schaefer H., Kocyan A. 2007. Phylogenetics of *Cucumis* (Cucurbitaceae): Cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *BMC Evolutionary Biology*, 7: 58

Renner S.S., Zhang L.-B. 2004. Biogeography of the *Pistia* clade (Araceae): based on chloroplast and mitochondrial dna sequences and bayesian divergence time inference. *Systematic Botany*, 53, 3: 422-432

Renner S.S., Zhang L.-B., Murata J. 2004. A chloroplast phylogeny of *Arisaema* (Araceae) illustrates tertiary floristic links between Asia, North America, and East Africa. *American Journal of Botany*, 91, 6: 881–888

Rodríguez-Ramilo S.T., Toro M.A., Fernández J. 2009. Assessing population genetic structure via the maximisation of genetic distance. *Genetics Selection Evolution*, 41:

49. doi:10.1186/1297-9686-41-49

Rogers A.R., Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-569

Rosenberg N.A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137-138

Rozas J., Sanchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-97

Ryder O.A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1: 9-10

Sabovljević M. 2006. Genetic distances and phylogeography of selected disjunct moss populations in Europe: doctoral dissertation. (Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn). Bonn, self-published: 169 str.

<http://hss.ulb.uni-bonn.de/2006/0798/0798.pdf> (20. 8. 2012)

Samuel R., Pinsker W., Kiehn M. 1997. Phylogeny of some species of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) inferred from the *atpB-rbcL* cpDNA intergene region. *Botanica Acta*, 110: 503–510

Sang T. 2002. Utility of Low-Copy Nuclear Gene Sequences in Plant Phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 3: 12-147

Sârbu I., Ștefan N., Oprea A. 2013. Plante vasculare din România: determinator ilustrat de teren. Bukareșta, Victor B Victor: 328 str.

Savolainen V., Chase M.W., Hoot S.B., Morton C.M., Soltis D.E., Bayer C., Fay M.F., De Brujin A.Y., Sullivan S., Qiu Y.L. 2000. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. *Systematic Biology*, 49: 306-362

Schaal B.A., Hayworth D.A., Olsen K.M., Rauscher J.T., Smith W.A. 1998.

Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. Molecular Ecology, 7:
465-474

Shaw J., Lickey E., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. American Journal of Botany, 92: 142-166

Silvertown J. 2008. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. International Journal of Plant Science, 169: 157-168

Silvertown J.W., Charlesworth D. 2001. Introduction to Plant Population Biology. 4th ed. Oxford, Blackwell Publishing: 347 str.

Simões Ramos A.C., Lemos-Filho J.P., Acácio Ribeiro R., Rodrigues Santos F., Lovato B.M. 2007. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. Annals of Botany, 100, 6: 1219-1228

Simonkai L. 1886. *Enumeratio Flora Transsilvanicae vesculosae critica*. Budimpešta, Kiadja a K.M. Természettudományi Társulat: 678 str.

Solé M. 2003. Factors affecting the genetic and genotypic diversity of the dioecious clonal plant *Cirsium arvense* at the metapopulation level: doctoral dissertation. (Martin-Luther-Universität). Halle-Wittenberg, self-published: 113 str.

Soltis D., Kuzoff R.K. 1995. Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the Heuchera group (Saxifragaceae). Evolution, 49, 727-742

Soltis D.E, Hibsch-Jetter C., Soltis P.S., Chase M.W., Farris J.S. 1997. Molecular phylogenetic relationships among angiosperms: an overview based on rbcL and 18S rDNA sequences. Journal of Plant research. V: Evolution and Diversification of Land Plants. Iwatsuki K, Raven P.H. (eds.). Tokyo, Springer-Verlag: 157-178

- Soltis D.E., Kuzoff R.K., Conti E., Gornall R., Ferguson K. 1996. *matK* and *rbcL* gene sequence data indicate that *Saxifraga* (Saxifragaceae) is polyphyletic. American Journal of Botany, 83: 371-382
- Soltis D.E., Kuzoff R.K., Mort M.E., Zanis M., Fishbein M., Hufford L., Koontz J., Arroyo M.K.. 2001. Elucidating deep-level phylogenetic relationships in Saxifragaceae using sequences for six chloroplastic and nuclear DNA regions. Annals of the Missouri Botanical Garden, 88: 669-693
- Soltis D.E., Morgan D.R., Grable A., Soltis P.S., Kuzoff R.. 1993. Molecular systematics of Saxifragaceae-sensu-stricto. American Journal of Botany, 80: 1056-1081
- Soltis P.S., Gitzendanner M.A. 1999. Molecular systematic and the conservation of rare species. Conservation Biology, 13: 471-483
- Stevanović V. (ed.). 1999. The red data book of flora of Serbia 1: extinct and critically endangered taxa. Belgrade, Ministry of Environment of the Republic of Serbia, Faculty of Biology, Institute for Protection of Nature of the Republic of Serbia: 566 str.
- Stewart J.R., Lister A.M. 2001. Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. Trends in Ecology and Evolution, 16: 608-613
- Stockwell C.A., Hendry A.P., Kinnison M.T. 2003. Contemporary evolution meets conservation biology. Trends in Ecology and Evolution, 18: 94-101
- Stojanov N., Stefanov B. 1933. Flora na Bulgaria 2. Sofija, Guttenberg Press: 735 str.
- Strauss S.H., Palmer J.D., Howe G.T., Doersken A.H., 1988: Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 85: 3898-3902
- Strgar V. 1973. Novo nahajališče Blagajevega volčina (*Daphne blagayana* Freyer) na jugozahodnem Dolenjskem. Varstvo narave, 7: 31-35

