

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Gašper PUSTOVRH

**MOLEKULARNA FILOGENIJA IN POPULACIJSKO GENETSKA
STRUKTURA MARMORIRANE POSTRVI (*Salmo marmoratus*) V
SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Gašper PUSTOVRH

**MOLEKULARNA FILOGENIJA IN POPULACIJSKO GENETSKA
STRUKTURA MARMORIRANE POSTRVI (*Salmo marmoratus*) V
SLOVENIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**MOLECULAR PHYLOGENY AND POPULATION GENETIC
STRUCTURE OF MARBLE TROUT (*Salmo marmoratus*) IN SLOVENIA**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in Senata Univerze z dne 27. september 2010, je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata iz področja genetike. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Simona Sušnik Bajec in somentorja dr. Aleš Snoj viš. znan. sod.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Jernej JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Član: doc. dr. Elena VARLJEN BUŽAN
Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Oddelek za biodiverziteto

Datum zagovora: 16.05.2013

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Gašper Pustovrh

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 597.2/.5:575.8(043.3)=163.6
KG filogenija/filogeografska/populacijska genetika/ribe/rod *Salmo*/marmorirana postrv/*Salmo marmoratus*
KK AGRIS L10/8100
AV PUSTOVRH, Gašper, dr. vet. med.
SA SUŠNIK BAJEC, Simona (mentorica) / SNOJ, Aleš (somentor)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje genetike
LI 2013
IN MOLEKULARNA FILOGENIJA IN POPULACIJSKO GENETSKA STRUKTURA MARMORIRANE POSTRVI (*Salmo marmoratus*) V SLOVENIJI
TD Doktorska disertacija
OP XIV, 106, 8 pregl., 27 sl., 4 pril., 197 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Osnovni namen opravljene raziskave je bil podati evolucijsko zgodovino ter razrešiti populacijsko genetske odnose marmorirane postrvi v Sloveniji. Raziskavo smo razdelili v dva sklopa. (i) V prvem sklopu smo skušali določiti filogenetske odnose znotraj rodu *Salmo*, pri čemer se zaradi celostnega pogleda nismo osredotočili zgolj na marmorirano postrv, ampak tudi na ostale vrste, linije oz. populacije rodu. S statističnimi programi MrBayes, Garli in BEAST smo na osnovi 22 nukleotidnih zaporedij nepovezanih lokusov ugotovili, da je rod *Salmo* sestavljen iz petih vrst: atlantski losos (*Salmo salar*), belvica (*Salmo ohridanus*), potočna postrv (*Salmo trutta*), marmorirana postrv (*Salmo marmoratus*) in mehkoustna postrv (*Salmo obtusirostris*). Pri tem je marmorirana postrv najbolj sorodna potočni postrvi in je sestavljena iz dveh skupin, ki predstavljata južne in severne populacije. (ii) V drugem sklopu smo proučevali populacijsko genetsko strukturo marmorirane postrvi. V Sloveniji je znanih osem genetsko čistih populacij marmorirane postrvi, ter številne populacije, ki so sestavljene iz različnega deleža marmorirane ter potočne postrvi (cona križanja). S postavitvijo genotipizacijskega sistema 36 SNP označevalcev, ki ločujejo marmorirano od potočne postrvi AT in DA filogenetske linije, smo pri analizi cone križanja ugotovili, da je delež genoma marmorirane postrvi in genetsko čistih marmoriranih postrvi tu relativno visok, pri nekaterih populacijah pa marmorirane postrvi v populaciji celo prevladujejo. Ker je osem genetsko čistih populacij popolnoma izoliranih ter se tako genetsko kot tudi fenotipsko med seboj razlikujejo, smo v jedrnem genomu poiskali SNP-je, ki so zanje variabilni in omenjene populacije analizirali. Ugotovili smo, da so si fenotipsko podobne populacije idrijskega na eni strani in soškega porečja na drugi strani, tudi genetsko sorodne. Da bi lahko pojasnili razlike v fenotipu, smo preverili hipotezo o možnem prehodu potočne postrvi iz sosednjega donavskega v jadransko porečje. Pri analizi populacij križanja v vzhodnem delu idrijskega porečja smo ugotovili povečano prisotnost donavske filogenetske linije, kar bi lahko potrdilo postavljeni hipotezo in pojasmilo značilen idrijski fenotip.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 597.2/.5:575.8(043.3)=163.6
CX phylogeny/filogeography/population genetics/fish/genus *Salmo*/marble trout/*Salmo marmoratus*
CC AGRIS L10/8100
AU PUSTOVRH, Gašper
AA SUŠNIK BAJEC, Simona (supervisor) / SNOJ, Aleš (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje3
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Science, Field: Genetics
PY 2013
TI MOLECULAR PHYLOGENY AND POPULATION GENETIC STRUCTURE OF MARBLE TROUT (*Salmo marmoratus*) IN SLOVENIA
DT Doctoral Dissertation
NO XIV, 106 p., 8 tab., 27 fig., 4 ann., 197 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The main purpose of the research was to resolve evolutionary history and population genetic structure of marble trout in Slovenia. The research was carried out in two parts. (i) In the first part we tried to determine the phylogenetic relationships within the *Salmo* genus, concentrating not only on the marble trout, but also on other species, lineages and populations in the genus. Based on 22 sequences of uncorrelated loci and using statistical programs such as MrBayes, Garli and BEAST we concluded that the genus *Salmo* consists of five species: atlantic salmon (*Salmo salar*), ohrid trout (*Salmo ohridanus*), brown trout (*Salmo trutta*), marble trout (*Salmo marmoratus*) and softmouth trout (*Salmo obtusirostris*). In the genus, marble trout is closely related to brown trout and is composed of two groups, representing the northern and southern populations. (ii) In the second part we tried to determine the genetic structure of marble trout populations. In Slovenia, there are eight genetically pure populations of marble trout and several populations that are composed of different percentage of marble and brown trout genes (hybridization zone). Using genotyping system based on 36 SNP markers that can separate marble from brown trout of AT and DA phylogenetic lineage, we tested populations found in hybridization zone. We estimated that the proportion of marble trout genome and number of genetically pure marble trout in the hybridization zone is relatively high and that marble trout in some populations is dominating. Obviously, eight genetically pure populations are not communicating and are genetically and phenotypically different. We compared different parts of nuclear genome and found five SNPs that we used to test the eight populations. We found that phenotypically connected populations of Idrijca river basin on one hand and the Soča river basin on the other hand, are also genetically related. In order to explain the differences in phenotype, we tested the hypothesis of a possible ancient migration of brown trout from the neighboring Danube to the Adriatic basin. In the analysis of hybrid populations of the eastern part of the Idrija basin, we found an increased presence of the DA phylogenetic lineage, which tends to prove the hypothesis and explains Idrijca basin characteristic marble trout phenotype.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KDW)	IV
Kazalo preglednic.....	IX
Kazalo slik.....	X
Kazalo prilog.....	XIII
Okrajšave in simboli.....	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 HIPOTEZE.....	3
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 MARMORIRANA POSTRV.....	5
2.1.1 Telesne značilnosti.....	6
2.1.2 Taksonomska razvrstitev marmorirane postrvi.....	7
2.1.3 Ogroženost in ohranjanje marmorirane postrvi v Sloveniji	8
2.1.4 Filogenija rodu <i>Salmo</i>	12
2.1.5 Filogenetski odnosi med severnimi in južnimi populacijami marmoriranih postrvi	14
2.1.6 Populacijsko genetska struktura marmorirane postrvi v Sloveniji.....	15
2.2 OSNOVE MOLEKULARNE FILOGENETIKE.....	16
2.2.1 Bayesova statistika v filogenetiki	18
2.3 OSNOVE POPULACIJSKE GENETIKE	19
2.4 SNP OZNAČEVALCI JEDRNE DNA IN NJIHOVA UPORABNOST V FILOGENETSKIH IN POPULACIJSKO GENETSKIH ŠTUDIJAH	21
3 MATERIAL IN METODE.....	23
3.1 OPIS PREUČEVANIH VZORCEV	23

3.1.1	Iskanje linijsko značilnih polimorfizmov posameznih nukleotidov	23
3.1.2	Filogenetska analiza rodu <i>Salmo</i> (atlantski losos in postrvi)	24
3.1.3	Določanje populacijsko genetske strukture severnih populacij marmorirane postrvi.....	26
3.2	VZORČENJE IN IZOLACIJA DNA.....	30
3.3	ISKANJE POLIMORFNIH ODSEKOV JEDRNE DNA.....	30
3.4	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO, DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA IN ISCANJE POLIMORFIZMOV POSAMEZNEGA NUKLEOTIDA	30
3.5	DOLOČANJE FILOGENETSKEGA ODNOSA MED VRSTAMI RODU <i>Salmo</i>	31
3.5.1	Poravnava nukleotidnih zaporedij in preverjanje prisotnosti pozitivne selekcije	33
3.5.2	Izris drevesa po metodi največjega verjetja	33
3.5.3	Izris drevesa z uporabo Bayesove statistike.....	34
3.5.4	Izris drevesa s *BEAST analizo	34
3.5.5	Ocenjevanje časa ločitve od najbližjega skupnega prednika	35
3.6	IZBIRA DIAGNOSTIČNIH SNP-JEV TER VALIDACIJA GENOTIPIZACIJSKEGA POSTOPKA.....	36
3.7	ANALIZA POPULACIJSKE STRUKTURE MARMORIRANE POSTRVI V SEVERNEM JADRANSKEM POREČJU	37
3.7.1	Mitohondrijska DNA	37
3.7.2	Genotipizacija SNP-jev	38
3.7.3	Obdelava podatkov s programom STRUCTURE.....	38
3.7.4	Obdelava podatkov s program NewHybrids	39
3.7.5	Hardy-Weinbergovo ravnotežje in povezanost posameznih lokusov	39
3.7.6	Faktorielna korespondenčna analiza in analiza s 3D Scatter Plot macro	39
3.7.7	Filogeografija populacij	40
4	REZULTATI	41
4.1	RAZREŠITEV FILOGENETSKIH ODNOSOV ZNOTRAJ RODU <i>Salmo</i>	41

4.1.1 Končna poravnava in prisotnost selekcijskega pritiska	41
4.1.2 Filogenetska analiza	41
4.1.2.1 Klad marmoriranih postrvi	44
4.1.2.2 Klad mehkoustnih postrvi	44
4.1.2.3 Klad potočnih postrvi	44
4.1.3 Določanja razlik med drevesi posameznih genov	45
4.1.4 Določanje časa ločitve od najbližjega skupnega prednika	46
4.2 DOLOČANJE DIAGNOSTIČNIH POLIMORFIZMOV POSAMEZNIH NUKLEOTIDOV	46
4.3 POPULACIJSKO GENETSKA STRUKTURA MARMORIRANE POSTRVI	46
 4.3.1 Populacijska struktura na osnovi mtDNA	46
 4.3.2 Populacijska struktura na osnovi analize jedrne DNA s programom STRUCTURE	48
 4.3.3 Populacijska struktura na osnovi analize jedrne DNA s programom NewHybrids	58
 4.3.4 HWE, F_{IS} vrednosti in LD v populacijah	59
 4.3.5 Faktorielna korespondenčna analiza in analiza s 3D Scatter Plot macro	60
 4.3.6 Filogeografska populacij	64
5 RAZPRAVA	66
 5.1 FILOGENETSKI ODNOSSI V RODU <i>Salmo</i>	66
5.1.1 Belvica	69
5.1.2 Mehkoustna postrv.....	69
5.1.3 Marmorirana postrv	70
5.1.4 Potočna postrv	72
5.1.5 Zubatek	73
 5.2 POPULACIJSKO GENETSKA STRUKTURA MARMORIRANE POSTRVI V SLOVENIJI	74
5.2.1 SNP označevalci pri določanju genetsko čistih marmoriranih postrvi ter AT in DA filogenetske linije potočne postrvi.	74
5.2.2 Variabilnost osmih genetsko čistih marmoriranih postrvi v Sloveniji.....	76

5.2.3 Filogeografski odnosi med osmimi genetsko čistimi populacijami marmorirane postrvi v Sloveniji	76
5.2.4 Nastanek fenotipa marmorirane postrvi idrijskega in soškega porečja ...	77
5.2.5 Delež marmoriranih postrvi v coni križanja	80
5.2.6 HWE in F_{IS} vrednosti preučevanih populacij.....	83
5.2.7 LD med lokusi in populacijami	84
5.3 SKLEPI	85
6 POVZETEK (SUMMARY).....	87
6.1 POVZETEK	87
6.2 SUMMARY	89
7 VIRI.....	92
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Taksonomska razvrstitev marmorirane postrvi	8
Preglednica 2: Razvrstitev različnih metod za izris filogenetskega drevesa.....	17
Preglednica 3: Vrsta ali linija vzorcev, opis mesta vzorčenja ter število vzorcev posamezne populacije uporabljenih za iskanje SNP-jev, validacijo, genotipizacijo in potrditev diagnostičnih SNP-jev (N* število vzorcev pri iskanju SNP-jev / validaciji genotipizacije / potrditvi diagnostičnih SNP-jev / referenčni vzorci pri analizi populacijske strukture marmorirane postrvi)	24
Preglednica 4: Vrsta, mtDNA filogenetska linija, mesto vzorčenja, število analiziranih vzorcev na lokacijo (Štv.) ter skupine pri *BEAST analizi (*B.)	25
Preglednica 5: Mesto vzorčenja, oznaka in število vzorcev, geografsko opredeljene skupine (zgt.-zgornji tok, spt.-spodnji tok), status populacije (Stp.; CK-cona križanja, M-populacija genetsko čistih marmoriranih postrvi, P-populacija genetsko čistih potočnih postrvi) in koordinate mesta vzorčenja.....	26
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri filogenetski analizi rodu <i>Salmo</i> , temperatura njihovega prileganje in zaporedna številka lokusa v genetski banki (anotirani lokusi so označeni z *)	32
Preglednica 7: Izbrani modeli molekularne evolucije za posamezen lokus in rezultati primerjave dreves posameznega gena in drevesom vrst.....	45
Preglednica 8: Deleži posamezne nukleotidne variante pri osmih genetsko čistih populacijah in potočni postrvi donavske (DA) in atlantske (AT) evolucijske linije (* označuje povprečni delež nukleotida značilnega za potočno postrv v populaciji) analiziranih s petimi za marmorirano postrv variabilnimi lokusi	79

KAZALO SLIK

str.	
Slika 1: Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i> , foto.: A. Hodalič, 2010)	5
Slika 2: Marmorirana postrv tip linja iz potoka Sevnica (foto.: G. Pustovrh, 2010)	6
Slika 3: Marmorirana postrv z značilnim soškim fenotipom iz potoka Zadlaščice (foto: G. Pustovrh, 2010)	10
Slika 4: Formula za izračun posteriorne verjetnosti za izbrano filogenetsko drevo	18
Slika 5: Hardy-Weinbergov teorem (p, frekvenca alela A; q, frekvenca alela a)	20
Slika 6: Zemljevid z označenimi mesti vzorčenja (obe populaciji porečja reke Adige sta označeni na sliki 17, okrajšave mest vzorčen so pojasnjene v preglednici 5)	29
Slika 7: Filogenetsko drevo rodu <i>Salmo</i> izrisano s programoma GARLI in MrBayes. Nad posamezno vejo so napisane podpore posteriorna verjetnost izračunana s programom MrBayes, pod vejo pa podpora s samovzorčenjem ML analize, pri čemer veje, katerih podpora je bila nižja od 0.50 oz. 50%, niso izrisane (Sm, <i>Salmo marmoratus</i> ; Sd, <i>Salmo dentex</i> ; St, <i>Salmo trutta</i>)	42
Slika 8: Filogenetsko drevo vrst/linij rodu Salmo izračunano z *BEAST analizo in izrisano s programom BEAST. Iz drevesa so razvidne posteriorne verjetnosti za posamezne cepitve (pod vejo), čas ločitve od najbližjega skupnega prednika v milijonih let (Ml) in interval zaupanja (nad vejo). Oba podatka, ki smo ju uporabili za določanje časa ločitve od najbližjega skupnega prednika, sta označena s puščicama.	43
Slika 9: Porazdelitev mtDNA haplotipov značilnih za marmorirano (MA) ter potočno postrv donavske (DA) in atlantske (AT) filogenetske linije pri posameznih populacijah (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5, Ad-Adige, Ref-referenčni vzorci)	47
Slika 10: Populacijska struktura hibridnih populacij in treh referenčnih skupin izračunana s programom STRUCTURE (marmorirana postrv (MA), potočno postrv donavske (DA) in atlantske (AT) filogenetske linije, okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5, Ag-Adige, Ref-referenčni vzorci)	48

Slika 11: STRUKTURE analiza vzorcev zgornjega toka Soče (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)	49
Slika 12: STRUCTURE analiza vzorcev spodnjega toka Soče (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)	50
Slika 13: STRUCTURE analiza vzorcev postrvi iz porečja Idrijce; okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5).....	52
Slika 14: STRUCTURE analiza posameznikov populacije Peklenski potok (PEK, zgoraj) in populacije Cerknica (CER, spodaj) (marmorirana (MA) in potočno postrv donavske (DA) in atlantske (AT) filogenetske linije).....	53
Slika 15: STRUCTURE analiza vzorcev pritokov Vipave (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)	54
Slika 16: STRUCTURE analiza vzorcev Rižane; okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)	55
Slika 17: STRUCTURE analiza vzorcev ponikalnic reke Reke (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)	56
Slika 18: STRUCTURE analiza vzorcev pritokov reke Adige (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)	57
Slika 19: Populacijska struktura osmih genetsko čistih populacij marmoriranih postrvi določena s programom STRUCTURE (K=2, levo in K=8, desno), ter verjetnost za posamezno K vrednost (DeltaK) (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)	58
Slika 20: Deleži osebkov v populaciji, ki pripadajo posamezni skupini križanja, dobljeni s programom NewHybrids (oznake vzorcev so razvidne iz preglednice 5, SM <i>Salmo marmoratus</i> , ST <i>Salmo trutta</i> , Ad-Adige, Referenčni vzorci)	59
Slika 21: Rezultati FCA analize 62 hibridnih populacij in treh referenčnih skupin: marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>), AT linija potočne postrvi (<i>Salmo trutta</i> Atlantska linija) in DA linija potočne postrvi (<i>Salmo trutta</i> Donavska linija)	61

Slika 22: Rezultati 3D Scatter Plot macro analize, kjer obarvane pike predstavljajo posamezne populacije in deleže genoma ene od treh izvornih linij: marmorirana postrvi (SM), AT linija potočne postrvi (AT) in DA linija potočne postrvi (DA) (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)	62
Slika 23: Rezultati FCA analize osmih genetsko čistih populacij marmorirane postrvi (posamezna pika predstavlja posamezen genotip)	63
Slika 24: Nekoreninjeno filogenetsko drevo analiziranih 62 populacij opisanih v preglednici 5 (SM predstavlja referenčni vzorec marmorirane postrvi, AT atlantsko linijo in DA donavsko linijo potočne postrvi, okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)	64
Slika 25: Nekoreninjeno filogenetsko drevo izrisano po metodi sosedskega združevanja osmih genetsko čistih populacij marmorirane postrvi ter podpora s samovzorčenjem za posamezne vejitve	65
Slika 26: Zvezdasto filogenetsko drevo dobljeno z metodo največjega verjetja, pri katerem so z modro barvo označene populacije, za katere je značilno mitohondrijsko določena AD filogenetska linija (Sm, <i>Salmo marmoratus</i> ; Sd, <i>Salmo dentex</i> ; St, <i>Salmo trutta</i>)	68
Slika 27: Delež genoma izračunanega z analizo mtDNA ter STRUCTURE analizo, in delež genetsko čistih osebkov dobljen s programom NewHybrids, ki pripadajo marmorirani (MA) oz. potočni (ST) postrvi	81

KAZALO PRILOG

Priloga A: Ime testa in referenčnega lokusa, številka nukleotidnega zaporedja vnesenega v gensko banko ter mesto nukleotidne zamenjave, temperatura prileganja (Ta) in nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov, ki služijo pri pomnoževanje dela izbranega lokusa

Priloga B: Ime testa in referenčnega lokusa, nukleotidno zaporedje alelno specifičnih sond in skupnega začetnega oligonukleotida, obe alelni varianti (X/Y) ter delež posameznih alelov, ki se pojavlja pri marmorirani (MA) in potočni postrvi atlantske (AT) in donavske (DA) filogenetske linije (* označuje GGATCTGGATCT)

Priloga C: HWE vrednosti za preučevane populacije

Priloga D: F_{IS} vrednosti za preučevane populacije

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AD	jadranska filogenetska linija potočne postrvi
AIC	Akaike informacijski kriterij (angl. <i>Akaike information criterion</i>)
AT	atlantska filogenetska linija potočne postrvi
AWTY	statistični program »ali smo že tam« (angl. <i>Are We There Yet</i>)
BE PP	posteriorna verjetnost *BEAST analize
BIC	Bayesov informacijski kriterij (angl. <i>Bayes information criterion</i>)
CL	metodo združevanja v skupine (angl. <i>clustering method</i>)
DA	donavska filogenetska linija potočne postrvi
Das	razdalja med aleli na lokusu (angl. <i>allele sharing distance</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinuklotidfosfat
DU	duero filogenetska linija potočne postrvi
ESS	efektivna velikost vzorca (angl. <i>effective sample sizes</i>)
ESU	evolucijsko značilna enota ohranjanja (angl. <i>Evolutionarily Significant Unit</i>)
F1	križanec prve generacije
F2	križanec druge generacije
F81	Felsteinov model nukleotidne substitucije
FCA	Faktorska korespondenčna analiza (angl. <i>Factorial Correspondence Analysis</i>)
F_{IS}	individualni fiksacijski indeks oz. koeficient parjenje v sorodstvu
F_{IT}	populacijski fiksacijski indeks
F_{ST}	povprečni oz. subpopulacijski fiksacijski indeks
GTR	splošni časovno reverzibilni model nukleotidne substitucije (angl. general time reversible model)
HKY	Hasegawa Kishino Yano model nukleotidne substitucije
HPDIs	interval normalne porazdelitve (angl. <i>higher posterior density interval</i>)
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnotežje (angl. <i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>)

JC	Jukes Cantor model nukleotidne substitucije
K	število skupin STRUCTURE analize (angl. <i>clusters</i>)
K80	Kimura dvoparametrični model nukleotidne substitucije
KASPar	kompetitivni alelno specifičen PCR na osnovi fluorescence (angl. <i>fluorescence based competitive allele specific PCR</i>)
LD	vezavno neravnovežje (angl. <i>linkage disequilibrium</i>)
lnL	signifikantna vrednost naravnega logaritma verjetja
MA	filogenetska linija <i>marmoratus</i>
MCMC	Markova veriga Monte Carlo (angl. <i>Markov chain Monte Carlo</i>)
ME	mediteranska filogenetska linija potočne postrvi
MIE	metodo najnižje evolucije (angl. <i>minimum evolution</i>)
MgCl ₂	magnezijev klorid
ML	metodo največjega verjetja (angl. <i>maximum likelihood</i>)
ML BS	podpora s samovzorčenjem (angl. <i>bootstrap value</i>) ML analize
MP	metodo varčnosti (angl. <i>maximum parsimony</i>)
MrB PP	posteriorna verjetnost izračunana s programom MrBayes
mtDNA	mitohondrijske DNA
NCBI	(angl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
Ne	efektivno velikost populacije (angl. <i>effective population size</i>)
NJ	metodo sosedskega združevanja (angl. <i>neighbor joining</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pGEN®-T	plazmidni vektor za kloniranje (plasmid cloning vector)
RD	ribiška družina
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
Taq	bakterijska vrsta <i>Termophylus aquaticus</i>
TIMef	tranzicijski model nukleotidne substitucije z enakim deležem nukleotidov
TMRCA	najbližji skupen prednik (angl. <i>the most recent common ancestor</i>)

TrN	Tamura Nei model nukleotidne substitucije
ZZRS	Zavod za ribištvo Slovenije
+G	gama porazdelitev (angl. <i>gamma</i>)
+I	nevariabilna oz. invariabilna mesta (angl. <i>invariable</i>)
π	Jeffreyev parameter (angl. <i>Jeffreys prior</i>)
Θ	model mešanih razmerij (angl. <i>mixing proportions</i>)

1 UVOD

Zaradi človeškega vnosa tujerodnih vrst v celovite ekosisteme so izumrle ali pa so ogrožene številne domorodne vrste (Jiggins in Mallet, 2000). Če se vnesene vrste z lokalnimi parijo, njihovi potomci pa so plodni, temu sledi introgresija, pri čemer se del genoma tujerodne vrste prenese v naravno populacijo (Allendorf in sod., 2001). V primeru, da se srečata vrsti, ki sta se v procesu svojega razvoja genetsko in reproduksijsko popolnoma ločili, običajno na njune križance deluje seleksijski pritisk, pri tem pa se ohranjajo genetsko čisti osebki posamezne vrste (Jiggins in Mallet, 2000). V primeru, da seleksijskega pritiska na križance ni in da je vnos tujerodne vrste dolgotrajen, začnejo križanci prevladovati, genetsko čisti osebki pa sčasoma izginejo (Jiggins in Mallet, 2000).

Med vretenčarji je pojav križanja najbolj poznan pri sladkovodnih ribah (Allendorf in sod., 2001). Za namene komercialnega in rekreacijskega ribolova se je v številne vodotoke vneslo različne ribje vrste. Tipičen primer je dolgoletno vnašanje potočne postrvi (*Salmo trutta*) iz različnih virov v naravno okolje marmoriranih postrvi (*S. marmoratus*) v Sloveniji in Italiji (severne populacije marmorirane postrvi). Ker so potomci križanja med obema vrstama plodni, so se na območjih njunega stika vzpostavile cone križanja (Jug in sod., 2005), ki so prevladovale na pretežnem območju areala severnih populacij marmorirane postrvi. Ob zavedanju o nastalem stanju v Sloveniji že preko dve desetletji poteka program revitalizacije marmorirane postrvi (Polž in sod., 1996), ki temelji na prepovedi vnosa potočne postrvi in gojenju genetsko čistih marmoriranih postrvi za namen repopulacije.

1.1 NAMEN DELA

Namen doktorske disertacije je močno povezan z aspekti ohranjanja marmorirane postrvi v Sloveniji.

(i) Za pravilno strategijo ohranjanja je najprej potrebno poznati evolucijsko zgodovino vrste, ki jo želimo ohraniti. Znano je, da marmorirana postrv spada v rod *Salmo*, znotraj katerega pa njena taksonomska uvrstitev ni povsem jasna. Mnogi avtorji znotraj rodu priznavajo samo dve vrsti (Delling, 2003): atlantskega lososa (*S. salar*) in potočno postrv (*S. trutta*). Na osnovi opravljene filogenije na kontrolni regiji mitohondrijske DNA (mtDNA) je bila marmorirana postrv razvrščena kot ena izmed filogenetskih linij potočne postrvi (Bernatchez in sod, 1992).

Kasneje so jo na podlagi morfoloških (Dorofejeva, 1998) in alocimskih (Berrebi in sod., 2000) raziskav priznali kot samostojno vrsto, čemur nekateri raziskovalci še danes nasprotujejo. Marmorirana postrv živi tako v severnih kot tudi južnih rekah jadranskega povodja, obe populaciji pa združuje enoten fenotip. Vse severne populacije marmoriranih postrvi imajo sorodne mtDNA haplotipe MA (Bernatchez in sod., 1992), medtem ko je pri južnih populacijah prisoten haplotip AD, značilen za jadransko filogenetsko linijo potočnih postrvi (Razpet in sod., 2007b; Snoj in sod., 2010). Ker evolucijska zgodovina marmorirane postrvi ni povsem jasna, bomo na osnovi različnih nukleotidnih zaporedij jedrne DNA z različnimi filogenetskimi metodami in statističnimi programi poskušali bolje pojasniti filogenetske odnose znotraj rodu *Salmo*.