Sugita M., Shinozaki K., Sugiura M. 1985. Tobacco chloroplast tRNALys (UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron: an open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron. Proceedings of the National Academy of Science USA, 82: 3557-61

Sugiura M., 1992: The chloroplast genome. Plant Molecular Biology, 19: 149-168

Surina B., Schoenwetter P., Schneeweiss G.M. 2011. Quaternary range dynamics of ecologically divergent species (*Edraianthus serpyllifolius* and *E. tenuifolius*, Campanulaceae) within the Balkan refugium. Journal of Biogeography, 38: 1381–1393

Szpiech Z.A., Jakobsson M., Rosenberg N.A., 2008. ADZE: A rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. Bioinformatics, 2008; doi: 10.1093/bioinformatics/btn478

Šilić Č. 1996. Spisak biljnih vrsta (Pteridophyta i Spermatophyta) za »Crvenu knjigu« Bosne i Hercegovine. Glasnik Zemaljskog Muzeja u Sarajevu, prirodne nauke, nova serija, 31: 338

Štorchová H., Olson M.S. 2007. The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. Plant Systematics and Evolution, 268: 235-256

Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cosson J.F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Molecular Ecology, 7: 453-464

Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology, 17: 1105-1109

Takhtajan A. 1997. Diversity and classification of flowering plants. New York, Columbia University Press: 643

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary

Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599

Tautz D., Renz M. 1989. Simple sequences are ubiquitous components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535

Thompson J.N. 1996. Evolutionary ecology and the conservation of biodiversity. Trends in Ecology and Evolution, 11: 300-303

Tiffney B.H. 1985. The Eocene North Atlantic land bridge: its importance in Tertiary and modern phylogeography of the Northern Hemisphere. Journal of the Arnold Arboretum, 66: 243-273

Tsumura Y., Ogihara Y., Sasakuma T., Ohba K. 1993: Psysical map of chloroplast DNA in sugi, *Cryptomeria japonica*. Theoretical and Applied Genetics, 86:166-172

Tzedakis P.C., Lawson I.T., Frogley M.R., Hewitt G.M., Preece R.C. 2002. Buffered tree population changes in a quartenary refugium: evolutionary implications. Science, 297: 2044-2047

Uredba o zavarovanih prosti živečih rastlinskih vrstah. 2004. Ur. 1. RS, št. 46/2004

Uredba o zvrsteh naravnih vrednot. 2002. Ur. 1. RS, št. 52/2002

Vekemans X. 2002. AFLP-SURV, version 1.0. Bruxelles, Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles: 15 str.

http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/fichiers/manual_AFLPsurv.pdf (3. 11. 2014)

Villesen P. 2007. FaBox: an online toolbox for fasta sequences. Molecular Ecology Notes, 7, 6: 965–968

Vončina A. 2008. Oživljeno nahajališče Blagajevega volčina (*Daphne blagayana* Freyer) na Idrijskem. Proteus, 70, 8: 376-379

Vončina A. 2009. 95. *Daphne blagayana* Freyer. Notulae ad floram Sloveniae. Hladnikia, 24: 43-67

- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-4414
- Vuylsteke M., Peleman J.D., van Eijk M.J.T. 2008. AFLP technology for DNA fingerprinting. Nature Protocols, 2, 6: 1387-1398
- Walter K.S., Gillett H.J. 1998. 1997 IUCN red list of threatened plants. Cambridge, The World Conservation Union: 30 str.
- Walter K.S., Gillett H.J. (eds.). 1998. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Gland, Switzerland and Cambridge, The World Conservation Monitoring Centre, The World Conservation Union: 862 str.
- Wang C., Moller M., Cronk Q.C.B. 2004. Population genetic structure of *Titanotrichum oldhamii* (Gesneriaceae), a subtropical bulbiliferous plant with mixed sexual and asexual reproduction. Annals of Botany, 93, 2: 201-209
- Webb D.A., Ferguson I.K. 1993. Daphne L. V: Flora Europaea. Psilotaceae to Platanaceae. Tutin T.G. (ed.). Cambridge, New York, Melbourne, Cambridge University Press: 629 str.
- Weising K., Gardner R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome, 42, 1: 9-19
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.). New York, Academic Press: 315-322
- Wicke S., Quandt D. 2009. Universal primers for the amplification of the plastid *trnK/matK* region in land plants. Anales del Jardín Botánico de Madrid, 66, 2: 285-288

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak J.A., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535

Wraber T. 1996. Blagayev volčin (*Daphne blagayana* Freyer) v okolini Vrhnik. Vrhniški razgledi, 1: 31-42

Wraber T., Skoberne P. 1989. Rdeči seznam ogroženih praprotnic in semenk SR Slovenije. Varstvo narave, 14-15: 1-429

Yeh F.R.C., Boyle T.B.J. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belgian Journal of Botany, 129: 157

Zoschke R., Nakamura M., Lierea K., Sugiura M., Börnera T., Schmitz-Linneweber. 2010. An organellar maturase associates with multiple group II introns. Proceedings of the National Academy of Science USA, 107, 7: 3245-50

ZAHVALA

Mentorici izr. prof. dr. Eleni Bužan se zahvaljujem za strokovno vodstvo in spodbudo tekom raziskovalnega dela.

Komisiji za oceno – prof. dr. Robertu Brusu, doc. dr. Tinki Bačič in doc. dr. Petri Košir – se zahvaljujem za koristne pripombe na nalogu.

Agenciji Republike Slovenije za okolje se zahvaljujem za izdajo dovoljenja za nabiranje Blagajevega volčina v Sloveniji.

Dr. Petru Skobernetu in pokojnemu prof. dr. Tonetu Wraberju se zahvaljujem za začetne napotke.