(ii) Pri ohranjanju ogroženih vrst ima pomembno vlogo njihovo vzrejanje v ujetništvu in vračanju njihovega potomstva v naravno okolje. Na področju vzreje marmoriranih postrvi v Sloveniji, ki poteka že več kot dve desetletji, dominira predvsem ribiška družina (RD) Tolmin. V pričetku je vzreja temeljila na osmih genetsko čistih populacijah marmorirane postrvi (Crivelli in sod., 2000), ki odražajo izjemno nizko genetsko pestrost (Fumagalli in sod., 2002), kasneje pa tudi na genetsko odbranih osebkih iz različnih območij križanja v soškem in idrijskem porečju, kjer je bilo dokazano, da še živijo genetsko čiste marmorirane postrvi (Jug in sod. 2005). Za zanesljivo genetsko ločevanje med čistimi in križanimi osebki je potrebno zadostno število genetskih označevalcev. Dosedanje ločevanje genetsko čistih osebkov od križancev temelji na razlikah v kontrolni regiji mtDNA, petih jedrnih genov (Sušnik in sod., 2008) ter štirih mikrosatelitnih lokusov jedrne DNA (Jug in sod., 2004; Snoj in sod., 2000). Ker je število označevalcev relativno majhno, metoda detekcije pa časovno dokaj zahtevna, bomo skušali s primerjavo različnih regij jedrne DNA poiskati zadostno število za marmorirano postrv značilnih polimorfizmov v okviru posameznih nukleotidnih mest (polimorfizem posameznega nukleotida; angl. *single nucleotide polymorphism*; SNP) in na tej osnovi postaviti hiter diagnostičen sistem za zanesljivo ločevanje čistih marmoriranih postrvi od njenih križancev s potočno postrvjo.

(iii) Do leta 1996 se je v severno jadransko porečje intenzivno vnašala potočna postrv (Razpet in sod., 2007a). Vnesene potočne postrvi so najpogosteje izhajale iz lokalnih ribogojnic, kjer so gojili predvsem atlantsko, ponekod pa tudi donavsko filogenetsko linijo potočne postrvi

(Gridelli 1936, Razpet in so., 2007a). Leta 1996 so vnos potočne postrvi prepovedali, začelo pa se je vlaganje čistih marmoriranih postrvi. Da bi preverili trenutno genetsko populacijsko stanje zlasti slovenskega dela severnega jadranskega porečja, bomo na podlagi novo postavljenega genotipizacijskega sistema poskušali določiti deleže genoma pri posameznih populacijah iz cone križanja, ki pripadajo trem izvornim linijam (marmorirani postrvi ter atlantski in donavski filogenetski liniji potočne postrvi). S tem bomo določili delež čistih osebkov v posameznih populacijah in ovrednotili populacije glede na njihovo genetsko sestavo.

(iv) V Sloveniji je znanih osem genetsko čistih populacij marmorirane postrvi, ki pa se tako genetsko kot fenotipsko razlikujejo. Glede na prisotnost rdečega pigmenta, ki je sicer osnovna karakteristika potočne postrvi, razlikujemo dva glavna fenotipa marmorirane postrvi: »soški«, ki rdečega pigmenta nima in »idrijski«, za katerega je rdeč pigment značilen (Fumagalli in sod., 2002). Ker so genetsko čiste populacije izolirane in v njih ni bilo vnosa ribogojniško vzrejenih osebkov, nam le te predstavljajo osnovo za raziskovanje evolucijske zgodovine marmorirane postrvi soškega in idrijskega porečja, na katero so verjetno močno vplivale pleistocenske poledenitve, katerih intenzivnost se je med obema porečjema razlikovala. Na osnovi polimorfizmov posameznih nukleotidov, ki jih bomo poiskali v genomu marmorirane in potočne postvi, bomo preučevali evolucijsko zgodovino marmorirane postrvi. Posebno pozornost bomo posvetili populacijam marmorirane in potočne postrvi, ki so si hidrogeografsko najbliže (npr. Sevnica in Zala) in s pomočjo dobljenih podatkov skušali pojasniti genetsko ozadje soškega in idrijskega fenotipa marmorirane postrvi.

1.2 HIPOTEZE

Z opravljenimi raziskavami bomo potrdili ali ovrgli naslednje hipoteze:

- * Marmorirana postrv je samostojna vrsta znotraj rodu *Salmo*, ki jo sestavljajo južne in severne populacije, in je ožje sorodna s potočno postrvijo.
- * V conah križanja jadranskega porečja Slovenije, kjer še živijo genetsko čisti osebki marmorirane postrvi, je moč s pomočjo zanesljivega genetskega testa in zadostnega števila SNP označevalcev ločiti genetsko čiste marmorirane postrvi od njenih križancev s potočno postrvijo.

* V času pleistocena je bil na območju zgornjega idrijskega porečja omogočen začasen stik marmoriranih in potočnih postrvi, kar je privedlo do križanja z introgresijo in posledično do fenotipskih in genetskih razlik med genetsko čistimi populacijami marmorirane postrvi idrijskega in soškega porečja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MARMORIRANA POSTRV

Marmorirana postrv je sladkovodna ribja vrsta, ki spada v družino *Salmonidae*, za katere je značilna tolsta plavut ali tolščenka. Je endemit jadranskega porečja in jo najlažje prepoznamo po značilnem marmoriranem vzorcu. V Sloveniji marmorirano postrv poznamo pod imenom soška postrv in naseljuje reko Sočo, Idrijco, Vipavo, Rižano in njihove pritoke (Ocvirk, 1992). V severnem Jadranskem porečju živi še v rekah Italije, kjer njen življenjsko področje zajema porečja rek Adige, Brenta, Piave, Livenza, Tagliamenta in je poznana pod imenom trota marmorata (Polž in sod., 1996). Na območju bivše Jugoslavije je marmorirana postrv poznana pod imenom glavatica in je značilna predvsem za reki Neretvo in Zeto (Razpet in sod., 2007b). Da bi se izognili lokalnemu poimenovanju, tako za severne kot tudi južne predstavnike te vrste uporabljamo izraz marmorirana postrv.



Slika 1: Marmorirana postrv (*Salmo marmoratus*, foto.: A. Hodalič, 2010)

Figure 1: Marble trout (*Salmo marmoratus*, photo: A. Hodalič, 2010)

2.1.1 Telesne značilnosti

Marmorirana postrv je poznana kot riba s podolgovatim valjastim telesom, olivnorjave oz. olivnozelene barve, ki iz temnejšega hrbta postopno bledi proti belemu ali svetlo rumenemu trebušnemu delu. Obarvanost telesa je glede na okolje, v katerem se nahaja, zelo različna, kar se odraža v njeni veliki fenotipski raznolikosti. Za vse predstavnike pa je značilen marmoriran vzorec iz majhnih črt in pik temno bakrene barve na svetlejši podlagi, ki se nepravilno povezujejo in običajno segajo pod pobočnico. V času drstenja se po bočnem delu lahko pojavijo rahle rožnate lise, ki pa nikoli niso raztresene (Polž in sod., 1996). Glede na intenzivnost marmoriranosti lahko marmorirano postrv v grobem razdelimo na tri tipe. (i) Klasični tip, pri katerem so osebki po glavi in hrbtnu temno marmorirani, marmoriranost pa sega pod pobočnico. (ii) Tip linja, pri katerem prevladuje olivno zelena obarvanost telesa, pri čemer ta postopno bledi od hrbta proti trebuhu. Intenziteta marmoriranosti je zelo šibka in omejena samo na hrbet ali pa celo izostane (slika 2). (iii) Vmesni tip, pri katerem je intenziteta marmoriranosti, ki se kaže v obliki svetlih peg, srednje močna in prisotna predvsem na hrbtnu in glavi ter se pod pobočnico popolnoma izgubi (Ocvirk, 1992).



Slika 2: Marmorirana postrv tip linja iz potoka Sevnica (foto.: G. Pustovrh, 2010)

Figure 2: Marble trout with tench phenotype from stream Sevnica (photo.: G. Pustovrh, 2010)

Marmorirano postrv prepoznamo tudi po relativno veliki glavi (ta lahko predstavlja do 25% celotne dolžine telesa), ustna reža sega za oči, v ustni votlini so močni zobje. Na škržnih poklopcih in ličnicah so pege z nejasnimi obrisi, ki se skoraj vedno združujejo v valovite rjavo sive linije. Repna plavut ima močan koren in rahlo zarezan rob. Tako kot hrbtna je tudi repna plavut lahko brez izrazitega marmoriranega vzorca ali pa se vzorec s telesa neprekinjeno nadaljuje. Prsne, trebušne in podrepne plavuti imajo le redko ozko belo obrobo. Tolščenka je običajno rumeno obarvana, na njenem robu se nahaja rdeča lisa (Polž in sod.,

1996). Pri odraslih predstavnikih genetsko čistih osebkov po telesu nikoli ne najdemo temnih pik. Za predstavnike populacij idrijskega porečja pa je značilno, da imajo po bokih nepravilno razporejene rdeče pike, ki se z marmorirano podlago dobro zlivajo, medtem ko populacije soškega porečja omenjenih rdečih pik nimajo (Berrebi in sod., 2000).

Mladice marmorirane postrvi se od odraslih osebkov fenotipsko razlikujejo. Po pobočnici imajo izrazite rdeče pike ali pege različne intenzitete, običajno v eni ali dveh vrstah, nežno je nakazana tudi marmoriranost. V drugem letu življenja začnejo rdeče pike oz. pege postopno izginjati. Pričnejo pa se formirati črno rjave pege, ki se s časoma povečujejo in združujejo, čemur sledi nastanek marmoriranega vzorca. Ta je v začetku najbolj očiten na hrbtni, kasneje pa tudi po bokih. V tretjem do četrtem letu, ko osebek spolno dozori, se marmoriranost pojavi tudi na škržnih poklopcih (Ocvirk, 1992).

2.1.2 Taksonomska razvrstitev marmorirane postrvi

Neskladja glede taksonomske razvrstiteve marmorirane postrvi se pojavljajo že vse od prvega opisa iz leta 1817, ko jo je Cuvier opredelil kot samostojno vrsto *Salmo marmoratus*, medtem ko jo je Siebold (1863) opisal kot morfološko varianto potočne postrvi. Ker se morfološki znaki tekom spolnega razvoja osebka spreminjačo, so bile prve prave študije o sistematski razvrstitvi posameznih vrst/linij opravljene šele z razvojem osteoloških analiz (Miller, 1972). Prva, ki je primerjala skeleta potočne in marmorirane postrvi, je bila Dorofejeva (1974). Ob primerjavi lobanje, ralnika, lingvalnih plošč in števila zob v čeljusti je ugotovila statistično značilne razlike ter marmorirano postrv smatrala kot samostojno vrsto (Dorofejeva, 1998). Problem taksonomske razvrstiteve marmorirane postrvi sega tudi v bližnjo zgodovino. Tako jo Polž in sod. (1996) na osnovi predhodnih merističnih in morfometričnih raziskav (Polž, 1989; Rebeušek 1990) in ugotovitve, da tipičnih razlik med potočno in marmorirano postrvjo ni, poimenujejo kot podvrsto potočne postrvi (*Salmo trutta marmoratus*). Drugi raziskovalci, kot je Kottelat (Kottelat in Freyhof, 1997), Laikre in sodelavci (1999) pa dajejo prednost bolj konservativnemu poimenovanju vrst znotraj rodu *Salmo* in so mnenja, da je število vrst v rodu podcenjeno, ter dajejo velik pomen vrstni identiteti, zaradi česar marmorirano postrv obravnavajo kot samostojno vrsto. Enako jo na podlagi analize različnih populacij soškega porečja na osnovi 31 alocimov kot samostojno vrsto uvrstijo Berrebi in sodelavci (2000).

V Sloveniji je marmorirana postrv z Uredbo o zavarovanih prostoživečih živalskih vrstah poimenovana kot samostojna vrsta (*Salmo marmoratus*; preglednica 1), pri čemer je kot takšna uvrščena tudi po Pravilniku o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst na Rdeči seznam, kjer je razvrščena kot prizadeta vrsta (angl. *endangered*). Na podlagi zaščite vrstne identitete in omenjenih uredb jo bomo v nadalnjem besedilu obravnavali kot samostojno vrsto, *Salmo marmoratus*.

Preglednica 1: Taksonomska razvrstitev marmorirane postrvi

Tabele 1: Taxonomic classification of marble trout

Kraljestvo:	<i>Animalia</i> (živali)
Deblo:	<i>Chordata</i> (strunarji)
Nadrazred:	<i>Osteichthyes</i> (kostnice)
Razred:	<i>Actinopterygii</i> (žarkoplavutarice)
Red:	<i>Salmoniformes</i> (lososi)
Družina:	<i>Salmonidae</i> (salmonidi/postrvi)
Rod:	<i>Salmo</i>
Vrsta:	<i>Salmo marmoratus</i> (marmorirana postrv)

2.1.3 Ogroženost in ohranjanje marmorirane postrvi v Sloveniji

Marmorirana postrv je najverjetneje edina avtohtona predstavnica postrvi v reki Soči in njenih pritokih (Razpet in sod., 2007a). S pričetkom razvoja ribogojstva v začetku 20. stoletja pa se je v reke po Evropi kot tudi v Sočo začelo vnašati potočno postrv iz različnih virov (Jug in sod., 2005; Razpet in sod., 2007a). Ta je pred 1. sv. vojno prihajala iz BiH (ribogojnica Iliđa pri Sarajevu, kjer so vzrejali donavsko filogenetsko liniji), med obema vojnoma pa iz italijanske ribogojnice v Bresci, kjer so že takrat vzrejali atlantsko domesticirano linijo (Gridelli, 1936; Razpet in sod., 2007a). Poleg tega je prihajalo predvsem po 2. sv. vojni do številnih dokumentiranih in nedokumentiranih vnosov potočnih postrvi neznanega oz. nedokumentiranega porekla (Snoj, 2004) . Marmorirana postrv se je s potočno križala, plodni križanci pa so kaj hitro začeli izrinjati genetsko čiste marmorirane postrvi (Ocvirk in Pleško, 1998). Ker se je vnos skozi leta stopnjeval, je število genetsko čistih osebkov marmorirane postrvi začelo hitro padati, kar je povzročilo skorajšnjo izumrtje te avtohtone vrste v

severnem jadranskem porečju. Poleg tega sta z razvojem industrije populacije marmorirane postrvi začela ogrožati še onesnaževanje in regulacija vodotokov (Razpet, 2004).

Leta 1993 je RD Tolmin skupaj z Zavodom za ribištvo Slovenije (ZZRS) in skupino francoskih raziskovalcev začela izvajati projekt revitalizacije marmorirane postrvi v Sloveniji, ki je temeljil na iskanju genetsko čistih populacij v izoliranih pritokih soškega in idrijskega porečja. Pred začetkom projekta je bilo znano, da v soškem in idrijskem porečju prevladujejo križanci med marmorirano in potočno postrvjo, kot edina čista populacija marmorirane postrvi pa je bila na osnovi zunanjega videza potrjena populacija iz potoka Zadlaščice (Povž in sod., 1996). Na osnovi alocimskih označevalcev so v okviru projekta potrdili genetsko čistost petih populacij v potokih Zadlaščica, Trebuščica, Lipovšček, Huda grapa in Studenec (Berrebi in sod., 2000). Na podlagi rezultatov raziskave potoka Volarje pa so zaključili, da je delež genoma v populacijah v coni križanja po različnih delih Soče sestavljen iz enakovrednih deležev marmorirane postrvi, donavske in atlantske filogenetske linije potočne postrvi (Delling in sod., 2000).

Raziskovalci, ki so sodelovali pri projektu revitalizacije marmorirane postrvi v Sloveniji, so ocenili, da je za preživetje marmorirane postrvi potrebno najti med 12 in 15 genetsko čistih populacij (Crivelli in sod., 2000). Predlagano število genetsko čistih populacij je temeljilo na primerjavi s podobnimi raziskavami pri postrvih vrste *Oncorhynchus apache* in *Oncorhynchus clarki stomias* v različnih predelih Severne Amerike (Dowling in Childs, 1992; Griffith, 1994). Ker so v prvi fazi projekta našli le pet genetsko čistih populacij marmorirane postrvi, so se znanstveniki skupaj z RD Tolmin odločili, da zaščitijo omenjene populacije tako, da jih razširijo še na posamezne izolirane potoke, ki prej s postrvimi niso bili naseljeni. Opisana praksa je bila prvič uporabljena v ZDA (Minckley, 1995) in se je pri zaščiti ameriških salmonidov izkazala kot zelo učinkovita. Tako je RD Tolmin v potoke Gačnik, Zakojška grapa in Gorska grapa naselila genetsko čiste marmorirane postrvi. Vneseni osebki so bili označeni z značkami, njihov razvoj pa so vsako leto spremljali. Po nekaj letih spremljanja so potrdili dobro rast in preživitveno sposobnost omenjenih populacij (Crivelli in sod., 2000).

Ker je bil glavni razlog za izginjanje marmoriranih postrvi iz soškega porečja njeno križanje z vneseno potočno postrvjo, je ZZRS na področju Slovenskega dela jadranskega porečja leta 1996 prepovedal vnos neavtohtonih potočnih postrvi.

Kasneje so v okviru projekta revitalizacije marmorirane postrvi in v sodelovanju z Biotehniško fakulteto, Univerze v Ljubljani ter uporabo mtDNA in mikrosatelitnih označevalcev potrdili genetsko čistost še treh populacij v potokih Predelica, Idrijca in Sevnica (Crivelli in sod., 2000; Jug in sod., 2005).

Z namenom ohranjanja marmorirane postrvi so v ribogojnici RD Tolmin v Tolminu in ribogojnici ZZRS v Kobaridu začeli vzrejati marmorirano postrv (Jesenšek, 1994). Vzreja je temeljila na osmih genetsko čistih populacijah (iz potokov Zadlaščica, Trebuščica, Lipovšček, Huda grapa, Studenec, Predelica, Idrijca in Sevnica). Mikrosatelitna analiza osmih genetsko čistih populacij marmorirane postrvi je pokazala, da je znotraj-populacijska genetska pestrost že tako majhnih populacij izjemno nizka, temu ustrezno pa je zelo visoka med-populacijska genetska pestrost (povprečna vrednost $F_{ST} = 0,80$; Fumagalli in sod., 2002). Poleg njihove nizke znotraj-populacijske pestrosti so si posamezne populacije med seboj tako genetsko kot tudi morfološko različne (populacije idrijskega porečja Huda grapa, Idrijca, Lipovšček, Sevnica, Studenca in Trebuščica imajo po bokih nepravilno razporejene rdeče pike, za populaciji Predelica in Zadlaščica (pritoka zgornje Soče) pa rdeča pigmentacija po telesu ni značilna, slika 3).



Slika 3: Marmorirana postrv z značilnim soškim fenotipom iz potoka Zadlaščice (foto.: G. Pustovrh, 2010)

Figure 3: Marble trout with characteristic Soča river phenotype from stream Zadlaščica (photo.: G. Pustovrh, 2010)

Da bi povečali genetsko pestrost ribogojniške matične jate, so v RD Tolmin s sodelovanjem Biotehniške fakultete začeli s preučevanjem cone križanja, za katero so na podlagi alocimskih označevalcev ugotovili, da v njej še živijo posamezni osebki genetsko čistih marmoriranih postrvi (Berrebi in sod., 2000; Jug in sod., 2005). Da bi zanesljivo ločevali genetsko čiste marmorirane postrvi od njenih križancev s potočno postrvjo, so na Biotehniški fakulteti začeli razvijati različne genetske označevalce, diagnostične za marmorirano postrv. Ločevanje med križanci in genetsko čistimi osebkami je v začetku temeljilo na mtDNA (Snoj, 1997) in alocimskih označevalcih (Berrebi in sod., 2000), kasneje na mikrosatelitnih označevalcih (Snoj in sod., 1997; Snoj in sod., 2000), danes pa temelji predvsem na polimorfizmih posameznih nukleotidov in mtDNA (Sušnik in sod., 2008). Tako vsako leto v času drstenja RD Tolmin odlovi nekaj deset spolno zrelih osebkov, ki glede na zunanji izgled ustrezajo marmorirani postrvi. Odbrane ribe označijo z značkami, košček analne plavuti pa pošljejo na genetsko analizo na Biotehniško fakulteto. Potrjene genetsko čiste osebke odberejo in jim odvzamejo spolne celice, ki jih uporabijo za pridobivanje potomcev namenjenih za repopulacijo porečja Soče in Idrijce.

Podoben projekt zaščite je bil izveden tudi na marmorirani postrvi Italije, kjer so Meraner in sodelavci (2010) analizirali 12 mikrosatelitov in mtDNA osebkov iz različnih populacij porečja reke Adige in ugotovili, da genetsko čistih populacij, kjer bi bil prisoten samo haplotip značilen za marmorirano postrv, v Italiji ni. Ugotovili so tudi, da je genetski tok med marmorirano in vloženo potočno postrv v nekaterih populacijah omejen, na kar nakazujejo najdeni genetsko čisti primerki marmorirane postrvi. Na osnovi rezultatov pa so podali strategijo ohranjanja, ki temelji na prepovedi vnosa potočne postrvi, genetski in fenotipski odbiri čistih marmoriranih postrvi ter izločanju križancev in potočnih postrvi.

S podobno problematiko ogroženosti drugih avtohtonih salmonidnih vrst in njihovo zaščito se ukvarjajo tudi širom Evrope in Severne Amerike (Behnke, 1992; Hayes in sod., 1996; Laikre in sod., 1999; Poteaux in sod., 1998). Tako so se že leta 1980 (Waples, 1991) začeli zavedati ogroženosti različnih vrst pacifiškega lososa (*Oncorhynchus* spp.) in izvedli projekt zaščite teh vrst. Le ta je temeljil na morfološkem ločevanju ribogojniško vzgojenih in prostoživečih linij. Kasneje je odbira poleg morfoloških znakov temeljila tudi na alocimskih označevalcih (Seeb in sod., 1986). Zaščita pacifiškega lososa poteka še danes, pri čemer se za določanje

čistosti in variabilnosti uporablja SNP-je (Ackerman in sod., 2011; Habicht in sod., 2010; Smith in Seeb, 2008).

Izkazalo se je, da je za zaščito salmonidnih vrst nujno potrebna vzreja ogrožene vrste v ujetništvu (Allendorf in sod., 2001; Cooper in sod., 2010; Horrero in Garcia-Vazquez, 2011). Pri tem pa mora ločevanje genetsko čistih osebkov od njihovih križancev temeljiti na osnovi genetskih označevalcev. Z razvojem novih molekularnih tehnik in vse višji zahtevi po natančnem ločevanju križanih in čistih osebkov pa se za ločevanje vse več uporablja SNP-je (Morin in sod., 2004).

2.1.4 Filogenija rodu *Salmo*

Salmo je monofiletski rod rib znotraj družine postrvi (*Salmonidae*). V rodu je bilo v zadnjih treh stoletjih v Evropi, Severni Afriki in vzhodni Aziji opisanih preko 100 različnih vrst, podvrst, morfoloških variant itd. (Kottelat in Freyhof, 2007). Po mnenju nekaterih avtorjev (Delling, 2003) sta za rod *Salmo* značilni samo dve vrsti: atlantski losos (*S. salar*) in potočna postrv (*S. trutta*). Koncept dveh vrst (angl. *two species view*) je tudi najenostavnejši pogled na opredelitev rodu *Salmo*. Po drugi strani pa mnogi avtorji na osnovi morfoloških in molekularnih raziskav zagovarjajo alternativno hipotezo, ki obravnava atlantskega lososa kot samostojno vrsto (Kottelat in Freyhof, 2007), potočno postrv pa razdeli na več vrst, ki sestavlja večvrstni kompleks potočne postrvi (angl. *Salmo trutta species complex*, Behnke, 1968).

Da bi razrešili molekularno evolucijske odnose znotraj večvrstnega kompleksa potočnih postrvi, je bilo opravljenih več raziskav, ki so temeljile na mtDNA (Bernatchez in sod, 1992), na posameznih jedrnih lokusih (Antunes in sod., 2002), ali na združenih sekvenkah mtDNA in posameznega jedrnega lokusa (Snoj in sod., 2008). Prvi, ki je poskušal razrešiti filogenetske odnose znotraj večvrstnega kompleksa potočnih postrvi, je bil Bernatchez s sodelavci (1992). Za filogenetsko analizo je uporabil mtDNA, ki se je predhodno že izkazala kot zelo uporabna pri razreševanju filogenetskih odnosov salmonidnih vrst (Shedko, 2002). Tako sta na primer Gillesten in Wilson (1988) na osnovi polimorfizmov v mtDNA ugotovila sorodnost atlantskega lososa in potočne postrvi, ter dveh ameriških postrvi (*O. mykiss* in *O. clarki*). Bernatchez (1992) je glede na rezultate filogenetske analize na osnovi polimorfizma v

mtDNA predlagal, da se potočna postrv razdeli na pet evolucijskih oz. filogenetskih linij. Ker so evolucijske linije nakazovale močno povezanost s porečji, jih je poimenoval po njih: donavska (DA; angl. *Danubian*), atlantska (AT; angl *Atlantic*), jadranska (AD; angl. *Adriatic*), mediteranska (ME; angl. *Mediterranean*) in linija *marmoratus* (MA), katero je poimenoval po značilnem marmoriranem vzorcu postrvi *Salmo marmoratus*. Za marmorirano postrv je Bernatchez (2001) določil tri značilne haplotipe (MA1 in MA2, ter MA3, ki pa se je pojavljal tudi pri potočnih postrvih), ki so v drevesu zasedali sestrsko pozicijo s haplotipi ME linije potočne postrvi. Najbližje sorodni ME in MA haplotipom pa so bili vzorci AD filogenetske linije potočne postrvi. Iz opisanega filogenetskega drevesa je tudi razvidno, da se prva izmed vseh linij odcepi AT linija, kateri sledi DA filogenetska linija potočne postrvi. Do podobnih razvejitev na filogenetskem drevesu različnih linij potočne postrvi Italije so prišli tudi Giuffra in sodelavci (1994), pri čemer so na podlagi variabilnosti gena ATP-azne podenote VI kot izvorno najstarejši tip določili AT linijo potočne postrvi, ME, AD in MA linije pa so bile uvrščene kot sestrške klade. Z distančno matriko so tudi ugotovili, da se vsi trije haplotipi marmorirane postrvi povezujejo v monofletsko skupino. Na podlagi filogenetskih analiz potočnih postrvi ulovljenih v reki Duero v Španiji, pa je Suarez (2001) opisal še šesto filogenetsko (evolucijsko) linijo, ki jo je poimenoval duero (DU).

Nadaljnje raziskave so pokazale, da se posamezne linije pojavljajo tudi izven porečij, po katerih so do bile ime. Tako so AT linijo našli na Siciliji (Schöffmann in sod., 2007) in v mediteranskem povodju Maroka (Snoj in sod., 2011), AD linijo na Iberskem polotoku (Cortey, 2004) in ME linijo v jadranskem porečju (Splendiani in sod., 2006).

Poleg atlantskega lososa in večvrstnega kompleksa potočne postrvi sta bili na podlagi mtDNA v rod *Salmo* razvrščeni še dve vrsti: belvica (*Salmo ohridanus*, Phillips in sod., 2000; Sušnik in sod., 2006), ki je bila predhodno uvrščena v samostojen rod *Acantholingga* in mehkoustna postrv (*Salmo obtusirostris*, Snoj in sod., 2002), predhodno razvrščena v samostojen rod *Salmothymus*.

Nadaljnje molekularne raziskave nekaterih vrst znotraj rodu *Salmo* pa so pokazale, da nekatere morfološko priznane vrste pripadajo kompleksu potočne postrvi (npr.: *Salmo letnica* (Sušnik in sod., 2007), *Salmo platycephalus* (Sušnik in sod. 2005) in druge), vendar so

raziskovalci zaradi njihovega ohranjanja predlagali, da ohranijo taksonomsko identiteto vrste (Sušnik in sod., 2005; Sušnik in sod., 2007a).

2.1.5 Filogenetski odnosi med severnimi in južnimi populacijami marmoriranih postrvi

Marmorirana postrv živi tako v severnih kot tudi južnih rekah jadranskega povodja. Južne populacije preverjeno še obstajajo v porečju Neretve in v Skadarskem rečnem sistemu (Zeta, Morača) in v dalmatinski Krki. Medtem ko so številni raziskovalci preučevali filogenetske in populacijsko genetske odnose med severnimi populacijami (Bernatchez, 2001; Berrebi in sod., 2000; Delling, 2002; Giuffra in sod., 1994; Snoj in sod., 2000; Fumagalli in sod. 2002; Jug in sod., 2005), so južne populacije ostale dokaj neraziskane.

Raziskave južnih populacij so v začetku temeljile na osteoloških analizah (Dorofejeva in sod., 1983), na molekularnem nivoju pa predvsem na mtDNA (Snoj in sod. 2010), pri čemer so le redke študije temeljile na primerjavi severnih in južnih populacij (Razpet in sod., 2007b). Analize mtDNA marmoriranih postrvi iz južnih populacij pa so pokazale, da imajo le te prisotne haplotipe AD, ki so značilni za jadransko filogenetsko linijo potočnih postrvi (Razpet in sod., 2007b; Snoj in sod., 2010). Vse severne populacije marmoriranih postrvi pa imajo sorodne mtDNA haplotipe MA, na osnovi katerih je bila oblikovana mitohondrijska filogenetska linija *marmoratus* (Bernatchez in sod., 1992). Haplotipi linije *marmoratus*, prvotno značilni le za marmorirano postrv severnih populacij, so številni raziskovalci potrdili tudi pri potočni postrvi v južno-jadranskem, egejskem in mediteranskem porečju. Tako je bil haplotip MA linije odkrit pri postrvih iz Grčije (Apostolidis in sod., 1997), Dalmacije (Bernatchez, 2001), centralne Italije (Splendiani in sod., 2006) in Albanije (Snoj in sod., 2009). Ker se filogenetska linija *marmoratus* pojavlja tako pri marmorirani kot tudi potočni postrvi, je kot takšne ne moremo striktno povezovati z značilnim marmoriranim fenotipom. Tako kot linija MA tudi marmoriran fenotip ni izključno povezan z marmorirano postrvjo (*Salmo marmoratus*), saj sta Skaala in Solberg (1997) podoben pigmentni vzorec opazila tudi pri potočni postrvi AT linije iz reke Otre na Norveškem. Na osnovi vseh omenjenih raziskav so Razpet in sodelavci (2007b) prišli do zaključka, da se je marmoriranost pri severnih in južnih populacijah marmorirane postrvi najverjetnejše izoblikovala vzporedno in da sta populaciji nastali kot posledica prilagoditve na podobno okolje oz. konvergentne evolucije

(angl. *convergent evolution*), torej nista neposredno sorodni oz. nista monofiletski. Pri tem pa se je potrebno zavedati dejstva, da so bile analize opravljene izključno na mtDNA in da so znani številni primeri neujemanja med filogenijo mitohondrijske in jedrne DNA (npr., Renault in sod., 2009; Sušnik in sod., 2007b; Wiens in sod., 2010b).

2.1.6 Populacijsko genetska struktura marmorirane postrvi v Sloveniji

Osem genetsko čistih populacij marmoriranih postrvi, ki jih do sedaj poznamo v Sloveniji, naseljuje od spodnjega toka izolirane in težko dostopne zgornje odseke potokov soškega in idrijskega porečja. Populacije so sestavljene iz majhnega števila osebkov (npr. število osebkov v populaciji Lipovšček se giblje med 15 in 50; Jesenšek, 2010), pri čemer se pojavlja majhna genetska raznolikost, fiksacija posameznih alelnih variant in posledično potencialna nezmožnost prilagajanja na okoljske spremembe (Jug, 2002). Kadar imamo opravka z majhnimi populacijami, je genetska raznolikost osebkov v populaciji zelo pomembna. Le ta omogoča, da se posameznik uspešno prilagodi na spremenjajoče se okolje, kar pripomore k preživetju populacije. Genetsko pestrost običajno določimo z deležem heterozigotnih genotipov v posamezni populaciji, pri čemer je sama pestrost odvisna od vrste genetskega označevalca (Hendrick, 1999). Deležem heterozigotnih genotipov oz heterozigotnost izmerjena pri osmih genetsko čistih populacijah v Sloveniji s pomočjo alocimskih označevalcev je bila dokaj nizka, saj je znašala 0,022% (Crivelli in sod., 2000). Za primerjavo je pri 19 ogroženih ribjih vrstah zahodne obale ZDA z uporabo alocimskih označevalcev ugotovljena povprečna znotraj-vrstna genetska pestrost 0,034% (vrednosti so se gibale med 0 in 0,093%; Echelle, 1991). Pri zelo ogroženi vrsti zlatovščice (*Salvelinus confluentus*), ki je tik pred izumrtjem, pa je bila genetska pestrost 19 populacij izmerjena z alocimi 0,009% (Leary in sod., 1993). Nizko genetsko pestrost osmih genetsko čistih populacij marmorirane postrvi so ugotovili tudi Fumagalli in sodelavci (2002) na podlagi 15 mikrosatelitnih lokusov. Ugotovili so, da heterozigotna vrednost za osem genetsko čistih populacij marmorirane postrvi v povprečju znaša 0,135, kar je v primerjavi s podobnimi mikrosatelitnimi študijami opravljenimi na drugih sladkovodnih ribjih vrstah (DeWoody in Avise, 2000) dokaj nizka vrednost. Poleg omenjenega so raziskovalci ugotovili, da se kljub temu, da se populacije nahajajo na majhnem območju (zračne razdalja med posameznimi populacijami so manjše od 50 km), med seboj nenavadno močno genetsko razlikujejo. Na primer populacija Huda grapa in populacija Lipovšček, ki sta oddaljeni manj kot 15 km, imata povprečni fiksacijski indeks

(F_{ST} vrednost) 0,79. Med populacijo Huda grapa in Zadlaščica pa je ta vrednost celo 0,88. Genetsko čiste populacije marmorirane postrvi so popolnoma izolirane, pri čemer je pritok osebkov iz spodnjega dela porečja zaradi nepremostljivih ovir onemogočen. Kljub popolni odsotnosti izmenjav genetskega materiala med populacijami in uporabi mikrosatelitnih lokusov, ki imajo visok stopnjo mutacij, so vrednosti F_{ST} običajno veliko nižje. Tako se vrednosti pri salmonidnih populacijah na večjem geografskem območju običajno gibljejo med 0,33 in 0,37 (Taylor in sod., 2001; Koskinen in sod., 2001). Kljub močni genetski različnosti med populacijami pa vse severne populacije marmorirane postrvi v Sloveniji združuje isti haplotip kontrolne regije mtDNA (*marmoratus* MA1 haplotip, Snoj in sod., 2000).

Podobne raziskave na osnovi celotne kontrolne regije mtDNA so opravili tudi Meraner in sodelavci (2007) na marmoriranih postrvih porečja reke Adige (Meraner in sod., 2007), kjer so ugotovili prisotnost treh haplotipov, pri čemer sta prevladovala haplotipa Ma2a in Ma2b. Višja kot je genetska pestrost, boljše so možnosti organizma za prilagoditev na spreminjajoče se okolje. Nizka genetska pestrost je običajno posledica ustanoviteljevega učinka (angl. *founder effect*) in pojava ozkega grla (angl. *bottleneck*) (Lande, 1988). Predvsem slednji močno vpliva na genetsko pestrost osmil slovenskih populacij marmoriranih postrvi (Jesenšek, 2010), ki ležijo v različnih alpskih in predalpskih dolinah na področju, ki je tektonsko zelo aktivno (Schmid in sod., 2004), populacije pa so podvržene številnim vremenskim ujmam. Ob pogostem pojavljanju ozkih grl (Jesenšek, 2010) pa prihaja do izgube znotraj-populacijske genetske variabilnosti (Weir in Cockerham, 1984). Do podobnih opažanj sta prišla tudi Harig in Fauch (2002) pri preučevanju ameriške postrvi (*Oncorhynchus clarki*), ki sta ugotovila, da so ekstremno mrzle zime glavni dejavnik za pojav ozkih grl in posledično zmanjšanje populacijske variabilnosti ameriške postrvi.

2.2 OSNOVE MOLEKULARNE FILOGENETIKE

Molekularna filogenetika je veda, ki na podlagi razlik v nukleotidnem zaporedju različnih skupin organizmov (linijami, vrstami, rodovi, itd.), preučuje njihove evolucijske odnose. Z razvojem vede so se oblikovale številne metode, ki jih delimo glede na postopek obdelave podatkov. Tako ločimo distančne metode, ki poravnano nukleotidno zaporedje najprej pretvorijo v distančno matriko, nato pa takšno matriko uporabijo za izris filogenetskega

drevesa in diskretne metode, ki obravnavajo vsako nukleotidno mesto posebej (Li in Graur, 1991).

Med distančne metode lahko štejemo metodo najnižje evolucije (MIE, angl. *minimum evolution*), ki izbere filogenetsko drevo, katerega seštevek dolžin posameznih vej je najmanjši in metodo sosedskega združevanja (NJ, angl. *neighbor joining*), ki s pomočjo združevanja sosednjih taksonomskih enot v skupine iz popolnoma nerešenega drevesa zvezdaste oblike privede do drevesa, pri katerem je dolžina vseh vej najkrajša (Fitch, 1981; Saitou in Nei, 1987). Med diskretne metode pa štejemo metodo varčnosti (MP, angl. *maximum parsimony*), ki skuša na drevesu rekonstruirati evolucijo posameznih nukleotidnih mest z najmanjšim številom sprememb (najvarčnejše drevo), pri čemer ne skuša določiti, kje na veji drevesa je prišlo do spremembe, ampak samo ali se je ta zgodila (Fitch, 1971), ter metodo največjega verjetja (ML; angl. *maximum likelihood*), ki ocenjuje verjetnost, da iz predlaganega modela in hipoteze o evolucijski zgodovini lahko sklepamo na uporabljen niz podatkov. Tako iz izbranih dreves izbere tisto, ki z najvišjim verjetjem ustreza izbranemu evolucijskemu modelu (Felsenstein, 1978).

Filogenetske metode se delijo tudi po načinu izrisa drevesa, pri čemer poznamo metodo združevanja v skupine (CL; angl. *clustering method*), pri kateri sledimo različnim algoritmom, ki nas pripeljejo do izrisa drevesa in metodo optimalnega kriterija (OC; angl. *optimality criteria*), ki za podajanje ocene povezanosti med podatki in drevesi uporabi izbrane kriterije (preglednica 2).

Preglednica 2: Razvrstitev različnih metod za izris filogenetskega drevesa

Table 2: Classification of different methods for building phylogenetic tree

	distančne metode	diskretne metode
algoritmom združevanja v skupine	NJ	
uporaba optimalne kriterije	MIE	MP, ML

2.2.1 Bayesova statistika v filogenetiki

V zadnjem desetletju se pri reševanju filogenetskih vprašanj vse več in več uporablja Bayesova statistika (npr. Faiile in sod., 2010; Schönhöfer in Martens, 2010; Stoffber in sod., 2010; itd.). Metoda je močno povezana z metodo največjega verjetja in se od nje razlikuje le pri definiciji predhodne distribucije preiskovane vsebine, v našem primeru drevesa (Yang in Rannala, 1997).

Bayesovo sklepanje v filogenetiki temelji na količini, imenovani posteriorna verjetnost (angl. *posterior probability*, slika 4). Posteriorne verjetnosti drevesa ($\text{Pr} [\text{Tree} / \text{Data}]$) se izračuna iz predhodne verjetnosti poteka filogenije ($\text{Pr} [\text{Tree}]$) in verjetja zasnovanega na dobljenih podatkih ($\text{Pr} [\text{Data} / \text{Tree}]$).

$$\text{Pr} [\text{Tree} | \text{Data}] = \frac{\text{Pr} [\text{Data} | \text{Tree}] \times \text{Pr} [\text{Tree}]}{\text{Pr} [\text{Data}]}$$

Slika 4: Formula za izračun posteriorne verjetnosti za izbrano filogenetsko drevo

Figure 4: Equation to calculate the posterior probabilities of selected phylogenetic tree

Na podlagi posteriorne verjetnosti pa so podani sklepi o evolucijskem razvoju vrst/linij/skupin (Larget in Simon, 1999). Čeprav je izračun posteriorne verjetnosti enostaven, je takšne podatke analitično nemogoče obdelati. Obstaja pa veliko število metod, s katerimi lahko posteriorno verjetnost ocenimo. Ena v filogeniji najbolj uporabljenih je Markova veriga Monte Carlo (MCMC, angl. *Markov chain Monte Carlo*, Larget in Simon, 1999) metoda. Osnovna ideja je zgraditi Markovo verigo, ki vsebuje parametre statističnih modelov in statistično porazdelitev, ki sovpada s posteriorno porazdelitvijo parametrov. Pri izrisu filogenetskih dreves uporablja MCMC algoritem dva koraka: (i) vsako novo drevo, ki se predлага, dobimo z obdelavo predhodnega drevesa, (ii) novo drevo se z določeno verjetnostjo sprejme ali zavrže (Hastings, 1970; Metropolis in sod., 1953). Če se drevo sprejme, se le ta ponovno obdelava. Izkaže se, da je pri pravilno postavljeni in ustrezno zagnani Markovi verigi delež pojavnosti drevesa v analizi dober približek posteriorne verjetnosti za to drevo (Tierney, 1994). Čeprav je MCMC algoritem omogočil vključitev številnih kompleksnih modelov, pa ni rešil vseh problemov, pri čemer se lahko zgodi, da veriga ne konvertira na osnovno

porazdelitev. Za to je lahko kriva izbira modelov evolucije ali premajhno število ponovitev pri definiciji predhodne distribucije preiskovane vsebine, v našem primeru drevesa (Yang in Rannnala, 1997).

2.3 OSNOVE POPULACIJSKE GENETIKE

Populacijska genetika je veda, ki preučuje spremembe alelnih frekvenc pod vplivom evolucijskih sil kot je naravna selekcija, naključni genski tok, mutacija in migracija med populacijami. Osnovo populacijske genetike pa tudi kvantitativne genetike, ki je populacijski sorodna, so postavili S. Wright, J.B.S. Haldane in R.A. Fisher (Okasha, 2008).

Za razumevanje populacijske genetike je potrebno spoznati evolucijske sile, pod vplivom katerih se spreminja frekvenca alelov. Ena izmed sil, ki vpliva na genetsko strukturo populacije, je naravna selekcija, ki je opredeljena kot proces, v katerem določene lastnosti omogočajo posamezniku, da v določenem okolju lažje preživi in se razmnožuje (Okasha, 2008). Pomembna sila, ki vpliva na spremembo frekvenca alelov, je tudi vpliv naključja oz. naključni genski tok. Naključni genski tok je pojav, pri katerem so aleli potomcev naključno vzorčeni iz nabora alelov starševskih populacij, kar povzroči spremembo alelnih frekvenc pri potomcih. Pri tem se posamezni alele genetske variante lahko povsem izgubijo, kar lahko močno zmanjša genetsko variabilnost populacije (Masel, 2011). Vir novih alelov so mutacije. Z mutacijo se povečuje variabilnost populacije in posledično povečuje zmožnost populacije za prilagoditev na spremembe v okolju (Okasha, 2008). Poleg vseh naštetih sil pri spremembi alelnih frekvenc v spremljani populaciji igra pomembno vlogo tudi migracija oz. genski pretok. Do genskega pretoka pride, kadar dve populaciji, ki sta običajno iste vrste, izmenjata svoj genetski material. Do srečanja različnih populacij lahko pride zaradi njihove migracije ali prenosa posameznih osebkov. Migracija in parjenje različnih populacij spremeni alelne frekvence preučevane populacije, ob enem pa v populacijo lahko vnese nove alele in poveča njeno variabilnost (Okasha, 2008).

Pomembno teorijo populacijske genetike, ki se uporablja še danes, sta leta 1908 podala angleški matematik G.H. Hardy in nemški zdravnik W. Weinberg (Hardy, 1908). Pri svojem delu ju je predvsem zanimalo, kaj se v času zgodi s frekvencami alelov. Tako sta dokazala, da v velikih populacijah, kjer je prisotno naključno parjenje (angl. *random mating*), frekvenca

alelov ostane v ravnovesju. Na podlagi doganj sta postavila enačbo, ki ponazarja odnose med frekvencami alelov in genotipov v populaciji (ska 4), enačbo pa danes imenujemo Hardy-Weinbergovo ravnotežje (HWE, angl. *Hardy-Weinberg equilibrium*, Emigh, 1980).

$$p + q = 1$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Slika 5: Hardy-Weinbergov teorem (p, frekvenca alela A; q, frekvenca alela a)

Figure 5: Hardy-Weinbergov principle (p , allele A frequency; q , allele a frequency)

Populacija je v HWE, če so frekvence alelov staršev ne odstopajo statistično signifikantno od frekvenc alelov pri njihovih potomcih. Pri samem izračunu pa se predvideva, da je populacija neskončno velika, da je parjenje znotraj populacije naključno, da v populaciji ni mutacij in migracij ter selekcije. Populacije le redko zadostijo vsem navedenim pogojem, zato pri izračunu pogosto prihaja do odstopanja od HWE (Emigh, 1980). Razlog za odstopanje so številni naravni procesi, kot so izolacija populacije, parjenje v sorodstvu, selekcija in pojavljanje ozkih grl (Okasha, 2008).

Med pomembnejše metode populacijske genetike štejemo še metodo zasnovano na osnovi F-statistike, ki jo je podal Wright. Ta temelji na fiksacijskem indeksu (angl. *fixation index*) in meri, kako se na račun parjenja v sorodstvu povečuje homozigotnost (Crow, 1999). Do parjenja v sorodstvu najpogosteje pride zaradi odcepitve dela populacije in nastanka manjše subpopulacije, pri čemer se zmanjša populacijska variabilnost. Za lažjo oceno je Wright podal tri fiksacijske indekse. (i) Individualni fiksacijski indeks (F_{IS}), ki je poznan tudi kot koeficient parjenja v sorodstvu (angl. *inbreeding coefficient*) in nam poda verjetnost, da sta dva alela pri posamezniku sorodna glede na izvor. (ii) Subpopulacijski fiksacijski indeks (F_{ST}), ki nam poda povezanost gamet v subpopulaciji z gametami, ki so prisotne v celotni populaciji. Pri tem primerjamo opazovano heterozigotnost subpopulacije in pričakovano heterozigotnost celotne populacije. Z F_{ST} običajno računamo genetske razlike med subpopulacijami. (iii) Redko pa se za izračun uporablja populacijski fiksacijski indeks (F_{IT}), ki nam poda primerjavo med individualnim in populacijskim koeficientom parjenja v sorodstvu (Crow, 1999).

Pri preučevanju populacij je pomembno, kateri lokusi so povezani (LD; angl. *linkage disequilibrium*). LD je definiran kot nenaključno združevanje alelov dveh ali večih lokusov. Pri tem se nekatere kombinacije alelov v populaciji pojavljajo pogosteje, kot bi lahko pričakovali na podlagi njihove alelne frekvence. Potrebno pa je poudariti, da LD vedno ne pomeni vezanost dveh ali več lokusov na istem kromosomu in omejeno rekombinacijo med njimi, ampak kaže na subpopulacijske strukture. LD temelji na ugotavljanju razlike med ugotovljeno in pričakovano alelno frekvenco. Za populacijo, kjer so aleli oz. genotipi v pričakovanem razmerju, lahko rečemo, da je v equilibriumu. Na LD populacije vplivajo številni dejavniki kot so selekcija, stopnja rekombinacije, stopnja mutacije, genetski tok, nenaključno parjenje in populacijska struktura (Falconer in Mackay, 1996).

Za primerjavo med populacijami je pomembna še genetska distanca, ki se nanaša na razlike med vrstami oz. populacijami znotraj neke vrste. Izračuna se na podlagi števila alelnih zamenjav (mutacij) na preučevanem odseku DNA, do katerih je prišlo po ločitvi primerjanih vrst / populacij. Pri tem nam nižja genetska distanca nakazuje na večjo, višjo genetsko distanco pa na manjšo genetsko povezanost vrst/populacij. Genetska distanca je lahko uporabljena kot mera divergence med populacijami znotraj neke vrste (Falconer in Mackay, 1996).

2.4 SNP OZNAČEVALCI JEDRNE DNA IN NJIHOVA UPORABNOST V

FILOGENETSKIH IN POPULACIJSKO GENETSKIH ŠTUDIJAH

V preteklosti se je za reševanje filogenetskih in populacijskih odnosov med vrstami in populacijami uporabljala mtDNA (Avise 1994, Castro in sod. 1998, Renoult in sod., 2009) ter alocimi (Hartl in sod., 1994), njim pa so sledili izjemno variabilni mikrosateliti na jedrni DNA (Sekino in Hara, 2001). Z razvojem hitrih, cenovno ugodnih in zanesljivih metod določanja nukleotidnega zaporedja ter razvojem orodij bioinformatike pa so se trendi v filogeniji in populacijski genetiki spremenili (Emerson in sod., 2001). Tako se je začelo za filogenetske in populacijsko genetske študije vse bolj uporabljati polimorfizme posameznih nukleotidov na jedrni DNA (t.i. SNP-je) (Garvin in sod., 2010). SNP-ji so po genomu neenakomerno porazdeljeni, nahajajo pa se tako v kodirajočih, nekodirajočih kot tudi medgenskih odsekih DNA (Vignal in sod., 2002). Pri pogostnosti njihovega pojavljanja ima pomembno vlogo naravna selekcija ter stopnja mutacij in rekombinacij. V primerjavi z

ostalimi označevalci je njihova prednost v dobi primerljivosti rezultatov med različnimi laboratoriji, enostavnih metodah njihovega odkrivanja, majhnem številu napak pri njihovem odčitavanju, pogostem pojavljanju v genomu, enostavnem mutacijskem modelu, itd. (Brumfield in sod. 2003; Morin in sod. 2004).

V filogenetskih študijah, kjer so pomembni evolucijski odnosi med vrstami oz. populacijami, je pomembno, da so analizirani SNP-ji enakomerno razporejeni po genomu ter s tem odražajo stanje celotnega genoma (Kliman in sod., 2000). Na ta način lahko z različnimi modeli evolucije, ki jih določimo za posamezen lokus in z različnimi filogenetskimi programi, ki delujejo na različnih statističnih principih, podamo evolucijsko zgodovino rodu/vrste (Machado in sod., 2002). Iz števila zamenjav in glede na poznane dogodke iz paleozgodovine pa lahko ocenimo okviren čas ločitve preučevanih taksonov od skupnega prednika (Nielsen, 2000).

V populacijskih študijah se SNP-ji uporabljajo za analize demografije in populacijske strukture. Pri tem lahko s pomočjo določanja variabilnosti izračunamo efektivno velikost populacije (N_e , angl. *effective population size*, Tenesa in sod., 2007), migracije (Keller in sod., 2008), rast oz. upad velikosti populacije (Emerson in sod., 2001; Hyten in sod., 2006), parjenje v sorodstvu (Zenger in sod., 2007) itd. SNP označevalci se vse več uporabljajo tudi pri določanju starševstva (Heaton in sod., 2002) in identifikaciji mutacij, ki so povezane z lokalnim prilagajanjem (Namroud in sod., 2008). Pomembna aplikacija SNP označevalcev v populacijskih študijah je tudi ločevanje genetsko čistih osebkov v conah križanja, kjer prihaja do izmenjave genetskega materiala med različnimi vrstami, linijami, populacijami (Smith in sod., 2005). Pri tem lahko z zadostnim naborom neodvisnih SNP-jev ocenimo deleže genoma v populaciji, ki pripadajo starševskim linijam (Edwards, 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS PREUČEVANIH VZORCEV

3.1.1 Iskanje linijsko značilnih polimorfizmov posameznih nukleotidov

Pri iskanju linijsko značilnih SNP-jev smo testirali 120 vzorcev postrvi, ki so predstavljali tri različne filogenetske linije (marmorirana postrv, 40 vzorcev; potočna postrv AT linije, 40 vzorcev; potočna postrv DA linije, 40 vzorcev; preglednica 3). Filogenetska linija vzorcev je bila predhodno dokazana z mtDNA in mikrosatelitnimi označevalci (Fumagalli in sod., 2002; Jug in sod., 2005; Kohout in sod., 2012; Razpet in sod., 2007b; Skaala in Solberg, 1997; Snoj in sod., 2000; Sušnik in sod., 2007a, b).