Za nesebično pomoč pri terenskem delu in nabiranju vzorcev se zahvaljujem Janetu Acevskemu in njegovi ekipi, Daliborju Ballianu, Robertu Brusu, Lucianu Curtuju, Petru Glasnoviču, Bernardu Goršaku, Kristjanu Jarniju, Martini Lužnik, Danijeli Stešević, Florinu Stoicanu in Petru Zhelevu.

Sodelavcem Inštituta za biodiverzitetne študije se zahvaljujem za vsestransko pomoč in podporo, še posebno Petru Glasnoviču za izdelavo kart, Juretu Jugovicu in Martini Lužnik za pomoč pri statistični obdelavi podatkov in Tilnu Genovu za pregled angleškega besedila. Matjažu Hladniku se zahvaljujem za pomoč pri laboratorijskem delu. Nataši Fujs se iskreno zahvaljujem za delo, ki ga je opravila na kloroplastni DNA.

Yadani Desmond se zahvaljujem za hiter pregled angleškega besedila. Vsem, ki so mi pomagali pri pridobivanju tujje literature – in teh ni bilo malo – iskrena hvala. Nina in Jadranka, hvala za moralno podporo.

In nenazadnje seveda svoji družini, ki mi je tekom vseh teh let potrpežljivo stala ob strani.

PRILOGE

PRILOGA A – Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov za kombinacijo B14.
 APPENDIX A – Datamatrix of presence or absence of AFLP peaks for the combination B14.

	72	113	117	140	149	152	168	192	205	219	242	245	252	286	306	318	321	329	420	454
BG1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
BG16	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
BG17	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
BG2	1	1	1	1	1	0	1	?	1	1	0	?	0	?	?	?	0	1	1	0
BG20	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
BG23	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
BG28	1	1	1	1	1	0	1	?	1	1	0	?	0	0	?	?	0	1	1	0
BG29	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
BG30	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
BG32	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
BG5	1	1	1	1	1	0	1	?	1	1	0	?	0	?	0	?	0	1	1	0
BG6	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
BG8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
BG9	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
BV10	1	1	1	1	1	?	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BV11	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
BV17	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BV19	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BV21	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BV23	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
BV26	1	1	1	1	1	?	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BV28	1	1	1	1	1	?	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BV5	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
BV8	1	1	1	1	1	?	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
CE1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CE10	1	?	0	1	?	0	?	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
CE3	1	?	0	1	?	0	?	0	1	0	0	0	0	?	0	0	?	0	0	?
CE40	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
CE4	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
CG1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	0	0	1	1
CG12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	0	0	1	1
CG16	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
CG22	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
CG23	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	0	0	1	1
CG24	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	0	0	1	1
CG26	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	0	0	1	1
CG28	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	0	0	1	1
CG3	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	0	0	1	1
CG30	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	?	0	1	0	0	1	1
GRC11	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
GRC14	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC15	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC16	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
GRC18	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC19	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC20	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC21	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC3	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC5	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC6	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC7	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	?	1	0
GRC8	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
KO14	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
KR2	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	?	0	0	0	?	1	0	0	1	?
KR20	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
KR22	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
KR24	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
KR31	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
KR3	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
KR6	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

	72	113	117	140	149	152	168	192	205	219	242	245	252	286	306	318	321	329	420	454
MA28	1	1	0	1	0	0	1	0	1	?	0	0	?	?	?	0	0	?	?	?
MK1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MK11	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
MK13	?	1	?	1	0	0	1	0	1	?	0	0	0	?	?	0	0	?	0	?
MK14	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
MK18	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
MK19	?	1	?	1	0	0	1	0	1	?	0	0	0	?	?	0	0	?	0	?
MK23	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
MK25	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
MK26	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
MK28	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
MK3	?	1	?	1	0	0	1	0	1	?	0	0	0	?	?	0	0	?	0	?
MK4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
MK5	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
MK6	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
SM10	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
SM12	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
SM15	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
SM24	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
SM27	?	?	?	1	?	0	1	0	1	0	0	0	0	1	?	0	0	1	?	?
SM4	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
SM7	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
SM9	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ST10	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ST14	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
ST15	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
ST2	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
ST6	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
TG1	?	?	0	1	?	?	1	0	1	?	0	0	0	?	?	0	0	0	1	?
TG10	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
TG11	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
TG12	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
TG13	?	?	0	1	?	?	1	?	1	?	0	0	0	?	?	0	0	0	1	?
TG2	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
TG3	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
TG4	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
TG5	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
TG8	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
TG9	?	?	0	1	?	?	1	?	1	?	0	0	0	?	?	0	0	0	1	?
GRA11	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
GRA12	1	1	1	1	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
GRA13	1	1	1	1	0	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA14	1	1	1	1	0	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA15	1	1	1	1	0	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA16	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA20	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA22	1	1	1	1	0	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA28	1	1	1	1	0	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA3	1	1	1	1	0	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA30	1	1	1	1	0	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA4	1	1	1	1	0	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA7	1	1	1	1	0	0	0	1	0	?	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
GRA9	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
ITA10	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
ITA26	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	?	0
ITA27	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	?	0
ITA28	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
ITA9	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	?	0
KP20	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
KP21	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
KP23	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
KP24	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	?	0	0	0	1	0
KP26	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0
KP29	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1
KP30	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1

PRILOGA B – Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhovB za kombinacijo G13.
APPENDIX B – Datamatrix of presence or absence of AFLP peaks for the combination
G13.

	176	179	183	195	200	203	205	217	230	232	269	318	335	350	359
BG1	1	?	?	1	0	?	?	?	?	0	0	1	0	1	0
BG16	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
BG17	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0
BG2	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
BG20	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
BG23	1	1	1	1	0	0	?	1	1	0	0	1	0	1	0
BG28	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
BG29	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
BG30	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
BG32	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
BG5	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
BG6	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
BG8	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
BG9	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
BV10	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
BV11	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
BV17	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
BV19	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
BV21	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
BV23	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
BV26	1	0	1	1	0	0	0	?	1	0	0	1	0	1	0
BV28	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
BV5	1	0	1	1	0	0	0	?	1	0	0	1	0	1	0
BV8	1	0	1	1	0	0	0	?	1	0	0	1	0	1	0
CE1	1	0	0	1	0	0	0	?	1	0	0	1	0	1	0
CE10	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
CE3	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
CE40	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
CE4	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
CG1	1	?	?	1	0	0	?	0	1	0	0	?	0	?	0
CG12	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
CG16	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
CG22	1	?	?	1	0	0	?	0	1	0	0	?	0	?	0
CG23	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
CG24	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
CG26	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
CG28	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
CG3	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
CG30	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
GRC11	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
GRC14	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
GRC15	1	0	0	1	0	0	0	?	1	0	0	1	0	1	?
GRC16	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
GRC18	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
GRC19	1	0	0	1	0	0	0	?	1	0	0	1	0	1	?
GRC20	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
GRC21	1	0	0	1	0	0	0	?	1	0	0	1	0	1	?
GRC3	1	0	0	1	0	0	0	?	1	0	0	1	0	1	?
GRC5	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
GRC6	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
GRC7	1	0	0	1	0	0	0	?	1	0	0	1	0	1	?
GRC8	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
KO14	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
KR2	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
KR20	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
KR22	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
KR24	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
KR31	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
KR3	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
KR6	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MA20	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MA28	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK11	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK13	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK14	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK18	1	?	?	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK19	1	?	?	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

	176	179	183	195	200	203	205	217	230	232	269	318	335	350	359
MK25	1	?	?	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK26	1	?	?	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
MK26	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK28	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK3	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK4	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK5	1	0	?	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
MK6	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
SM10	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
SM12	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
SM15	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
SM24	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
SM27	1	0	?	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	?
SM4	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
SM7	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
SM9	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
ST10	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
ST14	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
ST15	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
ST2	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
ST6	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
TG1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
TG10	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
TG11	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
TG12	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
TG13	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
TG2	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
TG3	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
TG4	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
TG5	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
TG8	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
TG9	1	0	0	1	0	0	0	0	?	1	?	?	1	?	0
GRA11	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
GRA12	1	0	0	1	0	0	0	0	?	1	0	?	1	0	1
GRA13	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
GRA14	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
GRA15	1	0	0	1	0	0	0	0	?	1	0	?	1	0	1
GRA16	1	0	0	1	0	0	0	0	?	1	0	1	1	0	1
GRA20	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
GRA22	1	0	0	1	0	0	0	0	?	1	0	?	1	0	1
GRA28	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
GRA3	1	0	0	1	0	0	0	0	?	1	0	?	1	0	1
GRA30	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
GRA4	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
GRA7	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
GRA9	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
ITA10	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
ITA26	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
ITA27	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
ITA28	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
ITA9	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1
KP20	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
KP21	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	?	1	0	1
KP23	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
KP24	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
KP26	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
KP29	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
KP30	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

	370	377	405	426	433	437	440	473	494	524	543
BG1	1	?	0	?	1	1	1	0	?	0	1
BG16	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
BG17	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1
BG2	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
BG20	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
BG23	1	0	0	?	1	1	1	0	1	0	1
BG28	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BG29	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
BG30	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1
BG32	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
BG5	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
BG6	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
BG8	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1
BG9	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
BV10	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BV11	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BV17	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BV19	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
BV21	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BV23	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BV26	1	?	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BV28	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BV5	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
BV8	1	?	?	0	1	1	1	0	0	0	1
CE1	1	0	?	0	1	1	1	0	0	0	?
CE10	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
CE3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
CE40	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	?
CE4	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	?
CG1	1	?	?	0	1	1	1	0	0	?	?
CG12	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
CG16	1	?	1	0	1	1	1	0	0	0	1
CG22	1	?	?	0	1	1	1	0	0	?	?
CG23	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
CG24	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
CG26	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
CG28	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
CG3	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
CG30	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
GRC11	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
GRC14	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
GRC15	1	?	?	?	1	1	1	0	0	0	1
GRC16	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
GRC18	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
GRC19	1	?	?	?	1	1	1	0	0	0	1
GRC20	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
GRC21	1	?	?	?	1	1	1	0	0	0	1
GRC3	1	?	?	?	1	1	1	0	0	0	1
GRC5	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
GRC6	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
GRC7	1	?	?	?	1	1	1	0	0	0	1
GRC8	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
KO14	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KR2	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KR20	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
KR22	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KR24	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KR31	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KR3	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KR6	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
MA20	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
MA28	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
MK1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
MK11	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1
MK13	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
MK14	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
MK18	1	1	?	0	1	1	1	0	?	0	1
MK19	1	1	?	0	1	1	1	0	?	0	1
MK23	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