Preglednica 3: Vrsta ali linija vzorcev, opis mesta vzorčenja ter število vzorcev posamezne populacije uporabljenih za iskanje SNP-jev, validacijo, genotipizacijo in potrditev diagnostičnih SNP-jev (N* število vzorcev pri iskanju SNP-jev / validaciji genotipizacije / potrditvi diagnostičnih SNP-jev / referenčni vzorci pri analizi populacijske strukture marmorirane postrvi)

Table 3: Species (lineage) of samples, sampling location and number of samples per population used in SNP searching, validation of genotyping system and diagnostic SNP detection (N* number of samples used for SNP discovery / validation of genotyping protocol / diagnostic SNP determination / reference samples used in population structure analyses of marble trout)

Populacija	Vrsta (linija)	Koordinate vzorčenja	Država izvora	N*
Otra	<i>Salmo trutta</i> (atlantska)	58°33'55" N 7°46'13" E	Norveška	1/1/5/3
Ribogojnica Spjarup	<i>Salmo trutta</i> (atlantska)	55°38'52" N 9°15'59" E	Danska	1/1/5/3
Gradiščica	<i>Salmo trutta</i> (atlantska)	45°48'48" N 14°29'33" E	Slovenija	1/1/5/3
Brinta	<i>Salmo trutta</i> (atlantska)	46°14'0" N 13°39'39" E	Slovenija	1/1/5/3
Cerkniščica	<i>Salmo trutta</i> (atlantska)	45°49'7" N 14°28'21" E	Slovenija	1/1/5/3
Kolowrat	<i>Salmo trutta</i> (atlantska)	50°36'22" N 15°9'49" E	Češka	1/1/5/3
Zlaty potok	<i>Salmo trutta</i> (atlantska)	49°5'52" N 14°5'11" E	Češka	1/1/5/3
Bily potok	<i>Salmo trutta</i> (atlantska)	50°37'9" N 13°35'6" E	Češka	1/1/5/3
Ribnica	<i>Salmo trutta</i> (donavska)	46°18'42" N 13°54'48" E	Slovenija	1/1/5/3
Sovpot	<i>Salmo trutta</i> (donavska)	46°7'26" N 14°13'40" E	Slovenija	1/1/5/3
Mahnečica	<i>Salmo trutta</i> (donavska)	46°48'36" N 14°26'32" E	Slovenija	1/1/5/3
Izvir Dravinje	<i>Salmo trutta</i> (donavska)	46°26'18" N 15°20'39" E	Slovenija	1/1/5/3
Mošenik	<i>Salmo trutta</i> (donavska)	46°24'57" N 14°16'9" E	Slovenija	1/1/5/3
Resniški potok	<i>Salmo trutta</i> (donavska)	46°26'16" N 15°21'26" E	Slovenija	1/1/5/3
Suhadolnica	<i>Salmo trutta</i> (donavska)	46°28'14" N 43°59'29" E	Slovenija	1/1/5/3
Mislinja	<i>Salmo trutta</i> (donavska)	46°27'50" N 15°17'0" E	Slovenija	1/1/5/3
Sevnica	<i>Salmo marmoratus</i>	46°4'15" N 13°56'5" E	Slovenija	1/1/5/3
Studenca	<i>Salmo marmoratus</i>	46°2'41" N 13°54'31" E	Slovenija	1/1/5/3
Idrijca	<i>Salmo marmoratus</i>	46°0'41" N 13°53'35" E	Slovenija	1/1/5/3
Huda grapa	<i>Salmo marmoratus</i>	46°12'6" N 13°54'31" E	Slovenija	1/1/5/3
Zadlaščica	<i>Salmo marmoratus</i>	46°13'10" N 13°46'16" E	Slovenija	1/1/5/3
Trebušnica	<i>Salmo marmoratus</i>	46°0'11" N 13°52'32" E	Slovenija	1/1/5/3
Predelica	<i>Salmo marmoratus</i>	46°24'42" N 13°36'12" E	Slovenija	1/1/5/3
Lipovšček	<i>Salmo marmoratus</i>	46°13'18" N 13°49'31" E	Slovenija	1/1/5/3

3.1.2 Filogenetska analiza rodu *Salmo* (atlantski losos in postrvi)

Za filogenetsko analizo rodu *Salmo* smo uporabili 76 vzorcev iz 36 lokacij navedenih v preglednici 4. Vzorci so bili razdeljeni na skupine glede na njihovo trenutno znano filogenetsko poreklo oz. taksonomska razvrstitev: marmorirana postrv (*S. marmoratus*; 18

vzorcev) iz devetih lokacij, potočna postrv (*Salmo trutta*; 40 vzorcev) petih filogenetskih linij (DA, AT, AD, ME; DU), belvica (*Salmo ohridanus*; dva vzorca), zubatak (*Salmo dentex*; štirje vzorci) iz dveh lokacij in vzorci štirih populacij mehkoustnih postrvi (*Salmo obtusirostris*; osem vzorcev). Kot zunanjika (angl. *outgroup*) smo za izris filogenetskega drevesa uporabili po dva vzorca najstarejšega predstavnika rodu *Salmo* (atlantskega lososa; *Salmo salar*) in dva vzorca vrste *Parahucho perryi*, ki je glede na analize nekaterih avtorjev najbližje soroden rodu *Salmo* (Crespi in Fulton, 2004).

Preglednica 4: Vrsta, mtDNA filogenetska linija, mesto vzorčenja, število analiziranih vzorcev na lokacijo (Štv.) ter skupine pri *BEAST analizi (*B.)

Table 4: Species name, mtDNA phylogenetic lineage, location of sampling, the number of analyzed samples per location (Štv.) and defined groups used in *BEAST analyses (*B.)

Vrsta (vrstno poimenovanje)	Filogenetska linija	Izvorna lokacija (država)	Štv.	*B.
Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	marmorirana	Predelca (SLO)	2	1
Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	marmorirana	Zadlaščica (SLO)	2	1
Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	marmorirana	Studena (SLO)	2	1
Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	marmorirana	Trebuščica (SLO)	2	1
Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	marmorirana	Idrijca (SLO)	2	1
Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	marmorirana	Lipovšček (SLO)	2	1
Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	marmorirana	Huda grapa (SLO)	2	1
Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	jadranska	Neretva (SLO)	2	2
Marmorirana postrv (<i>Salmo marmoratus</i>)	jadranska	Zeta (MNE)	2	2
Zubatak (<i>Salmo dentex</i>)	jadranska	Neretva (BIH)	2	2
Zubatak (<i>Salmo dentex</i>)	jadranska	Zeta (MNE)	2	3
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	mediteranska	Sardinija (ITA)	2	4
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	donavska	Ribnica (SLO)	2	5
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	donavska	Sovpot (SLO)	2	5
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	donavska	Mahnečica (SLO)	2	5
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	donavska	Kremžarjev potok (SLO)	2	5
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	donavska	Mošenik (SLO)	2	5
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	donavska	Studena (SRB)	2	5
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	donavska	Vratovina (SRB)	2	5
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	atlantska	Mount Lassen (USA)	2	6
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	atlantska	Ribogojnica Povodje (SLO)	2	6
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	atlantska	Otra (NOR)	2	6
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	atlantska	Danska ribogojnica (DK)	2	6
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	atlantska	Jadransko morje (SLO)	2	6
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	jadranska	Neretva (BIH)	2	3

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta (vrstno poimenovanje)	Filogenetska linija	Izvorna lokacija (država)	Štv.	*B.
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	jadranska	Zeta (MNE)	2	3
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	jadranska	Zrmanja (HR)	2	3
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	jadranska	Krka (HR)	2	3
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	jadranska	Bistrica (ALB)	2	3
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	jadranska	Ohridsko jezero (FYROM)	2	3
Potočna postrv (<i>Salmo trutta</i>)	duero	Duero (ESP)	2	7
Mehkoustna postrv (<i>Salmo obtusirostris</i>)		Vrlika (HR)	2	8
Mehkoustna postrv (<i>Salmo obtusirostris</i>)		Neretva (BIH)	2	9
Mehkoustna postrv (<i>Salmo obtusirostris</i>)		Jadro (HR)	2	8
Mehkoustna postrv (<i>Salmo obtusirostris</i>)		Zeta (MNE)	2	8
Belvica (<i>Salmo ohridanus</i>)		Ohridsko jezero (FYROM)	2	10
Losos (<i>Salmo salar</i>)		Danska ribogojnica (DK)	2	11
(<i>Parahucho perryi</i>)		Koppi, Ohotsko morje (RUS)	2	12

3.1.3 Določanje populacijsko genetske strukture severnih populacij marmorirane postrvi

Pri določanju populacijsko genetske strukture severnih populacij marmorirane postrvi smo v rekah severnega jadranskega porečja vzorčili na 50 različnih lokacijah v Sloveniji in dveh lokacijah v Italiji, pri čemer smo število vzorcev na lokacijo omejili na 25 (slika 6). Da bi lahko testirali hipotezo, ali so postrvi v času pleistocenske poledenitve prehajale med jadranskim in sosednjim donavskim, smo vzorčili še na desetih rekah, ki neposredno mejijo na jadransko porečje. Poleg preučevanih vzorcev smo v analize vključili še tri referenčne skupine (genetsko čiste marmorirane in potočne postrvi AT in DA filogenetske linije), ki so navedene v preglednici 3, pri čemer smo od vsake populacije vključili po tri vzorce (skupno 24 vzorcev na populacijo). Zaradi lažje interpretacije rezultatov smo lokacije vzorčenja glede na povodja rek razdelili v geografsko opredeljene skupine: zgornji tok Soče (od izvira do Mosta na Soči), spodnji tok Soče (od Mosta na Soči do državne meje med Slovenijo in Italijo), Idrijca, Vipava, Rižana, Reka, Adige in donavsko porečje (preglednica 5).

Preglednica 5: Mesto vzorčenja, oznaka in število vzorcev, geografsko opredeljene skupine (zgt.-zgornji tok, spt.-spodnji tok), status populacije (Stp.; CK-cona križanja, M-populacija genetsko čistih marmoriranih postrvi, P-populacija genetsko čistih potočnih postrvi) in koordinate mesta vzorčenja

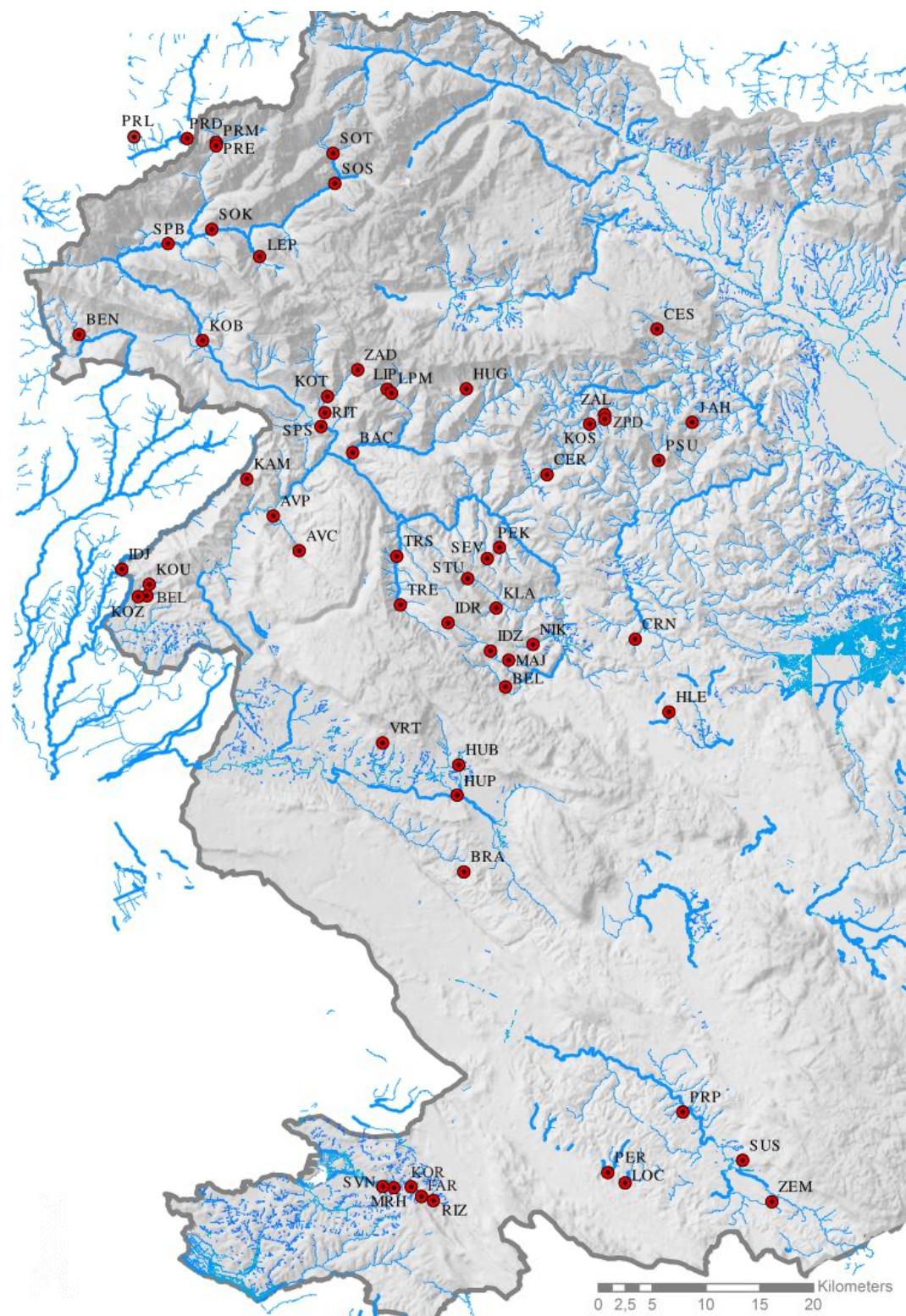
Table 5: Location, abbreviation and number of samples, geographically defined groups (zgt.-upper part, spt.-lower part), population status (Stp.; CK-hybrid zone, M-genetically pure marble trout population, P-genetically pure brown trout population) and coordinates of sampling location

Oznaka	Mesto vzorčenja	Število vzorcev	Opredeljene skupine	Porečje	Stp.	Koordinate lokacije
AVC	Avšček izvir	15	Soča spt.	jadransko	CK	N46°04'11" E13°42'39"
AVP	Avšček pod pregrado	13	Soča spt.	jadransko	CK	N46°05'54" E13°40'43"
BAC	Bača pri Modreju	20	Idrijca	jadransko	CK	N46°09'09" E13°46'20"
BEL	Belca	20	Soča spt.	jadransko	CK	N45°57'31" E13°57'38"
BEN	Bela	20	Soča zgt.	jadransko	CK	N46°14'48" E13°26'26"
BEP	Belski potok	15	Soča spt.	jadransko	CK	N46°01'46" E13°31'42"
BRA	Branica	25	Vipava	jadransko	CK	N45°48'12" E13°54'48"
CER	Cerknica	25	Idrijca	jadransko	CK	N46°08'09" E14°00'28"
CES	Češnica	25	Sava	donavsko	CK	N46°15'31" E14°08'14"
CRN	Črna	25	Sava	donavsko	CK	N45°59'59" E14°06'54"
FAR	Faremski potok	25	Rižana	jadransko	CK	N45°31'54" E13°52'06"
HLE	Hleviščica	25	Sava	donavsko	CK	N45°56'21" E14°09'24"
HUB	Hubelj izvir	25	Vipava	jadransko	CK	N45°53'34" E13°54'17"
HUP	Hubelj pri sotočju z Vipavo	25	Vipava	jadransko	CK	N45°52'03" E13°54'15"
HUG	Huda grapa	25	Idrijca	jadransko	M	N46°12'25" E13°54'30"
IDJ	Idrija	25	Soča spt.	jadransko	CK	N46°03'06" E13°29'52"
IDR	Idrijca izvir	25	Idrijca	jadransko	M	N46°00'41" E13°53'26"
IDZ	Idrijca pri Belci	25	Idrijca	jadransko	CK	N45°59'18" E13°56'31"
IEIS	Eisack	25	Adige	jadransko	CK	N46°30'00" E11°24'00"
IPAS	Passer	25	Adige	jadransko	CK	N46°48'00" E11°14'00"
JAH	Jahodnica	25	Sava	donavsko	P	N46°10'53" E14°10'53"
KAM	Kambrešček	25	Soča spt.	jadransko	CK	N46°07'44" E13°38'46"
KLA	Klavžarca	23	Idrijca	jadransko	CK	N46°01'28" E13°56'52"
KOB	Soča pri Kobaridu	25	Soča zgt.	jadransko	CK	N46°14'37" E13°35'22"
KOR	Kortinska mlinščica	25	Rižana	jadransko	CK	N45°32'16" E13°51'22"
KOS	Košanov graben	21	Sava	donavsko	P	N46°10'44" E14°03'27"
KOT	Korita Tolminke in Zadlaščice	12	Soča spt.	jadransko	CK	N46°11'56" E13°44'30"
KOU	Kožbanjšček izvir	23	Soča spt.	jadransko	CK	N46°02'23" E13°31'51"
KOZ	Kožbanjšček pri parku	25	Soča spt.	jadransko	CK	N46°01'44" E13°31'04"
LEP	Lepena	25	Soča zgt.	jadransko	CK	N46°19'17" E13°38'53"
LIP	Lipovšček izvir	25	Idrijca	jadransko	M	N46°12'20" E13°48'46"
LOC	Ločki potok	25	Reka	jadransko	CK	N45°32'43" E14°06'37"
LPM	Lipovšček pri elektrarni	25	Idrijca	jadransko	CK	N46°12'09" E13°49'07"

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka	Mesto vzorčenja	Število vzorcev	Opredeljene skupine	Porečje	Stp.	Koordinate lokacije
MAJ	Majnški potok	20	Idrijca	jadransko	CK	N45°58'51" E13°57'49"
MRH	Mlinjčica pri rdeči hiši	25	Rižana	jadransko	CK	N45°32'19" E13°50'11"
NIK	Nikovo	15	Idrijca	jadransko	CK	N45°59'39" E13°59'34"
PEK	Peklenski potok	25	Idrijca	jadransko	CK	N46°04'29" E13°57'03"
PER	Perilo	25	Reka	jadransko	CK	N45°33'14" E14°05'23"
PRD	Rio Verde	8	Drava	donavsko	CK	N46°24'44" E13°33'59"
PRE	Predelica	25	Soča zgt.	jadransko	M	N46°24'34" E13°36'07"
PRL	Rio Bianco	17	Drava	donavsko	CK	N44°25'10" E13°32'03"
PRM	Sotočje Predelce in Koritnice	25	Soča zgt.	jadransko	CK	N46°24'24" E13°36'20"
PRP	Premski potok	25	Reka	jadransko	CK	N45°36'18" E14°10'41"
PSU	Potok Suša	19	Sava	donavsko	CK	N46°08'57" E14°08'28"
RIT	Tolminka pri ribogojnici	15	Soča spt.	jadransko	CK	N46°11'07" E13°44'19"
RIZ	Rižana izvir	25	Rižana	jadransko	CK	N45°31'43" E13°52'57"
SEV	Sevnica	25	Idrijca	jadransko	M	N46°03'56" E13°56'11"
SOK	Soča pri Kršovcu	25	Soča zgt.	jadransko	CK	N46°20'13" E13°35'55"
SOS	Soča pri gramoznici	25	Soča zgt.	jadransko	CK	N46°22'35" E13°44'44"
SOT	Soča v Trenti	25	Soča zgt.	jadransko	CK	N46°24'06" E13°44'35"
SPB	Soča pri Bovcu	25	Soča zgt.	jadransko	CK	N46°19'26" E13°32'47"
SPS	Sotočje Soče in Tolminke	20	Soča spt.	jadransko	CK	N46°10'26" E13°44'03"
STU	Studenca	25	Idrijca	jadransko	M	N46°02'54" E13°54'49"
SUS	Sušec	25	Reka	jadransko	CK	N45°33'54" E14°15'00"
SVN	Sveta nedelja	15	Rižana	jadransko	CK	N45°32'25" E13°49'22"
TRE	Trebušnica	25	Idrijca	jadransko	M	N46°01'33" E13°49'59"
TRS	Trebuščica v coni križanja	25	Idrijca	jadransko	CK	N46°04'00" E13°49'41"
VRT	Vratovinšček	25	Vipava	jadransko	CK	N45°54'37" E13°48'50"
ZAD	Zadlaščica	25	Soča spt.	jadransko	M	N46°13'17" E13°46'39"
ZAL	Zala	25	Sava	donavsko	P	N46°11'13" E14°04'32"
ZEM	Zemon	24	Reka	jadransko	CK	N45°31'52" E14°17'07"
ZPD	Desni pritok Zale	23	Sava	donavsko	P	N46°11'03" E14°04'42"



Slika 6: Zemljevid z označenimi mesti vzorčenja (obe populaciji porečja reke Adige sta označeni na sliki 17, okrajšave mest vzorčenj so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 6: Map of sampling locations (both populations from the Adige tributary are listed in figure 17, the abbreviations of sampling locations are explained in table 5)

3.2 VZORČENJE IN IZOLACIJA DNA

Vzorčenje je potekalo s pomočjo elektro-bencinskega nahrbtnega agregata med leti 2008 in 2010 na izbranih lokacijah (slika 6). Ribe smo narkotizirali in jim odvzeli približno 2-4 mm² analne plavuti. Vsak vzorec smo shranili v posamezno 2,5 ml mikrocentrifugirko z navojem, ki je vsebovala 96% etanol. Ribe smo po odvzemu vzorca spustili na mestu, kjer so bile ulovljene. Iz zbranih vzorcev smo po metodi izsoljevanja (Miller in sod., 1988) izolirali celokupno DNA.

3.3 ISKANJE POLIMORFNIH ODSEKOV JEDRNE DNA

Iskanja odsekov jedrne DNA, kjer bi se lahko nahajala polimorfna mesta, smo se lotili na dva načina. (i) Pri prvem načinu smo po protokolu opisanem v Sušnik (2001) izdelali delno genomsko knjižnico marmorirane postrvi. Pri tem smo 400-800 baznih parov dolge fragmente genomske DNA dobljene z restriktionskim encimom *Sau3AI* vstavili v vektor pGEN®-T (Promega). Sledila je transformacija *E. coli* seva JM109 (Promega) s temperaturnim šokom in gojenje transformiranih celic. Iz 200 naključno izbranih pozitivnih klonov smo izolirali vstavljen vektor in s pomočjo ABI 3130 XI genskega analizatorja po protokolu BigDye Terminator v3.1 (AB; Applied Biosystems) določili nukleotidno zaporedje inserta (fragmenta, ki smo ga ligirali v vektor). (ii) Pri drugem načinu smo v literaturi in NCBI (angl. *National Center for Biotechnology Information*) podatkovni zbirkki poiskali nukleotidna zaporedja v jedrnem genomu marmorirani postrvi sorodnih salmonidnih vrst (potočna postrv in atlantski losos).

3.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO, DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA IN ISKANJE POLIMORFIZMOV POSAMEZNIH NUKLEOTIDOV

Na robnih delih 280 dobljenih nukleotidnih zaporedij (180 iz delne genomske knjižnice, 100 iz literature) smo s programom Oligo 3 (Molecular Biology Insights, USA) poskušali določili optimalne začetne oligonukleotide. Izmed 280 smo izbrali 100 zaporedij dolgih med 300 in 1000 baznih parov, na podlagi katerih smo izdelali začetne oligonukleotide, ki so imeli optimalno temperaturo prileganja (med 50 in 60°C), dolžino (med 18 in 25 baznih parov), delež gvanina in citozina (med 30 in 70%) ter minimalne vrednosti medsebojnega parjenja. Izbrane začetne oligonukleotide smo nato uporabili v verižni reakciji s polimerazo (PCR;

angl. *polymerase chain reaction*), pri čemer smo pomnožili odseke 24 vzorcev iz 24 lokacij (osem marmoriranih postrvi ter osem potočnih postrvi AT in osem DA filogenetske linije). Podatki o mestu vzorčenja izbranih vzorcev so navedeni v preglednici 3. Reakcije PCR smo izvedli v namiznem mikroprocesorsko vodenem termostatu GeneAmp®PCRSystem2720 (AB Applied Biosystems), pri čemer smo uporabili 25 μ l mešanico, ki je vsebovala:

- 50 ng vzorčne DNA
- 0,5 μ l posameznega začetnega oligonukleotida (izbrani začetni oligonukleotidi so navedeni v prilogi A)
- 0,2 mM vsakega nukleotida (dNTP)
- 1,5 mM MgCl₂
- 1 mM PCR pufra
- 1 enoto Taq polimeraze (Fermentas)

Pogoji verižne reakcije s polimerazo so bili:

• začetna denaturacija	94°C	3 minute	35 ciklov
• denaturacija	94 °C	45 sekund	
• prileganje začetnih oligonukleotidov	glej priloga A	20 sekund	
• podaljševanje	72 °C	60 sekund	
• končno podaljševanje	72 °C	5 minut	

Čiščenje produktov PCR ter določanje nukleotidnih zaporedji je bilo opravljeno v Macrogen Inc. (Koreja), pri čemer so bili uporabljeni začetni oligonukleotidi na 5' -koncu (F oligonukleotidi; preglednica 6). Dobljena nukleotidna zaporedja 78 različnih odsekov jedrne DNA pri 24 vzorcih smo poravnali s pomočjo programa Clustal W (Thompson in sod., 1994). Na osnovi poravnave smo določili mesta s polimorfizmi posameznih nukleotidov.

3.5 DOLOČANJE FILOGENETSKEGA ODNOŠA MED VRSTAMI RODU *Salmo*

Za določitev filogenetskega odnosa vrst rodu *Salmo* smo uporabili 22 lokusov, ki so kazali največjo variabilnost pri poravnavi 24 izbranih vzorcev. Izbrani lokusi, nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov in temperatura prileganja v PCR so razvidni iz preglednice 6. Pogoji, pod katerimi je bila izvedena reakcija PCR, so navedeni v poglavju 3.4. V analizo je bilo vključenih 76 postrvi iz 38 lokacij (preglednica 4). Določanje nukleotidnega zaporedja

pomnoženih fragmentov DNA je opravilo podjetje Macrogen Inc. (Koreja). Zaporedja smo anotirali s pomočjo podatkovne zbirke NCBI in orodja BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri filogenetski analizi rodu *Salmo*, temperatura njihovega prileganje in zaporedna številka lokusa v genetski banki (anotirani lokusi so označeni z *)

Table 6: Primers used in phylogenetic analyses of *Salmo* genus, their annealing temperature and locus Genbank accession number (annotated loci are marked with *)

Lokus	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida	T _a (°C)	Genska banka
GP1	F: 5'-AGGTGGTAGAATGGACAAGTCA-3' R: 5'-AGGGAGGGAGGGATAAGAG-3'	56	HM066787-HM066820
GP4	F: 5'-GACTGGGATTACTAGATATGGG-3' R: 5'-GAAACCGGAATGGATAG-3'	60	HM066821-HM066825
GP5	F: 5'-GATTCTTGGTTGGACTTGATTGTT-3' R: 5'-AAGAGCTCCAGTGGTCCGATA-3'	52	HM066826-HM066832
GP14	F: 5'-CGGAGCAGAGGGAGTTGAGT-3' R: 5'-ACCTGCACACTAATAAACAAACAAA-3'	61	HM635380-HM635384
GP16	F: 5'-AAGGGCACATATAAACGAACA-3' R: 5'-ATGGTGATGAAGAAGGTGGTTATGG-3'	60	HM066833-HM066843
GP31	F: 5'-AGACCAGGAGGGTATTACTAACACACA-3' R: 5'-AAGTTTCAGTACTTGGCATTGAT-3'	52	HM066844-HM066847
GP34	F: 5'-CTTGAACTGTTGGCATGTAGG-3' R: 5'-AACACCACAGGCCACTATT-3'	61	HM066848-HM066862
GP37*	F: 5'-GTATGTGCCATATTCTATGCTT-3' R: 5'-CAGAATGTCAGCCAACTCC-3'	52	HM066863-HM066874
GP38	F: 5'-CAAAGAAATATGGCAAAC-3' R: 5'-AGCCATTTCATTGTTGATAAT-3'	56	HM066875-HM066883
GP42	F: 5'-TATCAGGTCACTCCAATGTCAAG-3' R: 5'-ATAATCAATGTACATGCGAAAA-3'	61	HM066884-HM066891
GP73	F: 5'-GGCACTCCCTGTATATAGCTTC-3' R: 5'-AGAGCTCACGGTTTACCA-3'	61	HM066892-HM066902
GP81	F: 5'-TGGGTACTAGCTAGCTATATATGA-3' R: 5'-CCAAGTGATTGTGTTGATATGGT-3'	61	HM635402-HM635412
GP85	F: 5'-CAGCATCCAGCCAATATCAT-3' R: 5'-CACTGCCACTTGTGTTGTAGA-3'	61	HM066903-HM066925
GP94	F: 5'-TTCTATATTGTGCAGTTAGCTGT-3' R: 5'-TACCTTACCTTATGGGA-3'	52	HM066926-HM066934

se nadaljuje

nadaljevanje

Lokus	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida	T _a (°C)	Genska banka
HMGI* ²	F: 5'-TCAATCCCTGATAGTTGTCTTG-3' R: 5'-GGGACACCCCTGATTAAATTGTAG-3'	61	HM066730-HM066737
SS2* ³	F: 5'-CACTGCAGTAAGGATTATCTGCTT-3' R: 5'-GAGGAAGAGCGAGGAAGATAAAG-3'	61	HM066738-HM066747
TFGB-beta* ⁴	F: 5'-GTGAGACTATCCTTATTCCAACG-3' R: 5'-TGTGGTTGGGTAAACAAACAGTAGA-3'	61	HM066748-HM066768
Tnfa* ⁵	F: 5'-CTTTCATTAATTGCTTCTCACT-3' R: 5'-GCAGTAGAACAGAACAGGTTCAT-3'	56	HM066769-HM066786
RH* ⁶	F: 5'-CXTATGAATAYCCTAGTACTACC-3' R: 5'-CCRCAGCACARCGTGGTGATCATG-3'	60	HM635423-HM635433
SILVA* ⁷	F: 5'-CATAACAACGGACTTTGGTG-3' R: 5'-TTACTGTAGCTCCCTGTGTGG-3'	60	HM635434-HM635446
SL* ⁸	F: 5'-TGGCCCGTTGAATCCATATAAAG-3' R: 5'-ACTGTGAAACACTAAGCTCTCCA-3'	52	HM635451-HM635457
TF* ⁹	F: 5'-CCAGTCTCCTTTACCCCTACT-3' R: 5'-CTTGACGGCCACCAAGTTT-3'	60	HM 635463-HM635470

*¹ DOT1-like histone H3 methyltransferase

*² High mobility group-T protein gene, exon 3 and partial cds

*³ Ependymin gene, exon 2 and partial cds

*⁴ Transforming growth factor beta-1 gene, partial cds

*⁵ Tumor necrosis factor alpha gene, partial cds

*⁶ Rhodopsin gene, partial cds

*⁷ Silver-like protein A gene, partial cds

*⁸ Somatolactin gene, intron

*⁹ Transferrin gene, partial cds

3.5.1 Poravnava nukleotidnih zaporedij in preverjanje prisotnosti pozitivne selekcije

Nukleotidna zaporedja vseh 22 lokusov (preglednica 6) smo za posamezen osebek združili in za vse osebke poravnali s programom Clustal W (Thompson in sod., 1994). Z uporabo programa Mega 4 (Tamura in sod., 2007) in Nei-Gojobori metode (Nei in Gojobori, 1986) smo vsak posamezen lokus testirali na njegovo podvrženost pozitivni selekciji (HA:dN>dS).