	370	377	405	426	433	437	440	473	494	524	543
MK25	1	1	?	0	1	1	1	0	?	0	1
MK26	1	1	?	0	1	1	1	0	?	0	1
MK26	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
MK28	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
MK3	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
MK4	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
MK5	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
MK6	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1
SM10	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
SM12	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
SM15	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
SM24	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
SM27	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
SM4	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
SM7	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
SM9	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
ST10	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
ST14	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
ST15	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
ST2	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
ST6	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
TG1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
TG10	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
TG11	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
TG12	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
TG13	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
TG2	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
TG3	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
TG4	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
TG5	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
TG8	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
TG9	1	?	0	0	1	1	1	0	0	0	?
GRA11	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
GRA12	1	?	0	0	1	?	?	0	0	1	?
GRA13	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
GRA14	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
GRA15	1	?	0	0	1	?	?	0	0	1	?
GRA16	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
GRA20	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
GRA22	1	?	0	0	1	?	?	0	0	1	?
GRA28	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
GRA3	1	?	0	0	1	?	?	0	0	1	?
GRA30	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
GRA4	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
GRA7	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
GRA9	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
ITA10	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
ITA26	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0
ITA27	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
ITA28	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
ITA9	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KP20	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KP21	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	?
KP23	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
KP24	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KP26	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
KP29	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
KP30	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0

PRILOGA C – Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov za kombinacijo G14
APPENDIX C – Datamatrix of presence or absence of AFLP peaks for the
combination G14.

	78	88	95	97	104	105	106	111	116	121	128	132	149	153	154	161	165	167	252	259	270
BG1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BG9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BV10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
BV11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	?	0	1
BV17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
BV19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
BV21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
BV23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
BV26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
BV28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	1	?	?	?	1	0
BV5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
BV8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
CE1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	?	1	?	?	1	?	?	1	1	0
CE10	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	?	1	?	?	1	?	?	1	1	0
CE3	1	1	1	1	1	1	1	?	1	1	1	?	1	?	?	1	?	?	1	1	0
CE40	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0
CE4	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0
CG1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
CG12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	1	?	1	0	1	?
CG16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
CG22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
CG23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
CG24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
CG26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	1	?	1	0	1	?
CG28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	1	?	1	0	1	?
CG3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
CG30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
GRC11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GRC14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
GRC15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GRC16	1	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GRC18	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GRC19	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GRC20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
GRC21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GRC3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
GRC5	1	1	1	?	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
GRC6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
GRC7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
GRC8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
KO14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
KR2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
KR20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
KR22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
KR24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
KR31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
KR3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
KR6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
MA20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?
MA28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
MK1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
MK11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
MK13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
MK14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
MK18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	0	1	0	1	0	1
MK19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
MK23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C

	78	88	95	97	104	105	106	111	116	121	128	132	149	153	154	161	165	167	170	252	259
MK25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	0	1	0	1	0	0	0
MK26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	0	1	0	1	0	1	0
MK28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	0	1	0	1	0	1	0
MK3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	1	0	1	0	1	0	1	0
MK4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
MK5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
MK6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
SM10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
SM12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
SM15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
SM24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
SM27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
SM4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
SM7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
SM9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
ST10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	?	1	0	1	0	1	?
ST14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
ST15	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
ST2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	?	1	0	1	0	1	?
ST6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	?	1	0	1	0	1	?
TG1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	?	1	0	1	0	1	?
TG10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
TG11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
TG12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
TG13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	0	?	1	0	1	0	1
TG2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
TG3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	0	?	1	0	1	0	1
TG4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
TG5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
TG8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
TG9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
GRA11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1
GRA12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
GRA13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	1	0	1
GRA14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	1	0	1
GRA15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
GRA16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
GRA20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1
GRA22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
GRA28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
GRA3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
GRA30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
GRA4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	1	0	1
GRA7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1
GRA9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	1	0	1
ITA10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	1	0
ITA26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	1	0
ITA27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1
ITA28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	1	0
ITA9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	1	0
KP20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
KP21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	?
KP23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
KP24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
KP26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
KP29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
KP30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C

	270	286	296	304	315	319	330	337	340	341
BG1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
BG16	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
BG17	0	1	0	1	?	1	1	1	1	1
BG2	0	1	0	1	?	1	1	1	1	1
BG20	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
BG23	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
BG28	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
BG29	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
BG30	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
BG32	0	1	0	1	?	1	1	1	1	1
BG5	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
BG6	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
BG8	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
BG9	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
BV10	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
BV11	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
BV17	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
BV19	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
BV21	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
BV23	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
BV26	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
BV28	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
BV5	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
BV8	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CE1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
CE10	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
CE3	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
CE40	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
CE4	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
CG1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CG12	?	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CG16	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CG22	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CG23	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CG24	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
CG26	?	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CG28	?	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CG3	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
CG30	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC11	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC14	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC15	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC16	0	?	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC18	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
GRC19	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC20	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC21	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC3	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC5	0	?	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC6	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC7	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
GRC8	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
KO14	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
KR2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
KR20	0	?	0	1	0	1	1	1	1	1
KR22	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
KR24	0	?	0	1	0	1	1	1	1	1
KR31	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
KR3	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
KR6	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
MA20	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
MA28	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
MK1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK11	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK13	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK14	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK18	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK19	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK23	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C

	270	286	296	304	315	319	330	337	340	341
MK25	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK26	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK28	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK3	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK4	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK5	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
MK6	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
SM10	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
SM12	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
SM15	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
SM24	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
SM27	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
SM4	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
SM7	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
SM9	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
ST10	?	?	?	1	?	1	1	1	1	1
ST14	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
ST15	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
ST2	?	?	?	1	?	1	1	1	1	1
ST6	?	?	?	1	?	1	1	1	1	1
TG1	?	?	?	1	?	1	1	1	1	1
TG10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TG11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TG12	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
TG13	?	?	?	1	?	1	1	1	1	1
TG2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TG3	?	?	?	1	?	1	1	1	1	1
TG4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TG5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TG8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TG9	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
GRA11	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
GRA12	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
GRA13	?	?	?	1	0	1	?	1	1	1
GRA14	?	?	?	1	0	1	?	1	1	1
GRA15	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
GRA16	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
GRA20	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
GRA22	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
GRA28	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
GRA3	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
GRA30	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
GRA4	?	?	?	1	0	1	?	1	1	1
GRA7	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
GRA9	?	?	?	1	0	1	?	1	1	1
ITA10	?	?	?	1	0	1	?	1	1	1
ITA26	?	?	?	1	0	1	?	1	1	1
ITA27	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
ITA28	?	?	?	1	0	1	?	1	1	1
ITA9	?	?	?	1	0	1	?	1	1	1
KP20	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
KP21	?	?	1	1	0	1	1	1	1	1
KP23	?	?	1	1	0	1	1	1	1	1
KP24	?	?	1	1	0	1	1	1	1	1
KP26	?	?	1	1	0	1	1	1	1	1
KP29	?	?	1	1	0	1	1	1	1	1
KP30	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1

PRILOGA D – Združeno nukleotidno zaporedje za 27 kloroplastnih haplotipov. APPENDIX D – Combined nucleotide sequence for 27 chloroplast haplotypes.

CAAATACGGAGCTAATTTGTTAAATTGAATCACTAGTGGATCACCCCTACTTACTGTAAATTATTCCTACTGCATAAACATTAAATAATTAAATAAAA
AGAATGAATTCTTCTACTATCTTAATCATAAATTTTTTTGGAGCTTGTGATAAAAATTCCTACATGATGCGAACAGCGTTGTAGAAAAAAATTCATA
ATACCAACCCCCCCCAGATAACCTTGGAAAGTAGAGAAGAGTTTGTGTAAGTCAACAGAAAGAAAGAATTTGTCTTCTCCGAAAGGAATTCCTAAACAA
CCCCGAACCTAAATCTTCTCBBBBBAAAGACGTACAGTACTTTGTGTTACGAGGCCAAGTTTAAAGACAAGGAAGCGGAAGTGTATTTACTCGATACAAAC
TCTTCTTCTTGTAGGATCCTGTAAATAGGAAAAAATTTCTGCAATATCGCATAATCGGTCGATAATTCGGAACATTCGCAACCAACCCGGATGGCTTA
CTAATGGATGCTGATGCTTGTGATAACAAATTCTTCGACATACTGCAATGTCATACTAGCAATTGTTGAAAGGGAAATAAAGGGCAATACCAATTGTTGAT
GCCCTTTATTTATTTAATTAAGTCTTCTTCTTATTAACCTAAGTTTCTTCTACTTACCTTACCTTACATACAAACAAAAAAAGGGCAATACCAATTGTTGAT
TTAATGGTTTGTGTTAGTATCATACCTTGTGTTGTACTCATATAAATATATATATTTCTATAATGGATCAGTCCTTACCAATCTTGTGAAGTTCTTA
TTTACTGTGTTCTAATTTAAATCAAAGCGAA

Hap_4

Hap 5

Page 6

TACGAGTATTAATTGAAGAGTCTTAGTACTTCAGAAATGCATTCTATTGAATCCAAGATCTCTGTCTATAATTCTCATATATGTGAATGC
TACCAATTCTTCTTCTTCTCCGTAATCAGCTTCATATTACCGTCAATATTCTTGTAACTCTTCTGCAAGAACATTATTTCTCTTCTCTCTG
TAGAAGCTCTCTCGAATGATTTCCTCCCTCCAAAACCGCTGGTCTGATTTCATGGCACACGGCTTCTCTATGTATACATCTAAAGTCCTTCTCTCTAA
CAAACAGCAGCTCTAAAAAGTGTAAITTGAACTACTCGGTGATCACCCCTTACTTGTAAATTATCTTACTCGTCAATGAACTTAAATTAAATAAAA
AAAGCAATGTTCTACTCTTAACTCTAAATTTTTTGGAGCTTGTAAAGGAAATTCTACTCGTCAATGACCAAAAGCGTGTAGAGAAAAATTATCC
AATGAAACCCGGCCCGATTAACCTTCTCGAAAGAGTGAAGAAGTGTAAAGATCATGTGCTCTCTCTCGTAAGGAATCTTCTCAAA
CCCCGAACCTAATCTCTCGAAAAAGACGTACAGTACTTTGTGTTACGAGCCAAGTTAAAGACAAGAGCGAAGTGTATTACTCGATACAAAC
TCTTCTTGTGAGGTGACTCTGTAATAGGAAATTCTTCGTCATATCGCAACATCGCCTGTAATATCCGAAATCTGCCAACTCCACGGGTGCTTA
CTAATGGGTGATCTCTGCTGTTGCTGTTGCTGAACTATGCTTCAATGCAATTCTTGTAAAGGAAATTAAAGGGCAATACCAAGTGTGTT
TGCCCCTTATTITATTITTAATGACTCTTCTTCTTACTTAACCTAAGTTTCTCTTCTACTCTTACCTTACCTTACATAAAAAAAAAAAAAA_GGAAGGGTC
ATTITTAAGGGTTGGTTGGTAGTACATCACCTTGTGTTGACTCATATAATATATATATTCTATAATGGATCAGTCTTACCAATCTTGTGAAGTTC
TATTTACTGTGTTCAATTAAACCAAGCGGA