3.5.2 Izris drevesa po metodi največjega verjetja

Z uporabo programa jModeltest 3.06 (Posada, 2008) in Bayesovega informacijskega kriterija (BIC, Schwarz, 1978) smo posameznemu lokusu določili evolucijski model, ki opisuje potek substitucij v analiziranih zaporedjih. Dobljeni evolucijski modeli so bili upoštevani pri izrisu drevesa in so za posamezen lokus navedeni v preglednici 7. Za izris filogenetskega drevesa

smo uporabili program GARLI 0.96b8 (angl. *Genetic Algorithm for Rapid Likelihood*, Zwickl, 2006), ki deluje po ML metodi. Pri analizi smo dolžino niza programa nastavili na neomejeno število generacij, pri čemer se je niz zaradi nespremenjene signifikantne vrednosti naravnega logaritma verjetja ($\ln L < 0,01$) samodejno zaključil po 20.000 generacijah.

3.5.3 Izris drevesa z uporabo Bayesove statistike

Filogenetsko drevo smo izrisali še s programom MrBayes 3.1.2 (Ronquist in Huelsenbeck, 2003), ki uporablja Bayesov pristop. Pred izrisom drevesa smo posameznemu lokusu s pomočjo programa MrModeltest 2.3 (Nylander in sod., 2004) in PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) z uporabo Akaike informacijskega kriterija (AIC, Akaike, 1974) določili najverjetnejši evolucijski model (preglednica 7). Program MrBayes je začel analizo podatkov z naključno izbranim drevesom in je tekel štiri Markove verige po en milijon generacij, dokler povprečna standardna deviacija ni padla pod 0,01, pri čemer je vzorčil vsako 100 drevo (kar je skupaj naneslo 10.000 dreves). S programom AWTY (angl. *Are We There Yet*, Nylander in sod., 2008) smo po končani analizi tudi grafično preverili, ali je le-ta potekala zadostno število generacij pred ustavitevijo (ali je analiza konvergirala).

3.5.4 Izris drevesa s *BEAST analizo

Poleg obeh že opisanih metod smo pri rekonstrukciji drevesa vrst/linij (ang. *species tree*), nukleotidna zaporedja analizirali še s program BEAST 1.7.2. (Drummond in Rambaut, 2007), s katerim smo opravili *BEAST analizo (Heled in Drummond, 2010). Program BEAST prav tako kot MrBayes uporablja Bayesovo statistiko in je predvsem uporaben, kadar imamo opravka z zelo sorodnimi vrstami. Program na osnovi razlik med drevesi genov izriše najverjetnejše drevo vrst/linij, pri čemer uporablja MCMC algoritem.

Vse predhodne nastavitev so bile izvedene v programu BEAUTi 1.7.0 (Drummond in Rambaut, 2007), ki nam omogoča oblikovanje XML vnosne datoteke za program BEAST. Pri nastavitevah smo upoštevali evolucijski model (preglednica 7) izračunan s programom jModeltest 3.06 (Posada, 2008) upoštevajoč Bayesov informacijski kriterij (BIC, Schwarz, 1978). V programu BEAUTi 1.7.0 smo substitucijski model (angl. *substitution model*), model molekularne ure (angl. *clock model*) in model opisa genealoških odnosov sekvenč drevesa (angl. *tree model*) nastavili kot nepovezane med različnimi lokusi, pri čemer je bil model

molekularne ure nastavljen kot sproščen model z logaritemsko normalno porazdelitvijo (angl. *relaxed lognormal clock*). Pri nastavitev parametrov smo na osnovi filogenetskega drevesa dobljenega z metodo največjega verjetja določili najverjetnejše taksoniske enote (razdelitev v skupine je razvidna iz preglednice 4). S pomočjo prosto dostopnega portala CIPRES Science Gateway 3.3 (<http://www.phylo.org/index.php/portal/>), ki je namenjen analizi obsežnih filogenetskih dreves, smo svojo predhodno oblikovano XML datoteko analizirali s programom BEAST. Analizirali smo sedem neodvisnih simulacij, pri čemer je vsak niz potekal 320 milijonov generacij z vzorčenjem vsake 30.000 generacije. Vsak niz smo nato s pomočjo programa Tracer 1.5 (Rambaut in Drummond, 2007) neodvisno analizirali. S programom LogCombiner 1.5.3 (Drummond in Rambaut, 2007) smo posamezne nize in drevesa združili ter zanemarili prvih 20% vzorčenj. Da smo se prepričali, ali je efektivna velikost vzorca zadostna (ESS, angl. *effective sample sizes*), smo združene nize ponovno analizirali v programu Tracer 1.5 (Rambaut in Drummond, 2007). S programom FigTree 1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) pa smo nato analizirali združena drevesa.

Vsako filogenetsko drevo posameznega lokusa, ki smo ga dobili s programom BEAST, smo tudi primerjali s končnim drevesom vrst. To smo storili s programom Ktreedist (Soria-Carrasco in sod., 2007), ki nam poda K vrednost, ki predstavlja stopnjo razlike v topologiji in dolžini vej dveh posameznih filogenetskih dreves (preglednica 7). Dve filogenetski drevesi z visoko stopnjo razlik v dolžini vej in topologiji imata visoko K vrednost, medtem ko imata dve filogenetski drevesi, ki sledita podobni razčlenitvi in dolžini posameznih vej, nizko K vrednost. Z analizo smo določili drevesa, ki najbolje sledijo topologiji referenčnega filogenetskega drevesa (Soria-Carrasco in sod., 2007).

3.5.5 Ocenjevanje časa ločitve od najbližjega skupnega prednika

Čas ločitve od najbližjega skupnega prednika (TMRCA, angl. *the most recent common ancestor*) med posameznimi vrstami/linijami znotraj rodu *Salmo* smo določili s programom BEAST 1.7.2 (Drummond in Rambaut, 2007), pri čemer smo uporabili model sproščene molekularne ure. Pri tem smo se oprli na dva podatka dobljena iz literature; tako smo za čas ločitve belvice in kompleksa potočnih postrvi upoštevali 4 milijone let s standardno deviacijo ± 1 milijon let. Podatek sovpada z nastankom Ohridskega jezera (Bănărescu, 1991) ter časom ločitve belvice od kompleksa potočnih postrvi, ocenjenim na podlagi analize gena za

citokrom b pri salmonidih (Sušnik in sod., 2006). Za časovno opredelitev ločitve donavske in jadranske filogenetske linije potočne postrvi pa smo uporabili podatek 0,7 milijonov let \pm 0,2 milijona let, ki je rezultat analize kontrolne regije mtDNA kompleksa potočne postrvi (Bernatchez, 2001). Vse ostale nastavitev pred analizo so bile enake kot pri *BEAST analizi opisani v poglavju 3.5.3, pri čemer smo pri določanju časa cepitve od najbližjega skupnega prednika upoštevali 95% interval normalne porazdelitve (HPDIs, angl. *higher posterior density interval*).

3.6 IZBIRA DIAGNOSTIČNIH SNP-JEV TER VALIDACIJA GENOTIPIZACIJSKEGA POSTOPKA

Iz poravnave dobljenih nukleotidnih zaporedij 24 vzorcev (opisano v poglavju 3.4) analiziranih na 78 lokusih smo izbrali tista mesta, pri katerih se je specifičen SNP pojavil za eno od treh skupin (marmorirana postrv, AT in DA filogenetska linija potočne postrvi). Pri 65 izbranih nukleotidnih zaporedjih smo nato tak specifičen SNP označili in zapis nukleotidnih zaporedij posredovali podjetju KBioscience (Velika Britanija), kjer so nam po metodi KASPar (angl. *fluorescence based competitive allele specific PCR technology*), katere protokol je dostopen na spletni strani www.kbioscience.co.uk, oblikovali začetne oligonukleotide za alelno specifično pomnoževanje. Temu je sledilo umerjanje alelno specifičnega pomnoževanja na setu 24 vzorcev, ki smo jih predhodno že uporabili pri iskanju SNP-jev (preglednica 3). Da smo preverili diagnostično vrednost posameznega polimorfizma, smo genotipizirali še razširjen set vzorcev navedenih v preglednici 3, kjer je bila posamezna populacija zastopana s petimi vzorci, torej skupaj 40 vzorcev na linijo oz. skupno 120 vzorcev. Genotipizacijo so opravili na mikrotiterskih ploščah s 1536 luknjicami, pri čemer so za posamezno reakcijo potrebovali:

- 1,2 μ l KASP reakcijske mešanice
 - FAM in HEX značke
 - Klear TAQ Hot-start DNA polimerazo
 - ROX pasivno referenco
 - dNTP, MgCl₂, pufer

- 0,02 μ l mešanice z začetnimi oligonukleotidi (priloga B)
 - dva alelno specifična začetna oligonukleotida, ki prilegata na 5' –koncu
 - skupen začetni oligonukleotid, ki prilega na 3' –koncu
- 0,1-50ng DNA

Verižno reakcijo s polimerazo so opravili s Kbioscience Hydrocyclerjem, pri čemer so bili pogoji pomnoževanja naslednji:

- aktivacija polimeraze 94°C 15 minut
- denaturacija 94 °C 20 sekund }
- pomnoževanje 61°C* 60 sekund } 10 ciklov
- ponovna denaturacija 94 °C 10 sekund }
- ponovno pomnoževanje 57°C 60 sekund } 26 ciklov

* ob vsakem ciklu se je temperatura pomnoževanja znižala za 0,6°C

Po končanem pomnoževanju je sledilo branje fluorescenčnih signalov na BMG PHERAstar detektorju, rezultati pa so bili analizirani s programom KlusterKaller (KBioscience). V primeru, ko po analizi podatkov ni bilo dobre ločljivosti med tremi skupinami (homozigotne alelne variante, homozigoti druge alelne variante in heterozigoti), so verižno reakcijo s polimerazo ponovili s sledečim protokolom:

- denaturacija 94°C 20 sekund }
- pomnoževanje 57°C 60 sekund } 10 ciklov

Po končani genotipizaciji smo s pomočjo programa SNPViewer (KBioscience) SNP-je analizirali. Še posebej smo bili pozorni na tiste, ki so bili za posamezno skupino osebkov specifični (diagnostični).

3.7 ANALIZA POPULACIJSKE STRUKTURE MARMORIRANE POSTRVI V SEVERNEM JADRANSKEM POREČJU

3.7.1 Mitohondrijska DNA

S pomočjo metode RFLP in restrikcijskih encimov *Sst*I in *Alu*I smo po protokolu opisanem v Snoj in sod. (2000) analizirali zbrane vzorce iz 62 populacij (preglednica 5) in tri referenčne

skupine (preglednica 3). Z opisano analizo smo vzorce uvrstili v eno od treh mitohondrijskih filogenetskih linij (MA, DA ali AT).

3.7.2 Genotipizacija SNP-jev

Vzorce opisane v preglednici 5 smo poslali v KBioscience, kjer so jih genotipizirali na izbranih 36 diagnostičnih SNP-jih (priloga B). Vse vzorce genetsko čistih populacij marmorirane postrvi (8 populacij) pa so nam analizirali še na petih označevalcih (GP31_ma, GP57_ma, PG5_ma, HMG1_ma in RH_ma), pri katerih so se pojavljali polimorfizmi med različnimi populacijami marmoriranih postrvi (priloga B). Genotipizacija je bila izvedena po protokolu opisanem v poglavju 3.6.

3.7.3 Obdelava podatkov s programom STRUCTURE

S pomočjo programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard in sod., 2000), smo zbranim vzorcem določili deleže genoma, ki pripadajo trem izvornim linijam (MA, DA in AT). Opravili smo dve neodvisni simulaciji, pri čemer smo uporabili model mešanja (angl. *admixture model*) in korelirane alelne frekvence med populacijami (angl. *correlated allele frequencies*). Populacije, iz katerih vzorci izvirajo, pa niso bile označene kot nepovezane. (i) Pri prvi simulaciji smo uporabili vseh 62 populacij analiziranih na 36 diagnostičnih označevalcih ter tri referenčne skupine (v vsaki je bilo 24 vzorcev, preglednica 3), ki so vsebovale genetsko čiste osebke treh opisanih linij. Ker so vzorci v večini izvirali iz porečja, kjer se križajo tri filogenetske linije (MA, DA in AT) oz. so pripadali čistim populacijam ene od teh treh linij (referenčni vzorci), je bilo pri analizi število skupin (K , angl. *clusters*) nastavljeno na tri. Da smo zagotovili konvergenco, smo analizo ponovili trikrat, vsakokrat je MCMC veriga tekla 100.000 generacij, pri čemer smo prvih 10.000 generacij zavrgli. (ii) Pri drugi simulaciji smo uporabili pet označevalcev, pri katerih so se pojavljali SNP-ji med različnimi populacijami marmoriranih postrvi. Z analizo smo želeli ugotoviti, ali lahko s temi označevalci ločujemo populacije čistih marmoriranih postrvi in katere populacije so genetsko povezane. Pri analizi smo število skupin (K) določili med 1 in 10. MCMC veriga za posamezno K vrednost je tekla 500.000 generacij, pri čemer smo prvih 20.000 generacij zavrgli. Konvergenco smo zagotovili po petih ponovitvah. Najverjetnejše število skupin smo določili s pomočjo prosto dostopnega medmrežnega orodja Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>), pri čemer smo uporabili *ad hoc* statistiko ΔK (Evano, 2005).

3.7.4 Obdelava podatkov s program NewHybrids

Za primerjalno analizo smo uporabili program NewHybrids, ki prav tako kot STRUCTURE deluje na Bayesovem principu (Anderson in sod., 2000). Program izračuna posteriorno verjetnost, da analizirani vzorec pripada enemu od razredov križanja (čist osebek, F1, F2, povratni križanec). Analizo smo opravili na celotnem setu vzorcev (62 populacij) in treh referenčnih skupinah (24 vzorcev marmorirane postrvi, 24 vzorcev potočne postrvi AT in 24 DA filogenetske linije), pri čemer smo uporabili 17 za marmorirano postrv diagnostičnih označevalcev. Analiza je potekala pod enakimi pogoji kot prva simulacija pri STRUCTURE analizi (poglavlje 3.7.3), pri čemer smo za alelno frekvenco uporabili Jeffreyev parameter (π ; angl. *Jeffreys prior*) in model mešanih razmerij (Θ ; angl. *mixing proportions*). Pred analizo smo določili šest genotipizacijskih frekvenčnih razredov (čista marmorirana postrv, čista potočna postrv, F1 križanec, F2 križanec, F1 x marmorirane postrv, F1 x potočna postrv). Za obe referenčni skupini smo izbrali samo genetsko čiste osebke, pri čemer smo programu z aktivacijo "z" opcije povedali, da genetsko čiste marmorirane postrvi označi kot 0, genetsko čiste potočne postrvi pa kot 1 (hibridi torej dosegajo vrednosti med 0 in 1). Ker obe referenčni skupini nista del populacij križanja, smo z aktivacijo "s" opcije programu povedali, da ju obravnava kot neodvisni za parameter π in s tem ne upošteva pri izračunu števila čistih osebkov v populacijah (Anderson in Thomson, 2002).

3.7.5 Hardy-Weinbergovo ravnotežje in povezanost posameznih lokusov

Za izračun odstopanja 50 hibridnih populacij od HWE smo uporabili program GENEPOP (Raymond in Rousset, 1995). Pri populacijah, ki so signifikantno odstopale od HWE, smo po metodi Weir in Cockerham (1984) izračunali koeficient parjenja v sorodstvu (F_{IS}). S programom GENEPOP smo izračunali, kateri lokusi so med seboj povezani (LD). Vse dobljene vrednosti za odstopanja od HWE in LD vrednosti (α vrednosti), so bile korigirane s pomočjo Bonferroni korekcijskega testa (angl. *Bonferroni correction test*; Rice, 1989; Cabin in Mitchell, 2000).

3.7.6 Faktorielna korespondenčna analiza in analiza s 3D Scatter Plot macro

Za boljšo predstavo razlik oz. podobnosti med populacijami in vzorci smo s programom Genetix 4.05 (Belkhir in sod., 2004) opravili faktorielno korespondenčno analizo (FCA, angl. *Factorial Correspondence Analysis*) in sicer dve neodvisni simulaciji. (i) Pri prvi smo

uporabili vzorce 62 populacij in treh referenčnih skupin analiziranih na 36 diagnostičnih označevalcih, (ii) pri drugi pa osem genetsko čistih populacij marmorirane postrvi analiziranih na petih označevalcih, pri katerih so se pojavljali SNP-ji med omenjenimi populacijami. Da bi bile razlike vidne tudi na populacijskem nivoju, smo z Excel 3D Scatter Plot makro (Gabok Doka, 2006) izrisali 3D strukturo rezultatov prve simulacije STRUCTURE analize in jo primerjali s FCA analizo.

3.7.7 Filogeografska populacija

S pomočjo programa Populations (Langella, 1999) smo na osnovi izračunanega deleža skupnih alelov na posameznem lokusu (Das; angl. *allele sharing distance*) in NJ metodi izrisali (i) drevo vseh 62 populacij opisanih v preglednici 5 in (ii) drevo čistih populacij marmoriranih postrvi, kateremu smo podporo zagotovili s samovzorčenjem z 10.000 ponovitvami.

4 REZULTATI

4.1 RAZREŠITEV FILOGENETSKIH ODNOSOV ZNOTRAJ RODU *Salmo*

4.1.1 Končna poravnava in prisotnost selekcijskega pritiska

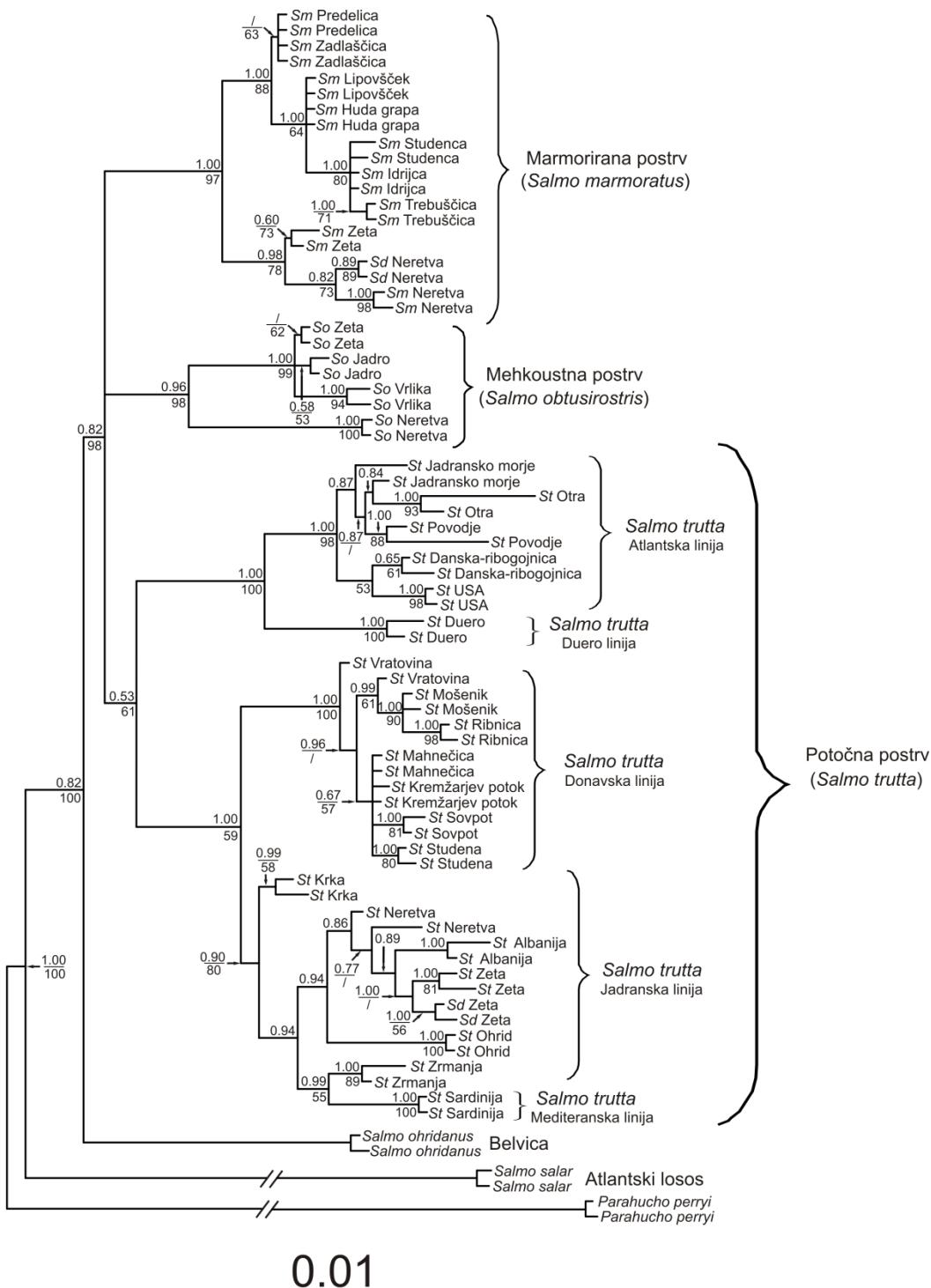
Končna poravnava je bila sestavljena iz 22 jedrnih regij analiziranih pri 76 vzorcih. Nekaterih delov nukleotidnih zaporedij pri vrstah *S. salar* in *Parahucho perryi*, ki sta predstavljala zunanjika, s PCR ni bilo mogoče pomnožiti. Tako so v končni poravnavi manjkale štiri regije za *S. salar* in deset regij za *P. perryi*. Končna poravnava brez zunanjikov je vsebovala približno 8.000 baznih parov dolgo nukleotidno zaporedje, pri čemer je bilo 234 mest polimorfnih, med njimi 196 parsimonično informativnih (angl. *parsimony informative*).

Nobeno za filogenijo uporabljeni nukleotidno zaporedje po metodi Nei-Gojobori ni bilo pod selekcijskim pritiskom.

4.1.2 Filogenetska analiza

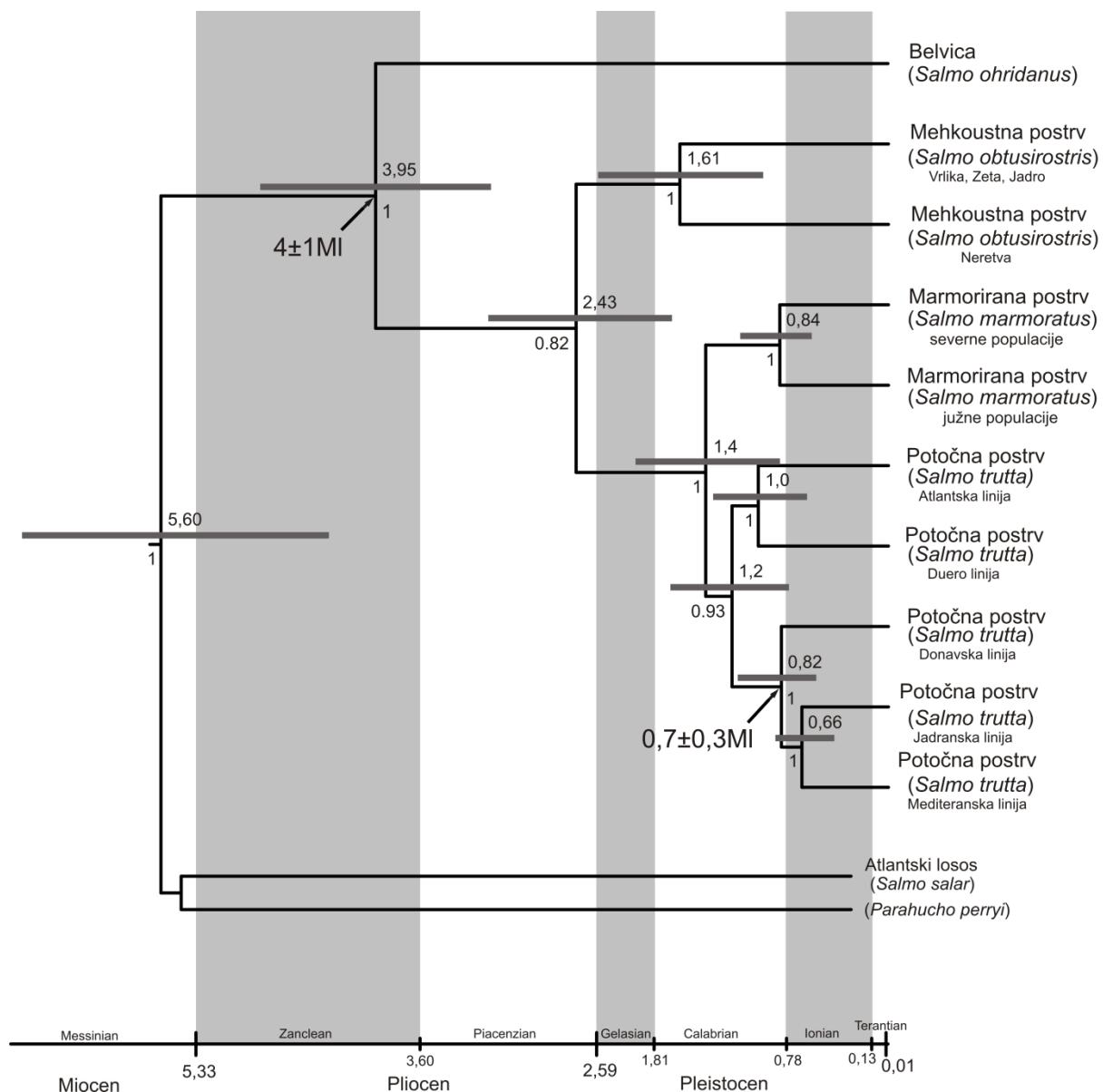
Rezultati filogenetske analize dobljeni s programoma GARLI in MrBayes so grafično predstavljeni na sliki 7, rezultat dobljen s *BEAST analizo pa na sliki 8. Pri izrisu drevesa je bil pri ML in *BEAST analizi najpogosteje izbran substitucijski model F81, pri analizi s programom GARLI pa HKY model (preglednica 7).