Hap_

Hap 3

Hap_

ACTACCTTCCTTCCGGTTATTCTTCCCCTACTAGTCATAAACAACCGGATTCCTCAATGTAAAAAAATCCAAATGGCTTTCGCTACTAT
AACCGTCCCAGCACAGGTTTTCGCTTATTTAGCCTTATTTCTGCTTAATAAGAAGATAAATAGGTATAAAAAGCATAATCCTAAAGAGTA
GTAATAAGAATGGCTACTAGGGTCTCATGGTCTATCTGTTACTCTTAAACCGTGAGGTCTCTATACACCAGGCTCTTACATTAACTAATG
AATGTCATGGTAATTCTGAACTTCAACACTTGGTCTCATCCCCCTAGTCCTAAATAGATCTTCACATAGCAGACCTTATCTAGCAAGGATTC
AATTAGAAAATAGTGTTAGCTGACCTCTTAGCTGTTCTTGGAGCATATAATTCTTCCCTTCAATAGGATTAAACCGCTTAAATGGCTAAGGATTG
CTACCAATGGTACATTITTCATTGATACAGTAAAAAAAGCTTTAATAGATTATTTTCTTAAAGGATTAAACCGCTTAAATGGCTAAGGATTG
CTTACCTCTTCAATAGTGTTAAACCGCAACCATAGTACTTATGTTAACTTAAAGATAAATGTTAACTTGGCTTAACTTGGCTTAACTTGGCTTAAAGT
TCAACTCTGGTGGTAAAGATTTTAGTGCACCTACTTTTAACTTCTTCAAGAAGTAAACAGTATAGGTTAACTGGTAACTTGGCTTAACTTGGCTTAAAGT
CTTAAAGCTTGAACITGAGATAATGCTAAAGATAATATAGAGTAATCGGAGAAAAGTATAACGTTAAATTAAATCGTATACTGTTAGTACATTATAAAAT
CTTACGGGGTAAAGGGGGGGGAAAAGATAGTGGGAAAAGGTTCTGGTAAACGGCTTAAAGTGTATGTTACCTTCAATAGTGTATGTTACCTTCA
GAGCTCTTCACTAAAGATAATATCAAGATAATTATTTGTTCTTCTCTTCACTTCTTCTTGTATCTGGCTTAACTTGGCTTAACTTGGCTTAACTTGGCTTAA
ATATGTTATTACGACATAACCCACTTGTGTTCTGGCTTAACTTGGTAACTTCTGGTAAACGCTTAATCAACTTAAAGGAAACTTCTAAGGACACTTCTTCAA
GCAATTGAGGAATAATATAGCTCATGGGGCAACTCTGGGCAATCTGGGCTTAACTTGGCTTAACTTGGGTTGACTACCGCTTAACTGGGTTCTGTAAGAAAGAATTAAATA
AAAAAGGATAGGGTCTGGGAGACTCATGCTTAACTGGGTTGACTACCGCTTAACTGGGTTCTGTAAGAAAGGAACTTCTTCTATCGAAACAGAAGGATA
AAGGATAACCTACACACATCTGGGAACTTGGGCTTAACTGGGTTGACTACCGCTTAACTGGGTTCTGTAAGAAAGGAACTTCTTCTATCGAAACAGAAGGATA
AAATATAAGAATTGTTGTAATTCTGTTATGTTGCTTAACTGGAGAAAGGAACTTACACATCTTAAATAATATTACCCCTAGTGTATAAATCT
TTGACAACTGGTAAATCGGAGAGATAAAGAGTATGGCTTCACTGCTTAACTTGGCTTAACTTGGGTTGACTACCGCTTAACTGGGTTCTGTAAGGAGAAAATCCGTC
GACTTTAAATAACTGGTCAAGGTTCTGTAAGCTCTTCTACCCCAACCCCTAGTGTAACTGGGTTGACTACCGCTTAACTGGGTTCTGTAAGGAGAAAATCCGTC
ATAGTGTTATTATTTTGTGTTCTGTAAGCTTACTTCTTCTGTAAGGTTCTGTAAGCTTACTTCTGTAAGGAGAAAATCCGTC

Hap_

Hap-

Hap_

TTGAAACAATGGTAAATCGAGCAGAGAATAAGATAGCTCCCATCTACATGTCAATAAAATGCTGACAACAATGAAATTATAGTAAAGAGGAAAATCCGTC
ATGTTAAATTCGAGGGTCAGTCAGTCCTCTATCCCCAACCCCCAACCCCCTGACGCCCTACTGTITTTCTTCTTCTTCTAATGGGTAATATCTCTC
ATGAGTGGATTTTTTTTTTT_GAGTCCTACTATTCTATAGTATTCTCTTCTAGGAGGAAAGCTGAGCTATGTTGAAAGAAGCAGTATGTTGATAA
AGAGAACATCTTTTTTTT_CAAAATCAAAGAGCATTAGGTGAAAAAAACAGCAGGATTGCGATCTTGTGAAATACTTCTCCCTACGAGTAGT
GTCTTATTCAAGGAGAAGAGTACGAAATCTCATATAATTAACTTATTCATATTCTTCTAGGAGGACAATTCATCATAATTCTGTTGTT
AGATGTTAGTAATCCCCCCCCATCTCATCTTGAATACTTGTGTCAGGCCCTCCGCTACTGGTAAAGATGCTCTTTTGCAATTATACGGCTCTTITTC
TACGGATTATAATTGAGAAGCTTCTAGTACTCACAGAAATGCTATTGTAACTCAGAATCTTCTGTGCTTCTATATACTTCTATATGTTGATC
AAATTCATTTCTCTTCTCGGATACTGCTTCTATCTTCTGAGCTAAATCTTCTGAGGAACTCTTCTATCTGAGGAACTCTTCTATGAAAATCAACATCTG
TAGAAGTCTCTGAATGATTCTCCCTCCCCAACCGTGCCTGCTATTCTGACACGGCTTCTCTATGTATACATCTAAAGTCTTCTCTTCTAA
CAAACAGGACTCTAAAAGGTTGATAITGAACTACTGAGTCACCCCTACTTCTGATAATATCTTCTACTGATGACCAATCTTAAATTAATTTAAAA
AGATGAACTTCTACTTCTACTCTTCAATAATTCTTCTT_GAGGGTTGATAAAATCTACTGATGAGTCAACCGGTTGATGAGAAAATATCTCA
AATACCAACCCGGCCCGGATATAACTTGTGAAAGTAGAAGAAGTTTGTGTAAGTCAAGAAGAATGTTCTCTCTGTAAGGAATCTCTCAAAA
CCCCGAACCTATCTCTGAAAAGAGCTCAAGCTACTTGTGTTAGCAGGCAAAGTTTAAGACAAGAACGCAAGTATGTTACTCTGATCACAA
CTTCTTCTTGTGAGGATCCTGACTGATAATAGGAAAATTCTGCTATACAGCACAATCGCTGATATACTGCAACTTGTGCAACATACCAAGGGCTT
CTAATGGGATGTCCTGATGCGTTACAAAATCTGCTTCTGACAATGATCCAATCATAGCAATTCTGTTGAAAGGAAAATAAGGGCAATACCAATTGGTAT
GCCCTTATTTATTTATTAATAGCTTCTTCTTCTTCTGACTCATATAACCTTAAAGTTTCTTCTACTTCTACTTCTATACACAAAAAAA_GGAAAGGGCTAT
TTAATGGGTTGTTGTTGTTGATCATACCTTCTGTTGTTGACTCATATAATATATA_ATTTCTATAATGGATCAGTCTACCAATCTTGTGAGTCTTA
TTTACTGTTCTAATTAATCAAGCGAA

Hap_13

Hap_14

Page 15

ATACCTATCTTCTTCGGTTATTCTTCCCTTACTAGTCTATAAACAACCGGATTCTCCAATGTATAAAATAAAATTCGAATGGCTTGTCACTAT
AACCGCTCCGCACACGAGGTTTCTTCTTGTGGCATTATTITGCCTATAAAGAACGATACTAACAAAGAGTA
GTAATAGAATGGCTACTAGTGGGTCTCATGGCTCATGGTACTCTTACCGGTGAGGTCTCTATACACCCGGAGCTCTTACATTAACTATG
AATGCTATGGGTAACTGTGACCTACACTTITGGCTCATGCCCTACGTGCTAAATAGATCTTACACAGGACACTTATCAGTAAACGGTATTC
AATTAGTAAAGATGAGTGGGTAGCTGACCCCTTCTAGTCGGTTCTTGAAGGCTAAATAGATCTTACACAGTAAACGGTATTC
CTACCAATGGATACTTTTCTTGTGATACAGTAAAAAAAGCTTTAATAGATTTTTTAAAGACTATCGTCTACCCAGCACTTAAAGTAGTATT
CTTACCTCTTCAACTAGTGTTAAAGCAGGCAACCATAGTACTTATGTGTTAAAGATAAATGTTAAAGCTTGTCTTAAAGT
TCACCTCTGGTGTAAAGTTTATAGTGCACTTACTTTAATCTTCTTCAAGAAGTAAACAGTATAGGAA
CTTAAGCTTGAACCTTGAGATAAACTGTTAAAGATAAATAGATGAGTAACTGGGAAAGAAAAGTATAAAGCTGTTAGTACATTATAAAAT
TCAGGGCGATAAGGGGGGGAGAAATAGATGGGGAAAAGGGTACCTGGTTAAGCGGTATAAAAGTGTGATGTATCTCAA
GACAGTCTCTACAAAGATAAATATCAAGATAATTATTTGTTTTTCTTCTCTTAACTCTTCTTGTGATGTATCTTAA
ATATGTTATACGACATAACCCACTTGTGATGGCTCCGGATAGATTATCTTGTGAAACGCTTAACCTAACTTAA
GCAATTGAGGATAATATAGCTCATGGGGCAACTCTGAGGAACTTCTGTTTACGAGAATAAATAGGGTTGGCTTGTGCGAA
GAAAGAATAAATAGGGTTGGCTTGTGCGAA
ATATGTTATACGACATAACCCACTTGTGATGGCTCCGGATAGATTATCTTGTGAAACGCTTAACCTAACTTAA
GCAATTGAGGATAATATAGCTCATGGGGCAACTCTGAGGAACTTCTGTTTACGAGAATAAATAGGGTTGGCTTGTGCGAA
GAAAGAATAAATAGGGTTGGCTTGTGCGAA

Hap_16

Hap_17

Hap_18

Hap_19

Hap_20

Hap_21

TAATTTACGTTTCAATTAAATCAAGGCGA
Pap_24
ACTCATCTTCCTCCGGTTACTTCTTCCCTTACTAGTCTATAAACAACAAAAGCGATTCTCCAAATGTATAAATAAAAAAATTCGAATGGCTTGTGCTACTAT
AACCGCTTCCCAGCACCGAGTTTGGCTTCTTTAGGCTTATTTGCTCTATAAAATAAGAACTTAAATATTAGGTATAAAAAAAAGCATATACTAAAGAGTA
ATAAGGATAAAATGGCTTCAACTGGTGGTCTCCTGCTCTATGGTACTCTTAAACCGGTGAGGTCTCTCCTACACCGGGAGCTCTCTTCACTTAACTATG
ATGGTCTGGGTAAACTGGTACATTCGACATTCACTTTTGCTCTACCCCCATGGTCAATAATAGATCTTCGCAATCACTAGAGACCTTATCTAAGCTAACGGTATTG

Hap_25

Page 20

Hap_27

ACTCATTCTTCTTCGGTTATCTTTCCCTTAAGTCTATAAAACAAAAACGGATTCTCCAATGTATAAAAATCCCCATGGCTTTGCTACTAT