Drevesa so bila koreninjena z zunanjikoma (*Salmo salar* in *Parahucho perryi*), ki sta podpirala ločitev preiskovanih vrst/linij na dve glavni skupini. V prvo skupino je bila razvrščena belvica, katere samostojnost je bila dobro podprta (posteriorna verjetnost izračunana s programom MrBayes [MrB PP] = 0,82, podpora s samovzorčenjem (angl. *bootstrap value*) ML analize [ML BS] = 100%, posteriorna verjetnost *BEAST analize [BE PP] = 1) in zavzema bazalno pozicijo za vse ostale vrste/linije. V drugi skupini, ki predstavlja kompleks različnih vrst in linij postrvi, so dobro podprt trije večji kladi: mehkoustna postrv, marmorirana postrv in potočna postrv (MrB PP = 0,82, ML BS = 98%). Z ML analizo in analizo dobljeno s programom MrBayes odnosov med tremi omenjenimi kladi nismo uspeli razrešiti (politomija). V primeru, da upoštevamo *BEAST analizo, pa je mehkoustna postrv bazalna vrsta za ostali dve kladi (BE PP = 0,82).



Slika 7: Filogenetsko drevo rodu *Salmo* izrisano s programoma GARLI in MrBayes. Nad posamezno vejo so napisane podpore posteriorne verjetnosti izračunane s programom MrBayes, pod vejo pa podpora s samovzorčenjem ML analize, pri čemer veje, katerih podpora je bila nižja od 0.50 oz. 50%, niso izrisane (Sm, *Salmo marmoratus*; Sd, *Salmo dentex*; St, *Salmo trutta*)

Figure 7: Phylogenetic tree of genus *Salmo* calculated with GARLI and MrBayes. MrBayes posterior probabilities are written above and ML bootstrap values below each branch. Branches and values lower than 0.50/50% are not plotted (Sm, *Salmo marmoratus*; Sd, *Salmo dentex*; St, *Salmo trutta*)



Slika 8: Filogenetsko drevo vrst/linij rodu *Salmo* dobljena s *BEAST analizo in izrisano s programom BEAST.

Iz drevesa so razvidne posteriorne verjetnosti za posamezne cepitve (pod vejo), čas ločitve od najbližjega skupnega prednika v milijonih let (MI) in interval zaupanja (nad vejo). Oba podatka, ki smo ju uporabili za določanje časa ločitve od najbližjega skupnega prednika, sta označena s puščicama.

Figure 8: Phylogenetic tree of species/lineages of genus *Salmo* calculated using Bayesian *BEAST method and constructed with program BEAST. Posterior probabilities for each split are written below and the time of separation from the most common ancestor (in million years, MI) and confidence intervals are written above each branch. The data used for calculation of the time of split from most common ancestor are marked.

4.1.2.1 Klad marmoriranih postrvi

Vse tri filogenetske analize so podprle samostojno pozicijo vzorcev, ki predstavljajo južne in severne populacije marmorirane postrvi (MrB PP = 1; ML BS = 97%; BE PP = 1), ob tem sta bili obe skupini razvrščeni kot dobro podprtji samostojni sestrski skupini (vzorci severnih populacij: MrB PP = 1, ML BS = 88%, vzorci južnih populacij: MrB PP = 0,98, ML BS = 78%). Nerazrešeni pa so ostali filogenetski odnosi med vzorcei znotraj obeh skupin, pri čemer smo pri vzorcih severnih populacij opazili povezanost vzorcev populacij Predelica - Zadlaščica, Lipovšček - Huda grapa, ter Studenca - Idrijca - Trebuščica (slika 7).

4.1.2.2 Klad mehkoustnih postrvi

Znotraj klada mehkoustnih postrvi se najprej odcepita vzorca, ki predstavlja populacijo Neretve (MrB PP = 0,96, ML BS = 98%, BE PP = 1), medtem ko odnosov med vzorci populacije Vrlike, Jadra in Zete, ki tvorijo skupino, nismo uspeli razrešiti (slika 7 in 8).

4.1.2.3 Klad potočnih postrvi

Samostojnost klada potočnih postrvi, ki ga sestavljajo vzorci filogenetskih linij AT, DA, AD, DU in ME, je bila pri ML analizi in analizi opravljeni s programom MrBayes nizko (MrB PP = 0,53, ML BS = 61%), pri *BEAST analizi pa visoko (BE PP = 0,93) podprta. V omenjenem kladu se nahajata dve večji skupini, ki sta sestrski: atlantska skupina (AT/DU), ki se z visoko podporo (MrB PP = 1, ML BS = 100%, BE PP = 1) razdvoji v dve sestrski podskupini AT in DU, ter donavsko-jadransko-mediteranska skupina (ML BS = 53%, MrB = 61, BE PP = 0,93), ki se cepi na donavsko (DA) in jadransko-mediteransko linijo (ML BS = 59%, MrB = 1, BE PP = 0,93). Razčlenitev vzorcev znotraj DA linije ni bila dobro podprta, položaj vzorcev na drevesu pa ni imel očitnih povezave z rečnimi sistemi, od koder so vzorci. Tudi razporeditve vzorcev preostalih dveh linij (AD in ME) ni bilo mogoče zanesljivo razrešiti, očitni pa sta zgodnja odcepitev populacije iz Krke (MrB PP = 0,90, ML BS = 88%) ter sorodnost populacije iz Zrmanje in Sardinije (MrB PP = 0,94).

Za konec je potrebno še omeniti, da so bili vzorci zubatka (*Salmo dentex*) iz reke Neretve razvrščeni v skupino z marmorirano postrvjo v reki Neretvi (MrB PP = 0,98; ML BS = 78%), vzorci zubatka iz Zete pa s potočno postrvjo iz reke Zete (MrB PP = 0,89; slika 7).

4.1.3 Določanja razlik med drevesi posameznih genov

Filogenetska drevesa posameznih genov (angl. *gene trees*) izrisana s programom BEAST so v primerjavi z drevesom vrst (angl. *species tree*) odražala zelo podobno obliko in topološko postavitev vej. Pri analizi s programom Ktreedist so se tako vse K vrednosti gibale pod 0.05 (preglednica 7), zaradi česar nobeno od dreves genov ni bilo izključeno pri izrisu drevesa vrst.

Preglednica 7: Izbrani modeli molekularne evolucije za posamezen lokus in rezultati primerjave dreves posameznega gena in drevesom vrst

Tabele 7: Models of molecular evolution for individual locus and differences between gene trees and species tree

Lokus	jModeltest BIC	MrModeltest AIC	Ktreedist
GP1	TrN	GTR	0,04589
GP4	F81	F81	0,04593
GP5	JC	HKY	0,04555
GP14	JC	F81	0,03149
GP16	F81	F81	0,04473
GP31	K80+G	HKY	0,02257
GP34	HKY	HKY+I	0,04559
GP37	HKY	HKY	0,04048
GP38	JC	JC	0,04485
GP42	F81	F81	0,04562
GP73	F81+G	F81	0,04062
GP81	F81+G	F81	0,04583
GP85	F81	GTR+G	0,04133
GP94	F81	HKY+I	0,04585
HMG1	F81	HKY+I	0,02706
SS2	F81	HKY+I	0,04591
TFGB-beta	TIMef	F81+I	0,02028
tnfa	TrN+G	HKY+I	0,02342
RH	F81	F81	0,04299
SILVA	JC	HKY	0,0458
SL	JC	GTR+I	0,03979
TF	JC	HKY	0,02376

4.1.4 Določanje časa ločitve od najbližjega skupnega prednika

Preko drevesa, s katerim smo ocenjevali čas ločitve od najbližjega skupnega prednika (slika 8), smo predpostavili, da se je belvica pred 3,95 (3,03 - 4,89) milijoni let ločila od skupnega prednika z atlantskim lososom. Znotraj rodu *Salmo* naj bi se na podlagi izračuna in z uporabo sproščene molekularne ure mehkoustna postrv od skupnega prednika postrvi ločila pred 2,43 (1,66 - 3,08) milijoni let, ločitev med marmorirano postrvjo in potočno postrvjo pa naj bi se zgodila pred 1,4 (0,83 - 1,95) milijoni let. Znotraj klada mehkoustnih postrvi naj bi se na osnovi analize sekvenčnih vzorcev Neretve le ti ločili od ostalih pred 1,61 (0,96 - 2,23) milijoni let, pred 0,84 (0,56 - 1,12) milijoni let pa naj bi se ločile severne in južne populacije marmoriranih postrvi. Po odcepnu klada potočnih postrvi naj bi se le te pred 1,2 (0,76 - 1,68) milijoni let razcepile na AT/DU skupino in DA/AD/ME skupino. AT/DU pa se je kmalu potem (pred 1,02 (0,62 - 1,35) milijoni let) razdelila na dve filogenetski liniji, AT in DU. Pred 0,66 (0,41 - 0,87) milijoni let naj bi se ločili AD/ME skupina in DA filogenetska linija. Čas ločitve AD in ME filogenetske linije, ki pri ML analizi in analizi s programom MrBayes ni bil razviden, je bil ocenjen na 0,66 (0,41-0,87) milijonov let.

4.2 DOLOČANJE DIAGNOSTIČNIH POLIMORFIZMOV POSAMEZNIH NUKLEOTIDOV

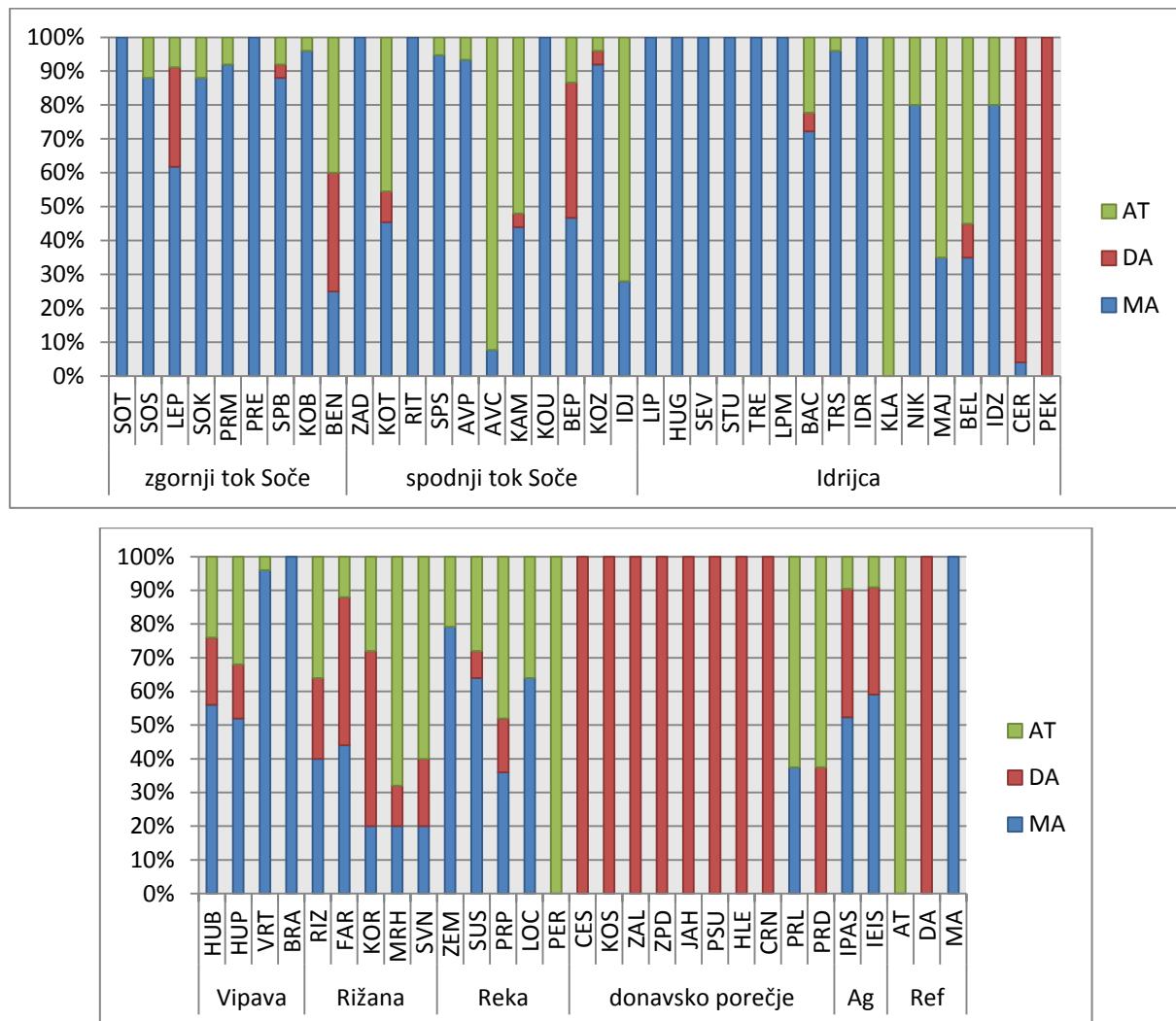
Od 100 izbranih začetnih oligonukleotidov smo z 78 uspešno pomnožili dele genoma 24 izbranih vzorcev. Iz pomnoženih nukleotidnih zaporedij smo pri poravnavi našli 65 za posamezno linijo specifičnih SNP-jev. V podjetju KBioscience so za 47 polimorfizmov uspešno zasnovali KASPar diagnostični sistem. Po testiranju sistema na razširjenem setu vzorcev smo določili 36 linijsko specifičnih SNP-jev, 17 za marmorirano postrv, osem za AT in 11 za DA filogenetsko linijo potočne postrvi.

4.3 POPULACIJSKO GENETSKA STRUKTURA MARMORIRANE POSTRVI

4.3.1 Populacijska struktura na osnovi mtDNA

Na podlagi RFLP analize kontrolne regije mtDNA smo za vsak vzorec ugotavljali, kateri od treh mtDNA filogenetskih linij (i.e., MA, AT ali DA) pripada, ter izračunali deleže teh treh linij v posamezni populaciji (slika 9). Izmed 58 populacij, ki izvirajo iz cone križanja

(preglednica 5), je bilo 12 takšnih, pri katerih je bila prisotna le ena od treh mtDNA linij. Tako je za populacije iz Branice (BRA), izvira Kožbanjščka (KOU), Soče v Trenti (SOT), Lipovščka pri elektrarni (LPM) in Tolminke pri ribogojnici (RIT) značilna mitohondrijska filogenetska linija MA, za populacijo Peklenski potok (PEK), ki se nahaja v jadranskem porečju, in populacije Češnica (CES), Črna (CRN), potok Suša (PSU) in Hleviščica (HLE), ki so prisotne v donavskem porečju, pa filogenetska linija DA. Za populaciji Perilo (PER) in Klavžarca (KLA) pa je bila značilna AT filogenetska linija. Genetsko čiste populacije in kontrolni vzorci so izkazovali pričakovane filogenetske linije.



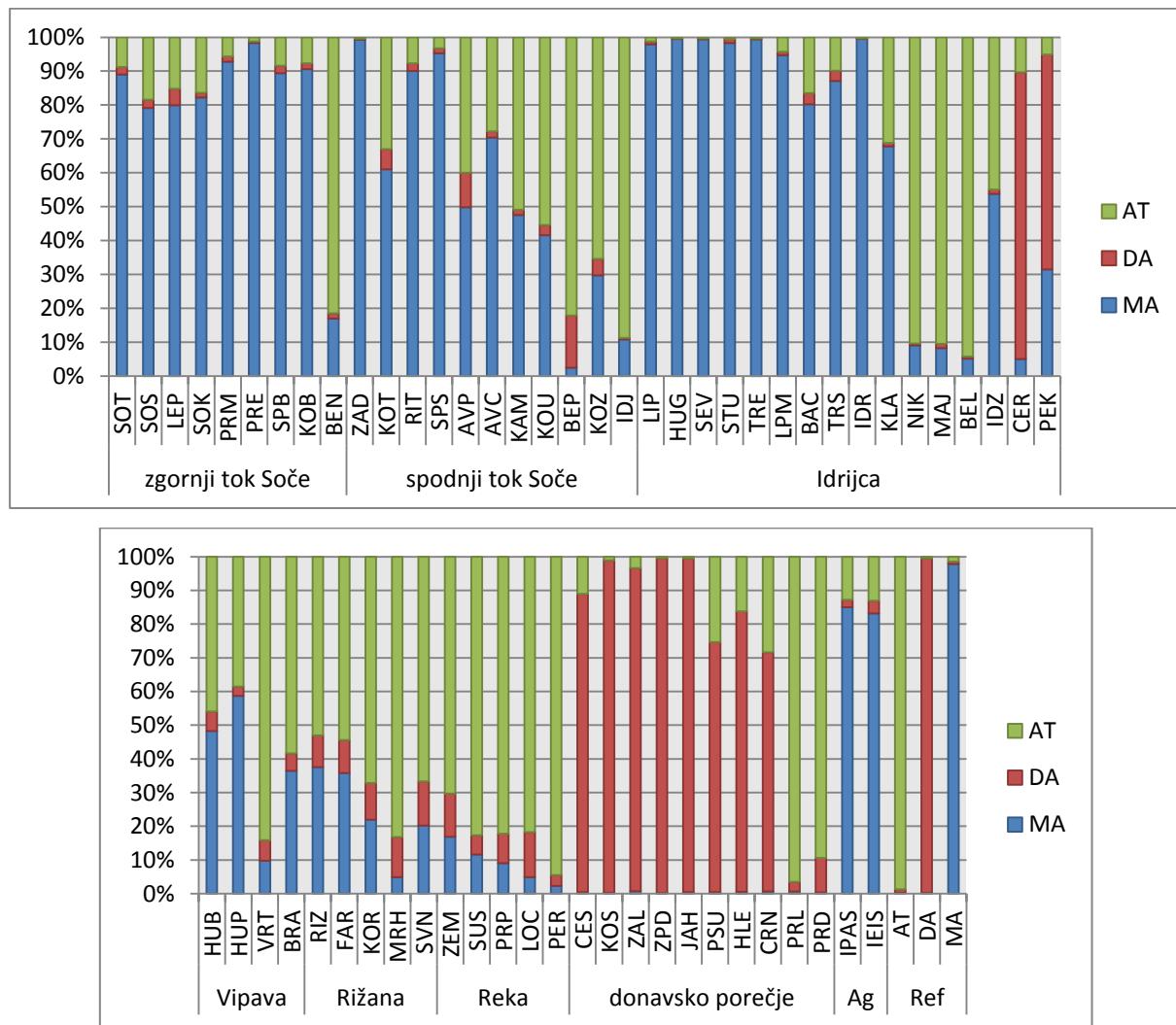
Slika 9: Porazdelitev mtDNA haplotipov značilnih za marmorirano (MA) ter potočno postrv donavske (DA) in atlantske (AT) filogenetske linije pri posameznih populacijah (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5, Ad-Adige, Ref-referenčni vzorci)

Figure 9: Average distribution of mtDNA haplotypes of marble (MA) and brown trout of danubian (DA) and atlantic (AT) phylogenetic lineage (the abbreviations of populations are explained in table 5, Ag-Adige, Ref-reference samples)

4.3.2 Populacijska struktura na osnovi analize jadrne DNA s programom

STRUCTURE

(i) Pri prvi simulaciji smo s pomočjo hierarhične analize in programa STRUCTURE ocenjevali delež genoma, ki na nivoju posameznih vzorcev in populacij pripada trem izvornim linijam (MA, AT in DA liniji). Rezultati so razvidni iz slike 10.



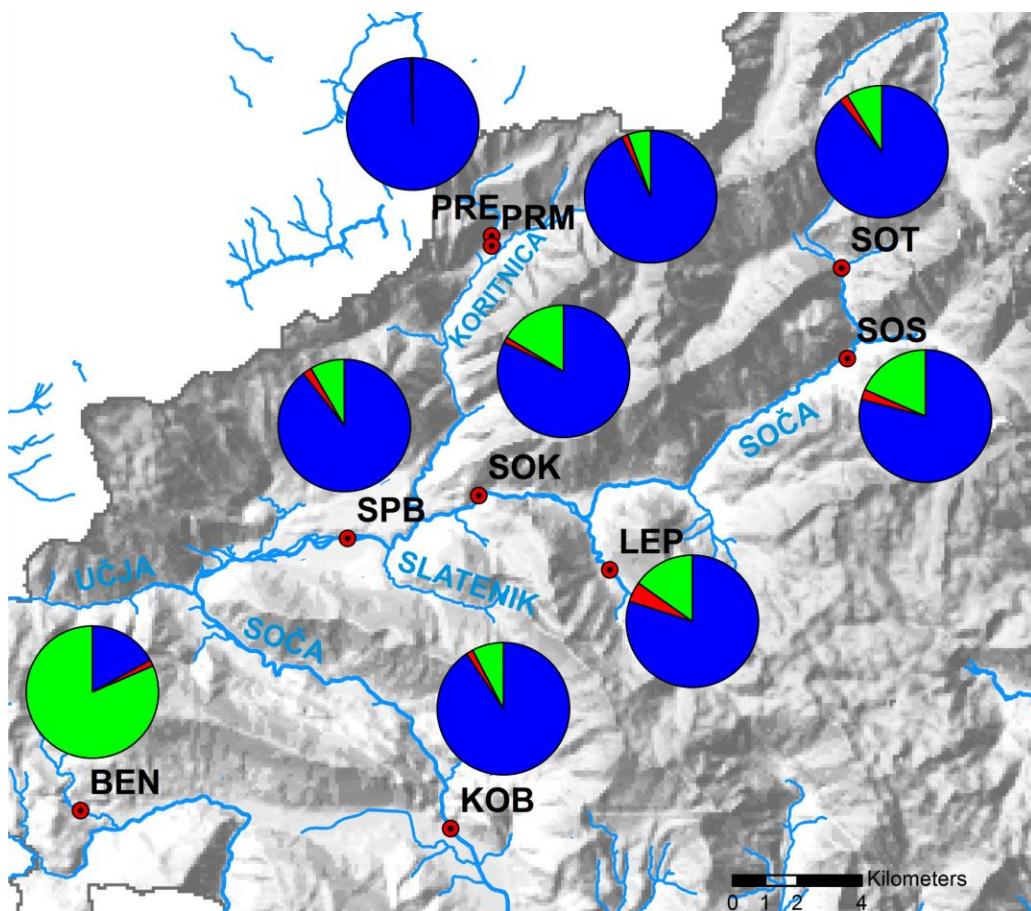
Slika 10: Populacijska struktura hibridnih populacij in treh referenčnih skupin izračunana s programom STRUCTURE (marmorirana postrv (MA), potočno postrv donavske (DA) in atlantske (AT) filogenetske linije, okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5, Ag-Adige, Ref-referenčni vzorci)

Figure 10: Population structure of hybrid populations and three reference groups calculated using STRUCTURE (marble trout (MA), brown trout of danubian (DA) and atlantic (AT) phylogenetic lineage, the abbreviations of populations are explained in table 5, Ag-Adige, Ref-reference samples)

Ugotovili smo, da so populacije Soča pri Kobaridu (KOB), sotoče Soče in Tolminke (SPS), sotoče Predelice in Koritnice (PRM) ter Tolminka pri ribogojnici (RIT) v povprečju zastopane z vsaj 90% deležem marmorirane postrvi. Pri populacijah Perilo (PER), Belca (BEL), Majnški potok (MAJ) in Rio Bianco (PRL) pa je z več kot 90% prevladoval genom AT filogenetske linije. Genom DA filogenetske linije se je v jadranskem porečju z več kot 50% pojavil le pri populacijah Cerknica (CER) in Peklenski potok (PEK).

Rezultati geografsko zaokroženih enot so sledeči:

Pri analizi zgornjega toka Soče smo ugotovili, da večji del (več kot 80%) v coni križanja predstavlja genom marmorirane postrvi. Izjema je bil le potok Bela (BEN), ki izvira v Sloveniji, a se kmalu izliva v Nadižo, ki pa večino časa teče po Italijanski strani meje. V omenjenem potoku je prevladovala AT linija potočne postrvi (slika 11).

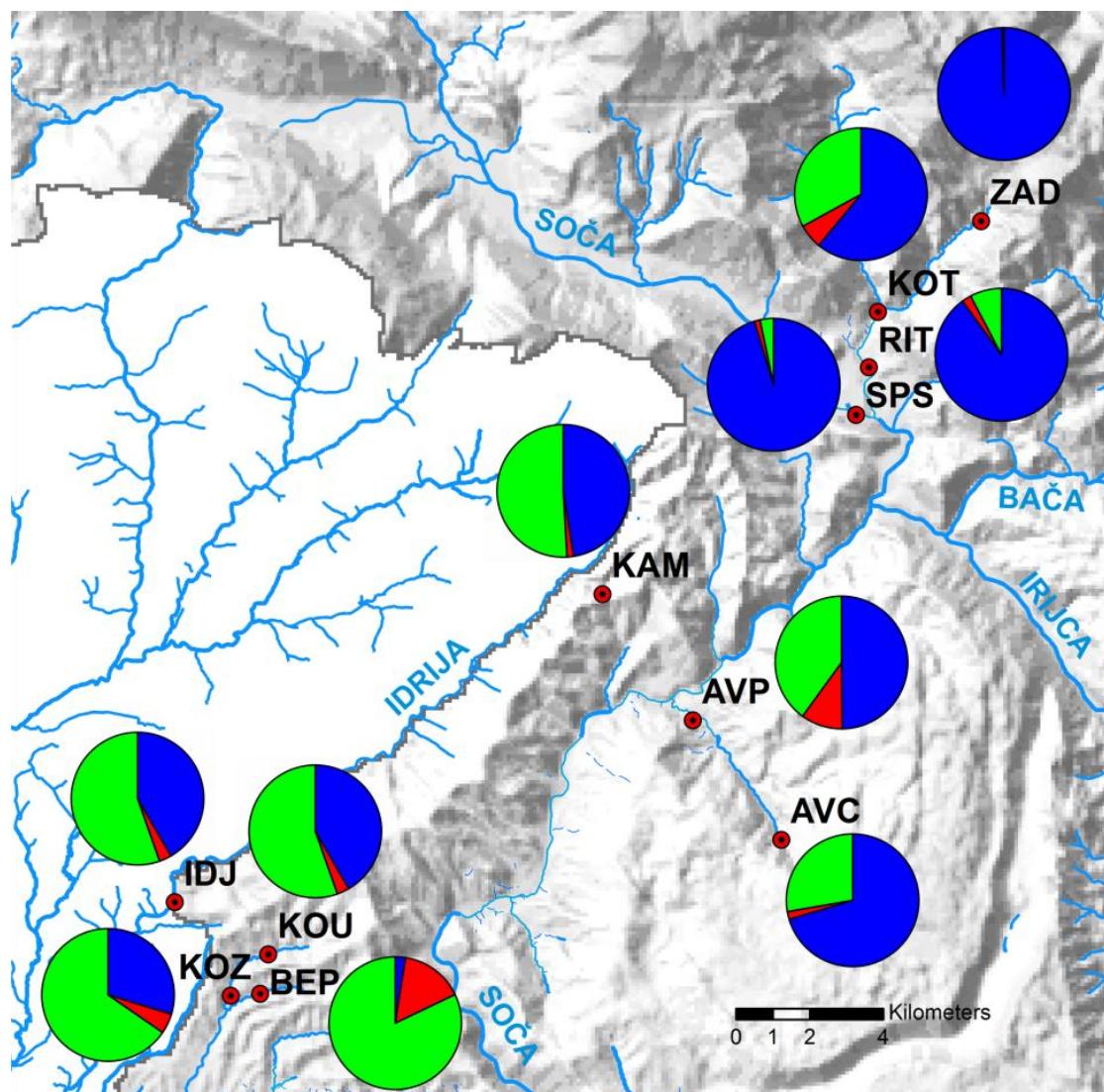


(● marmorirana postrv, ● donavska linija potočne postrvi, ● atlantska linija potočne postrvi)

Slika 11: STRUKTURE analiza vzorcev zgornjega toka Soče (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 11: STRUCTURE analyses of samples from upper Soča river (abbreviations of sampling locations are explained in table 5)

Pri analizi populacij Soče v spodnjem toku smo ugotovili, da je delež genoma marmorirane postrvi v primerjavi z zgornjim tokom občutno manjši. Pri najbolj južnih analiziranih soških populacijah, ki se nahajajo v predelu Goriških brd (Idrija, IDR, Kožbanjšček izvir, KOU, Kožbanjšček pri parku, KOZ in Belski potok, BEP) pa prevladuje predvsem genom AT linije potočne postrvi (slika 12).

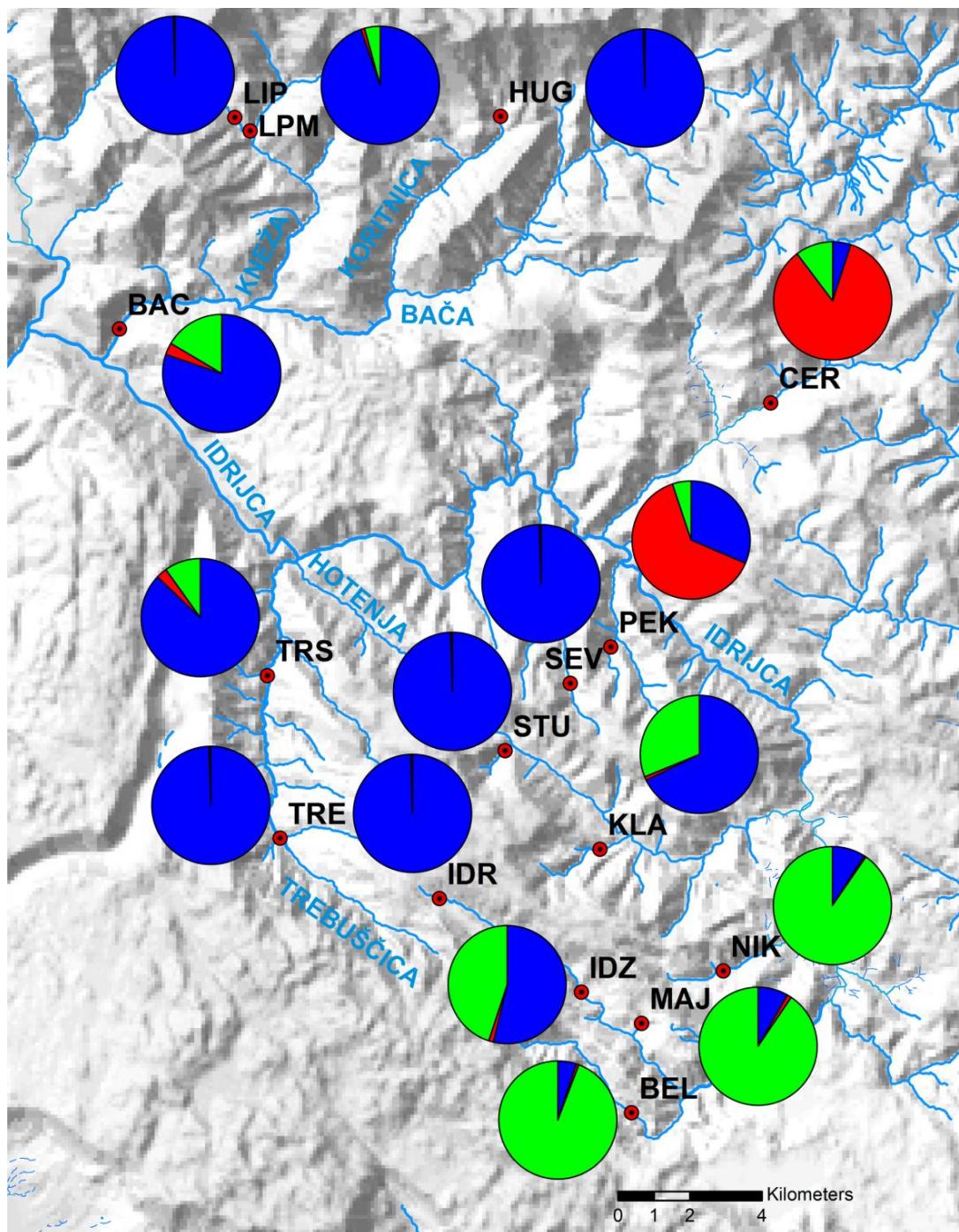


- marmorirana postrv, ● donavska linija potočne postrvi, ● atlantska linija potočne postrvi

Slika 12: STRUCTURE analiza vzorcev spodnjega toka Soče (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 12: STRUCTURE analyses of samples from Soča downstream (abbreviations of sampling locations are explained in table 5)

Pri analizi vzorcev Idrijce in njenih pritokov smo ugotovili, da lahko njen porečje glede na deleže genoma, ki pripadajo trem izvornim linijam, razdelimo na tri dele. Prvi del predstavlja genetsko čiste populacije marmorirane postrvi porečja Bače (Lipovšček, LIP, Huda grapa, HUG) in spodnjega toka Idrijce (Sevnica, SEV, Studenca, STU in Trebuščica, TRE) ter hibridne populacije v tem predelu (Lipovšček pri elektrarni, LPM, Bača pri Modeju, BAC, Trebuščica v coni križanja, TRS), pri katerih prevladuje genom marmorirane postrvi. Drugi del predstavlja populacije zgornjega porečja Idrijce do vključno pritoka Klavžarce, kjer prevladuje genom AT linije potočne postrvi; izjema je genetsko čista populacija marmorirane postrvi na izvirnem delu Idrijce (IDR). Tretji del pa predstavlja vzhodni del idrijskega porečja, kjer populacije mejijo na donavsko porečje (Peklenski potok, PEK in Cerknica, CER) in prevladuje (več kot 60%) genom DA linije potočne postrvi (slika 13).

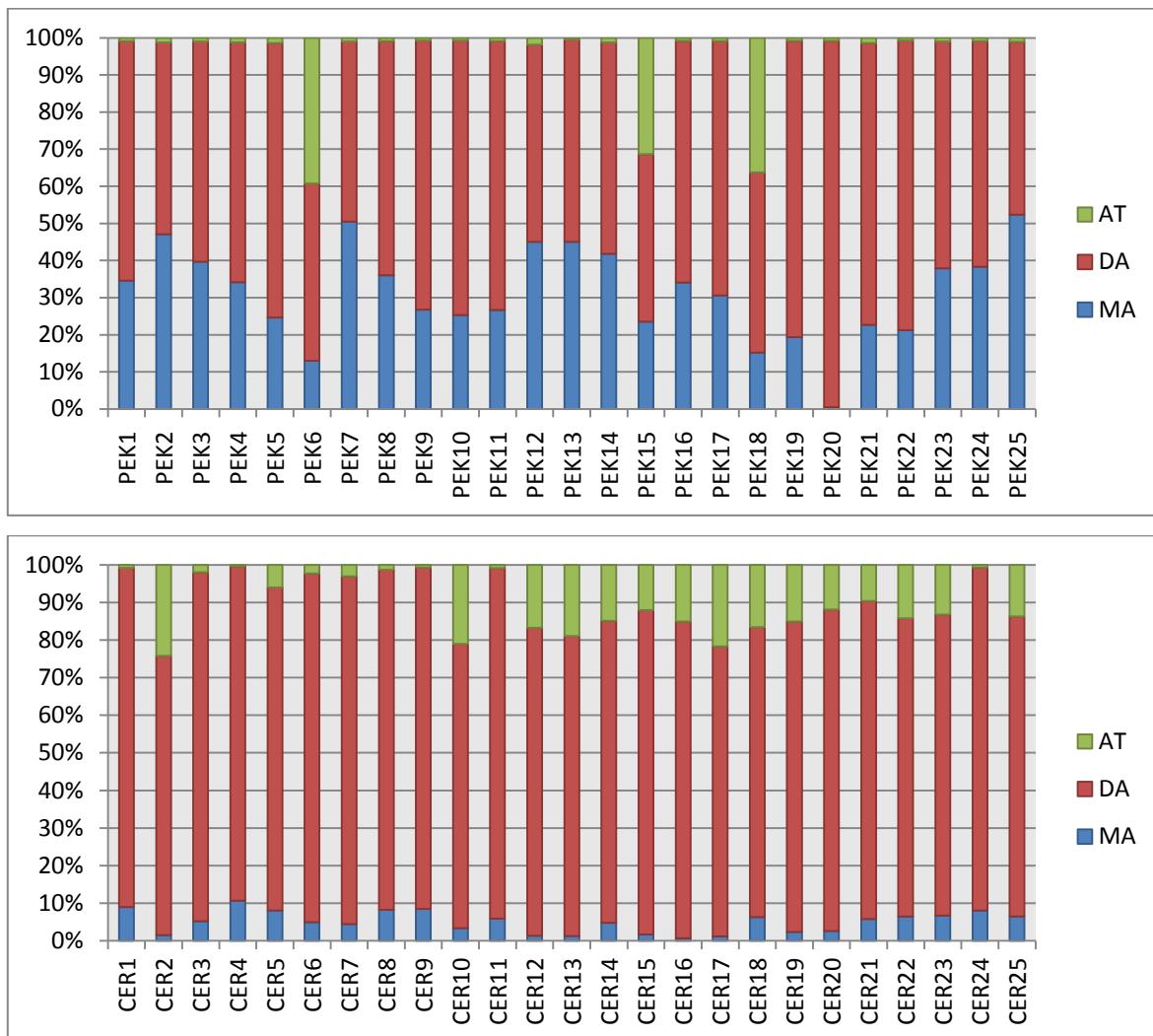


- marmorirana postrv, ● donavska linija potočne postrvi, ● atlantska linija potočne postrvi

Slika 13: STRUCTURE analiza vzorcev postrvi iz porečja Idrijce; okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 13: STRUCTURE analyses of samples from Idrijca (abbreviations of sampling locations are explained in table 5)

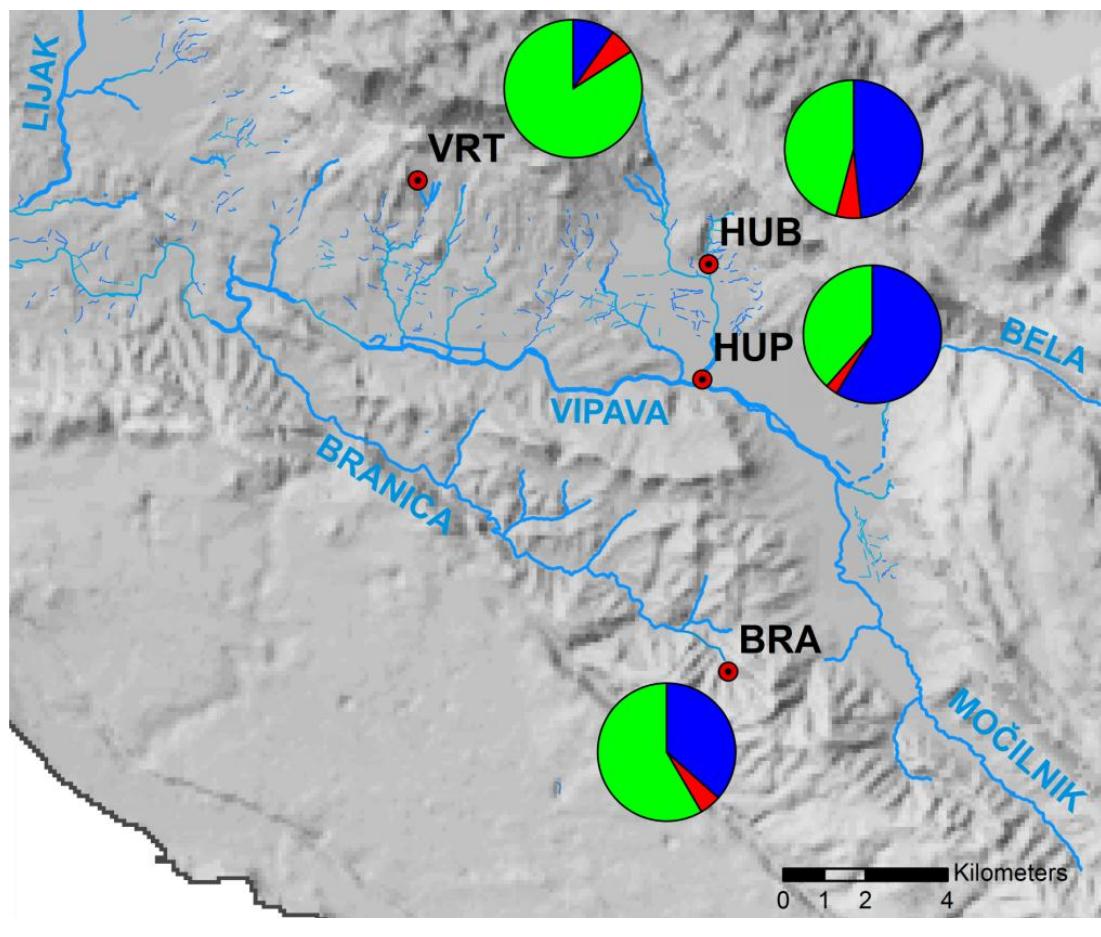
Ker so populacije, ki mejijo na donavsko porečje zaradi potrditve hipoteze o prehodu potočnih postrvi iz donavskega v jadransko porečje, še posebej zanimive, rezultate STRUCTURE analize prikazujemo še na nivoju posameznika. Pri tem ugotavljamo, da v populaciji Peklenski potok (PEK) prevladujejo križanci med marmorirano postrvjo in DA linijo potočne postrvi, pri treh osebkih pa se pojavi tudi delež AT linije potočne postrvi (več kot 30%). V populaciji Cerknica (CER) pa prevladuje enoten genotip, pri čemer je povprečen osebek sestavljen iz manj kot 10% genoma marmorirane postrvi, manj kot 20% genoma AT linije potočne postrvi, prevladuje pa genom DA linije potočne postrvi (slika 14).



Slika 14: STRUCTURE analiza posameznikov populacije Peklenski potok (PEK, zgoraj) in populacije Cerknica (CER, spodaj) (marmorirana (MA) in potočno postrv donavske (DA) in atlantske (AT) filogenetske linije)

Figure 14: STRUCTURE analyses samples representing population Peklenski stream (PEK, up) and population Cerknica (CER, down) (marble (MA) and brown trout of danubian (DA) and atlantic (AT) phylogenetic lineage

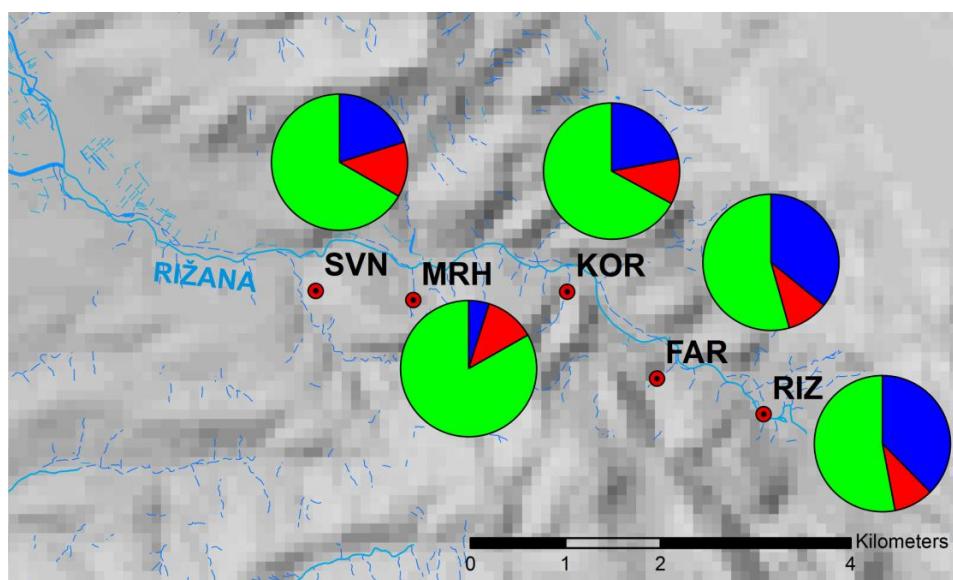
Pri analizi populacij iz pritokov Vipave smo ugotovili, da se populacije glede na genom, ki pripada trem izvornim linijam, močno razlikujejo (slika 15). Najvišji delež genoma marmorirane postrvi (približno 50%) je bil opažen pri obeh populacijah reke Hubelj (Hubelj izvir, HUB, Hubelj pri sotočju z Vipavo, HUP).



Slika 15: STRUCTURE analiza vzorcev pritokov Vipave (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 15: STRUCTURE analyses of samples from Vipava tributary (abbreviations of sampling locations are explained in table 5)

Pri analizi vzorcev iz reke Rižane smo ugotovili, da so si različne populacije postrvi v reki genetsko dokaj enotne, pri čemer prevladuje genom AT linije potočne postrvi (več kot 50%), delež genoma marmorirane postrvi pa od izvira (Rižana izvir, RIŽ, 37%) proti izlivu (Sveta nedelja, SVN, 20%) pada (slika 16).

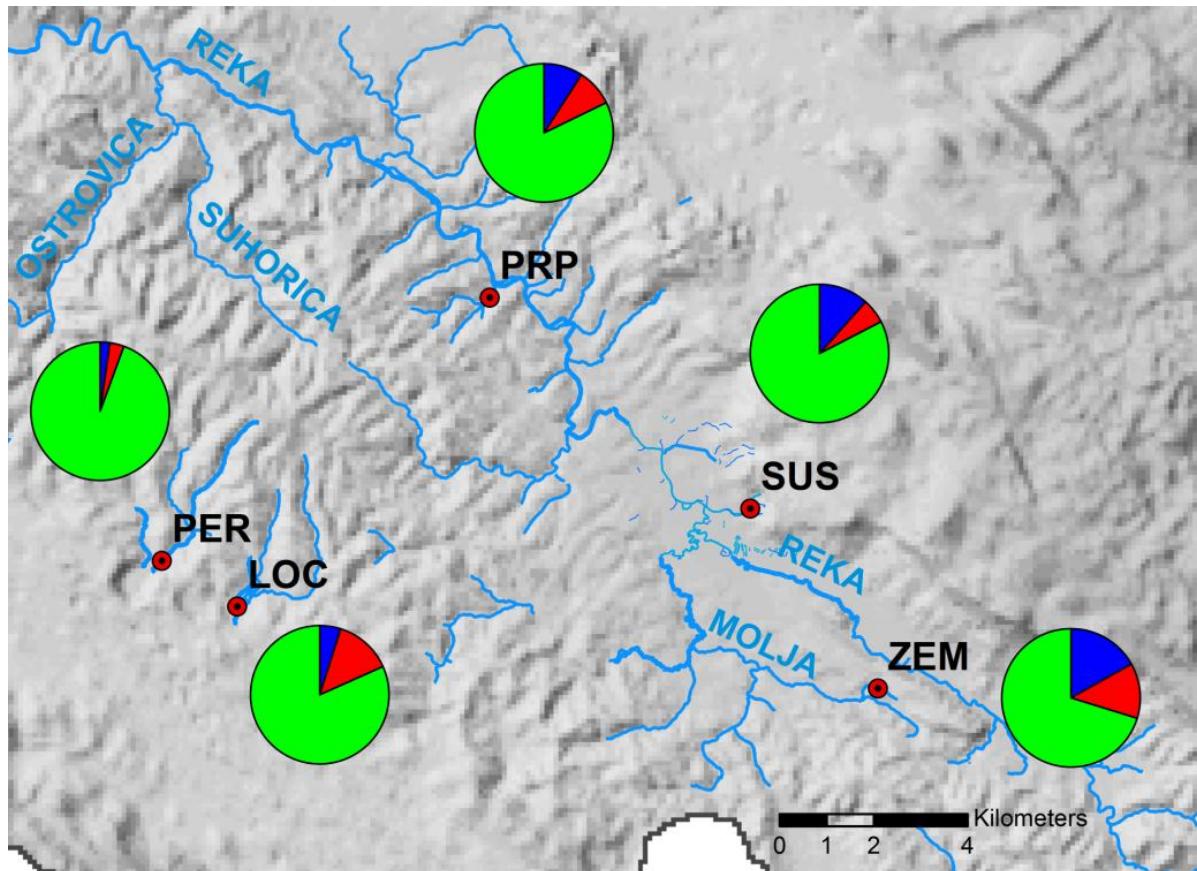


- marmorirana postrv, ● donavska linija potočne postrvi, ● atlantska linija potočne postrvi

Slika 16: STRUCTURE analiza vzorcev Rižane; okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 16: STRUCTURE analyses of samples from Rižana (abbreviations of sampling locations are explained in table 5)

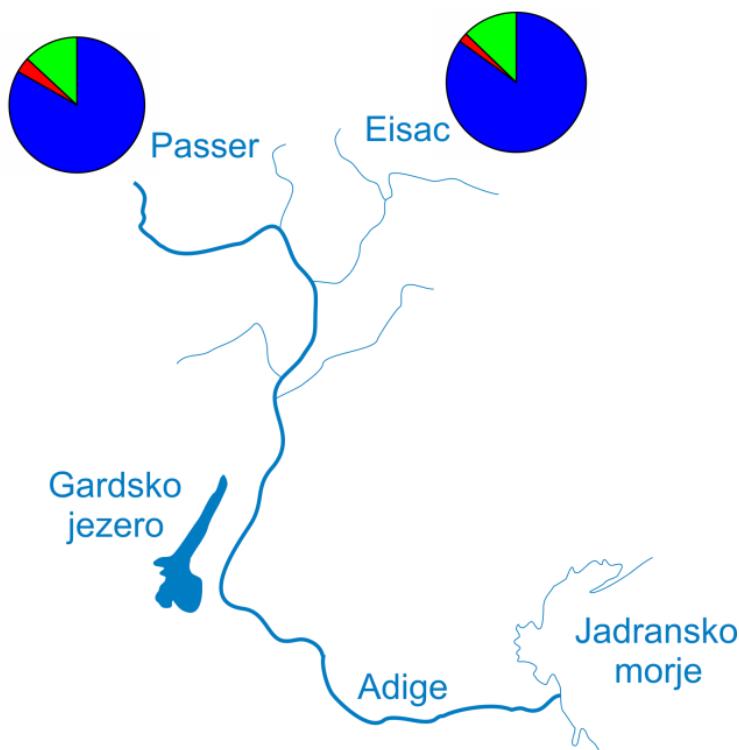
Pri analizi ponikalnic reke Reke smo ugotovili, da v populacijah močno (več kot 70%) prevladuje genom AT linije potočne postrvi, delež genoma marmorirane postrvi pa je majhen (manjši od 20%; slika 17).



Slika 17: STRUCTURE analiza vzorcev ponikalnic reke Reke (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 17: STRUCTURE analyses of samples from river Reka (abbreviations of sampling locations are explained in table 5)

Pri analizi populacij reke Passer (IPAS) in reke Eisack (IEIS), ki sta del porečja reke Adige in predstavljata populacije, v katerih je bil določen največji delež genetsko čistih marmoriranih postrvi v Italiji (Meraner in sod., 2010), smo ugotovili, da delež genoma marmorirane postrvi presega 80% celotnega genoma (slika 18).

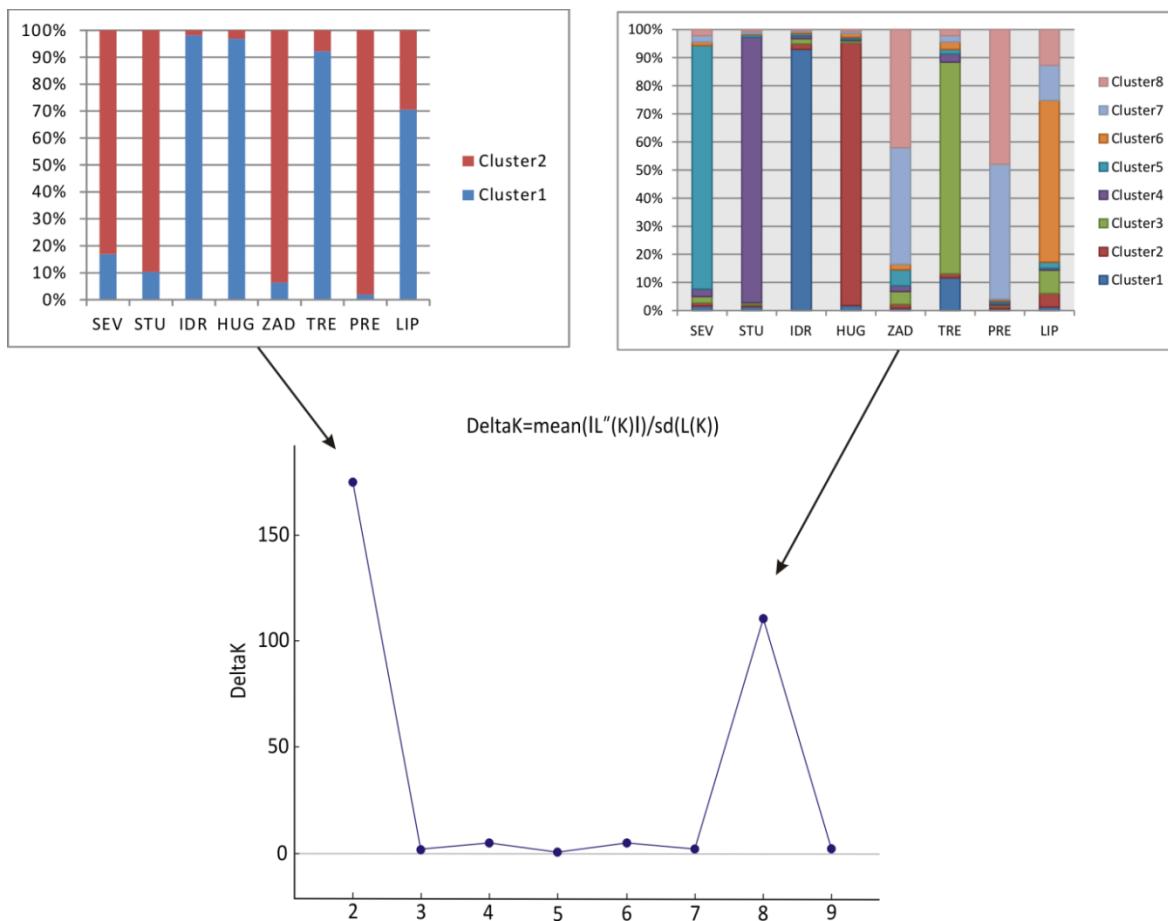


- marmorirana postrv, ● donavska linija potočne postrvi, ● atlantska linija potočne postrvi

Slika 7: STRUCTURE analiza vzorcev pritokov reke Adige (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 18: STRUCTURE analyses of samples from Adige tributary (abbreviations of sampling locations are explained in table 5)

(ii) Pri drugi simulaciji smo rezultate STRUCTURE analize osmih genetsko čistih populacij analizirali s pomočjo programa Structure Harvester, rezultat pa je razviden iz slike 19, pri čemer je najverjetnejše število skupin znotraj analiziranih vzorcev dve ($K=2$), druga dosežena najvišja posteriorna verjetnost pa se pojavi pri osmih skupinah ($K=8$). Ob upoštevanju, da je število skupin dve, enako genetsko strukturo odražajo populacije Sevnica, Studenca, Zadlaščica, Predelica in populacije Idrijca, Huda grapa in Trebuščica, medtem ko populacija Lipovšček delno pripada prvi (30%) delno pa drugi (70%) skupini (slika 19). V primeru, da upoštevamo osem skupin, pa lahko med seboj ločimo osebke iz Sevnice, Studence, Idrijce, Hude grape, delno tudi Trebuščice in Lipovščka, ne moremo pa med seboj ločevati osebkov populacije Zadlaščica in Predelica.



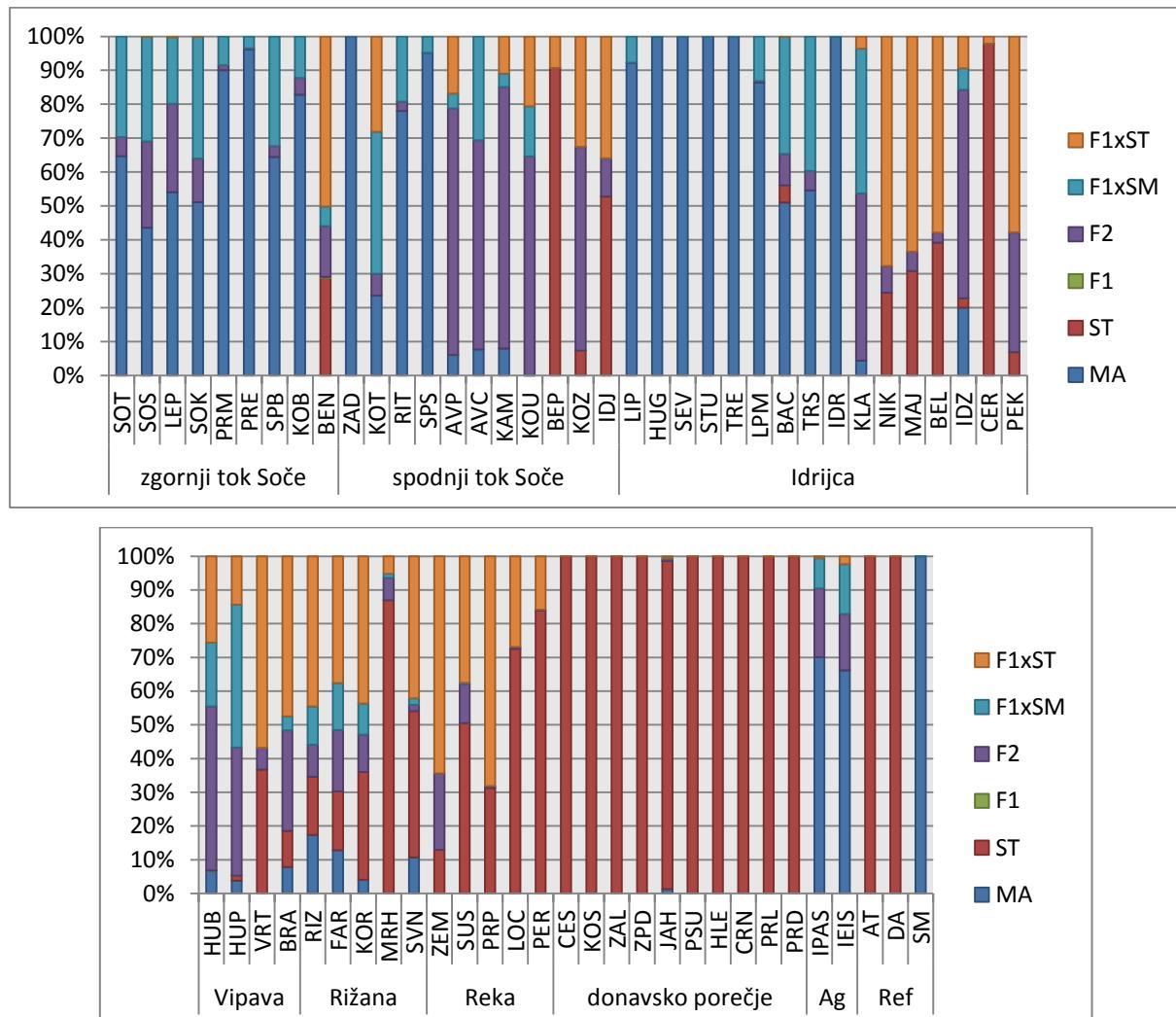
Slika 8: Populacijska struktura osmih genetsko čistih populacij marmoriranih postrvi določena s programom STRUCTURE ($K=2$, levo in $K=8$, desno), ter verjetnost za posamezno K vrednost (ΔK) (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 19: Population structure of eight genetically pure marble trout populations calculated with STRUCTURE ($K=2$, left $K=8$, right) and probabilities for different K values (ΔK) (the abbreviations of populations are explained in table 5)

4.3.3 Populacijska struktura na osnovi analize jedrne DNA s programom NewHybrids

S programom NewHybrids smo pri analiziranih 992 vzorcih iz con križanja jadranskega porečja z zanesljivostjo višjo od 95% določili 209 (več kot 20% vseh analiziranih vzorcev) čistih marmoriranih postrvi: v populacijah Soča pri Bovcu (SPB), Bača pri Modreju (BAC), Soča pri Kobaridu (KOB), sotočje Soče in Tolminke (SPS), sotočje Predelice in Koritnice (PRM), Soča v Trenti (SOT), Tolminka pri ribogojnici (RIT), Trebuščica v coni križanja (TRS), Lipovšček pri elektrarni (LPM), Passer (IPAS) ter Eisac (IEIS) delež čistih marmoriranih postrvi presega celo polovico populacije. Ugotovili smo tudi, da v conah križanja ni bilo F1 križancev (nobeden od vzorcev ni bil razvrščen kot potomec genetsko čiste

marmorirane in potočne postrvi), našli pa smo 101 F2 križancev (slika 20). Med povratnimi križanci so prevladovali povratni križanci s potočno postrvjo (103 osebka). Pri populacijah Belški potok (BEP), Cerknica (CER) in Mlinjščica pri rdeči hiši (MRH) pa je bil delež genetsko čistih potočnih postrvi višji od 80% (Slika 20).



Slika20: Deleži osebkov v populaciji, ki pripadajo posamezni skupini križanja, dobljeni s programom NewHybrids (oznake vzorcev so razvidne iz preglednice 5, SM *Salmo marmoratus*, ST *Salmo trutta*, Ad-Adige, Ref-referenčni vzorci)

Figure 20: Proportion of individuals in the population that belong to different hybrid categories calculated with NewHybrids (sample abbreviations as in table 5, SM *Salmo marmoratus*, ST *Salmo trutta*, Ad-Adige, Ref-referenc samples)

4.3.4 HWE, F_{IS} vrednosti in LD v populacijah

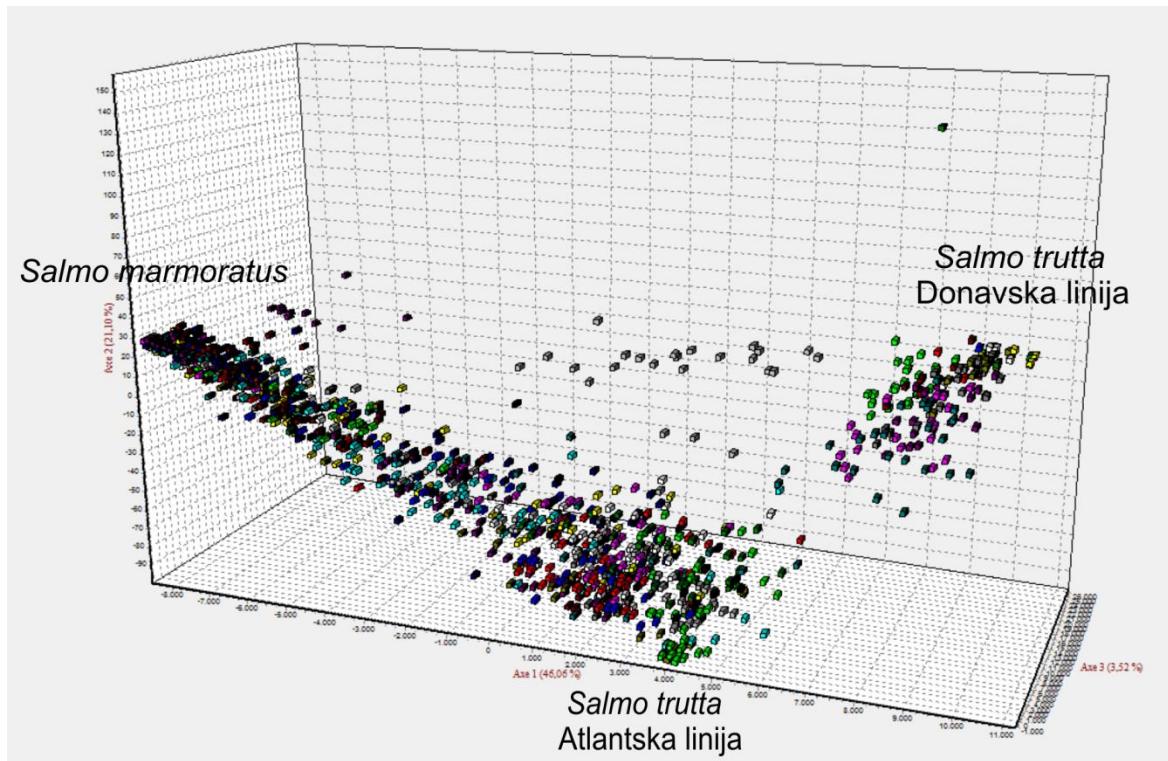
Od 50 analiziranih populacij jih 19 ni bilo v skladu s HWE ravnotežjem ($\alpha = 0,01$). Po korekciji z Bonferronijevim korekcijskim testom ($\alpha = 0,00027$) pa je takšnih populacij ostalo

11 (Idrijca pri Belci, IDZ, Faremski potok, FAR, Kortinska mlinščica, KOR, izvir Rižane, RIZ, Branica, BRA, Sveta nedelja, SVN, Bača pri Modreju, BAC, korita Tolminke in Zadlaščice, KOT, Lepena, LEP, Passer, IPAS, Eisack, IEIS, priloga C). Pri izračunu F_{IS} vrednosti za omenjenih 11 populacij, so bile vse statistično značilne povprečne F_{IS} vrednosti pozitivne in so se gibale med 0,121 (populacija Lepena) in 0,515 (populacija Passer) ter nakazovale na primanjkljaj heterozigotov v testiranih populacijah (priloga D).

Pri ugotavljanju LD posameznih lokusov pa smo našli sedem parov (pg42_at in gp57_ma, gp2_ma in pg5_ma, pg42_at in plagl2_ma, plagl2_ma in gp94_ma, gp57_ma in rh_ma, gp94_ma in rh_ma, gp94_ma in silva_ma), ki nakazujejo na vezavno neravnotežje (alfa vrednost je bila korigirana z Bonferonijevim testom in je znašala 0,00001587). Po pregledu pojavljanja LD med omenjenimi sedmimi pari lokusov pri posameznih populacijah pa smo ugotovili, da se povezave pojavljam le pri populacijah Faremski potok (FAR), Hubelj pri sotočju z Vipavo (HUP), Kortinska mlinščica (KOR), Lepena (LEP), Mlinščica pri rdeči hiši (MRH), korita Tolminke in Zadlaščice (KOT), Bača pri Modreju (BAC) in Branica (BRA).

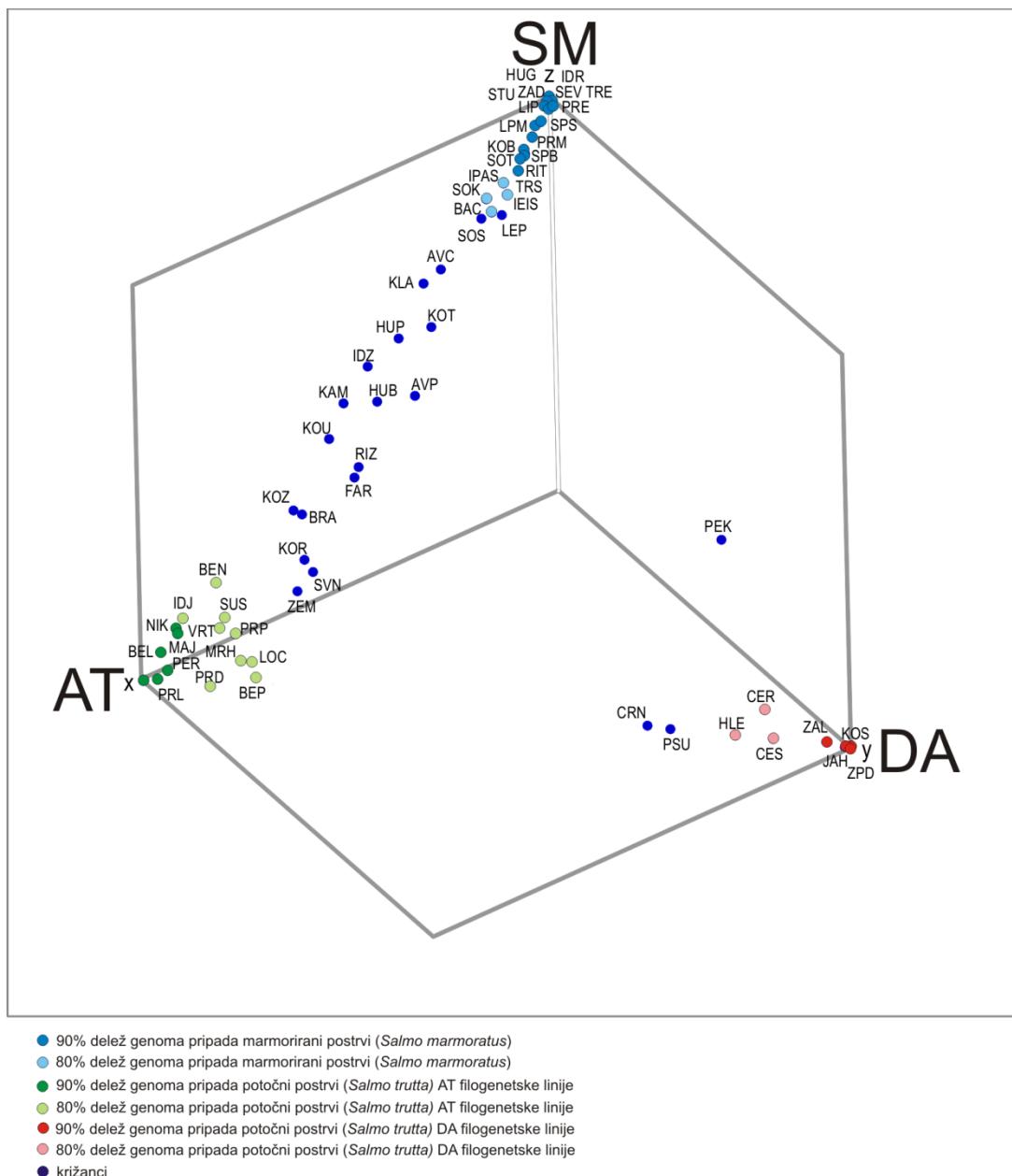
4.3.5 Faktorielna korespondenčna analiza in analiza s 3D Scatter Plot macro

(i) Pri prvi simulaciji FCA in uporabi 3D Scatter Plot macro analize smo ugotovili, da je večina hibridnih populacij in osebkov iz teh populacij produkt križanja med marmorirano in AT filogenetsko linijo potočne postrvi (slika 21 in 22). V preučevanem delu jadranskega porečja smo našli le eno populacijo (Peklenski potok, PEK), v kateri prevladujejo križanci med marmoriranimi postrvimi in donavsko filogenetsko linijo potočnih postrvi, ter eno populacijo (Cerknica CER), kjer prevladuje DA filogenetska linija potočne postrvi.



Slika 21: Rezultati FCA analize 62 hibridnih populacij in treh referenčnih skupin: marmorirana postrvi (*Salmo marmoratus*), AT linija potočne postrvi (*Salmo trutta* Atlantska linija) in DA linija potočne postrvi (*Salmo trutta* Donavskaja linija)

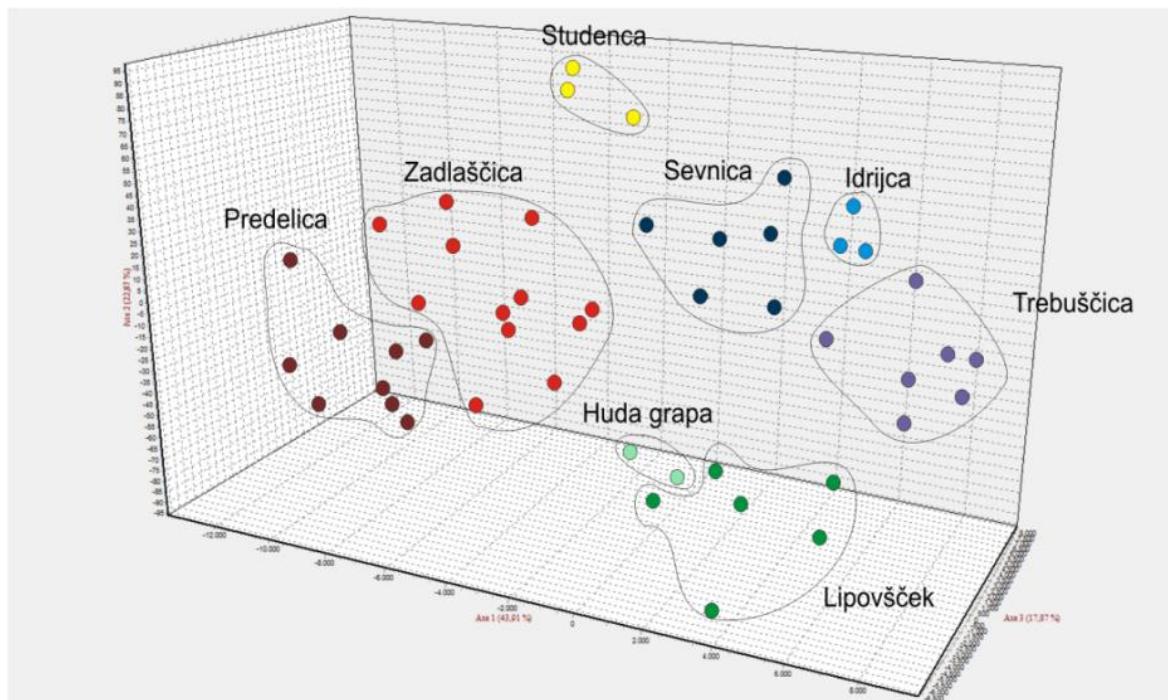
Figure 21: Results of FCA analyses of 62 hybrid populations and three reference groups: marble trout (*Salmo marmoratus*), brown trout of atlantic (*Salmo trutta* Atlantska linija) and danubian lineage (*Salmo trutta* Donavskaja linija)



Slika22: Rezultati 3D Scatter Plot macro analize, kjer obarvane pike predstavljajo posamezne populacije in deleže genoma ene od treh izvornih linij: marmorirana postrvi (SM), AT linija potočne postrvi (AT) in DA linija potočne postrvi (DA) (okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 22: Results of 3D Scatter Plot macro analyses. The colored dots represents populations and amount of genome that belongs to one of three lineages: marble trout (SM), brown trout of atlantic (AT) and danubian lineage (DA) (the abbreviations of populations are explained in table 5)

(ii) Pri drugi simulaciji FCA, ki je temeljila le na vzorcih iz osmih genetsko čistih populacij marmorirane postrvi, pa smo ugotovili povezanost populacij Predelica in Zadlaščica, Huda grapa in Lipovšček, ter Idrijca, Trebuščica in Sevnica (Slika 23).

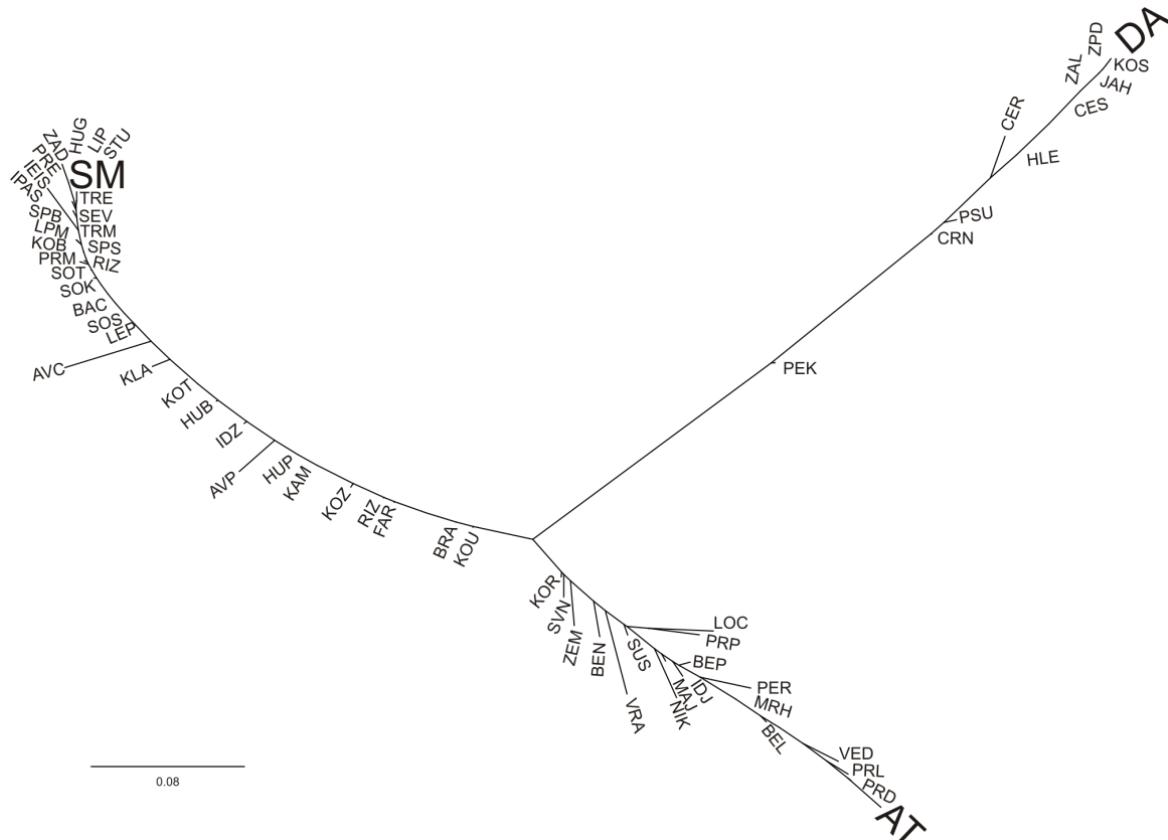


Slika 23: Rezultati FCA analize osmih genetsko čistih populacij marmorirane postrvi (posamezna pika predstavlja posamezen genotip)

Figure 23: Results of FCA analyses of eight genetically pure marble trout populations (each dot represents different genotype)

4.3.6 Filogeografija populacij

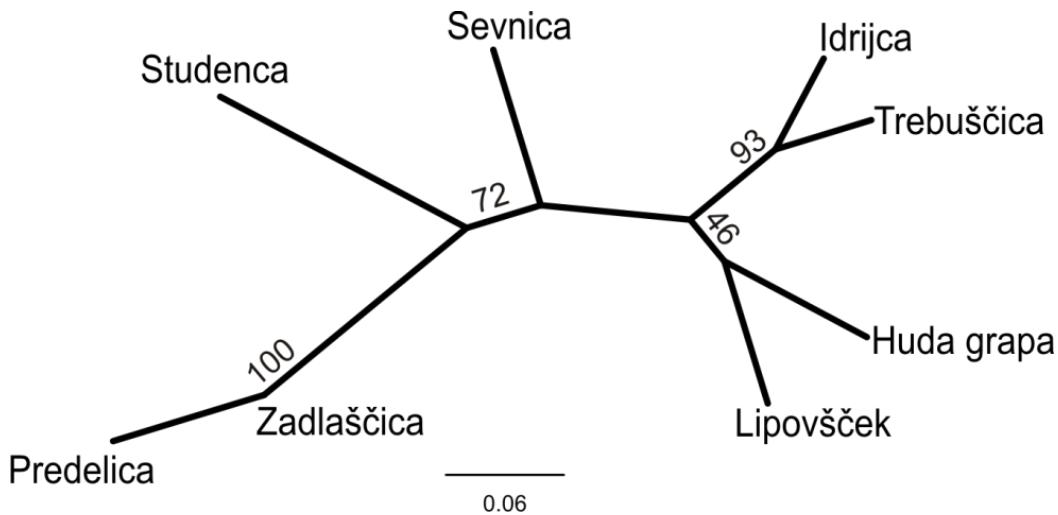
(i) Pri izrisu filogenetskega drevesa hibridnih populacij smo prišli do podobnega zaključka kot s FCA in 3D Scatter Plot macro analizo; med hibridnimi populacijami prevladujejo križanci med marmorirano in AT filogenetsko linijo potočne postrvi (slika 24).



Slika 24: Nekoreninjeno filogenetsko drevo analiziranih 62 populacij opisanih v preglednici 5 (SM predstavlja referenčni vzorec marmorirane postrvi, AT atlantsko linijo in DA donavsko linijo potočne postrvi, okrajšave populacij so pojasnjene v preglednici 5)

Figure 24: Unrooted phylogenetic tree of 62 analyzed populations described in table 5 (SM presents references samples of marble trout, AT atlantic lineage and DA danubian lineage of brown trout, the abbreviations of populations are explained in table 5)

(ii) Rezultati filogenetske analize osmih genetsko čistih populacij so bili podobni FCA analizi, pri čemer je vidna filogenetska povezanost populacij Predelica in Zadlaščica, Huda grapa in Lipovšček ter Idrijca in Trebuščica (slika 25).



Slika 25: Nekoreninjeno filogenetsko drevo izrisano po metodi sosedskega združevanja osmih genetsko čistih populacij marmorirane postrvi ter podpora s samovzorčenjem za posamezne vejitve

Figure 25: Unrooted neighbor joining phylogenetic tree of eight genetically pure marble trout populations and bootstrap values.

5 RAZPRAVA

5.1 FILOGENETSKI ODNOSI V RODU *Salmo*

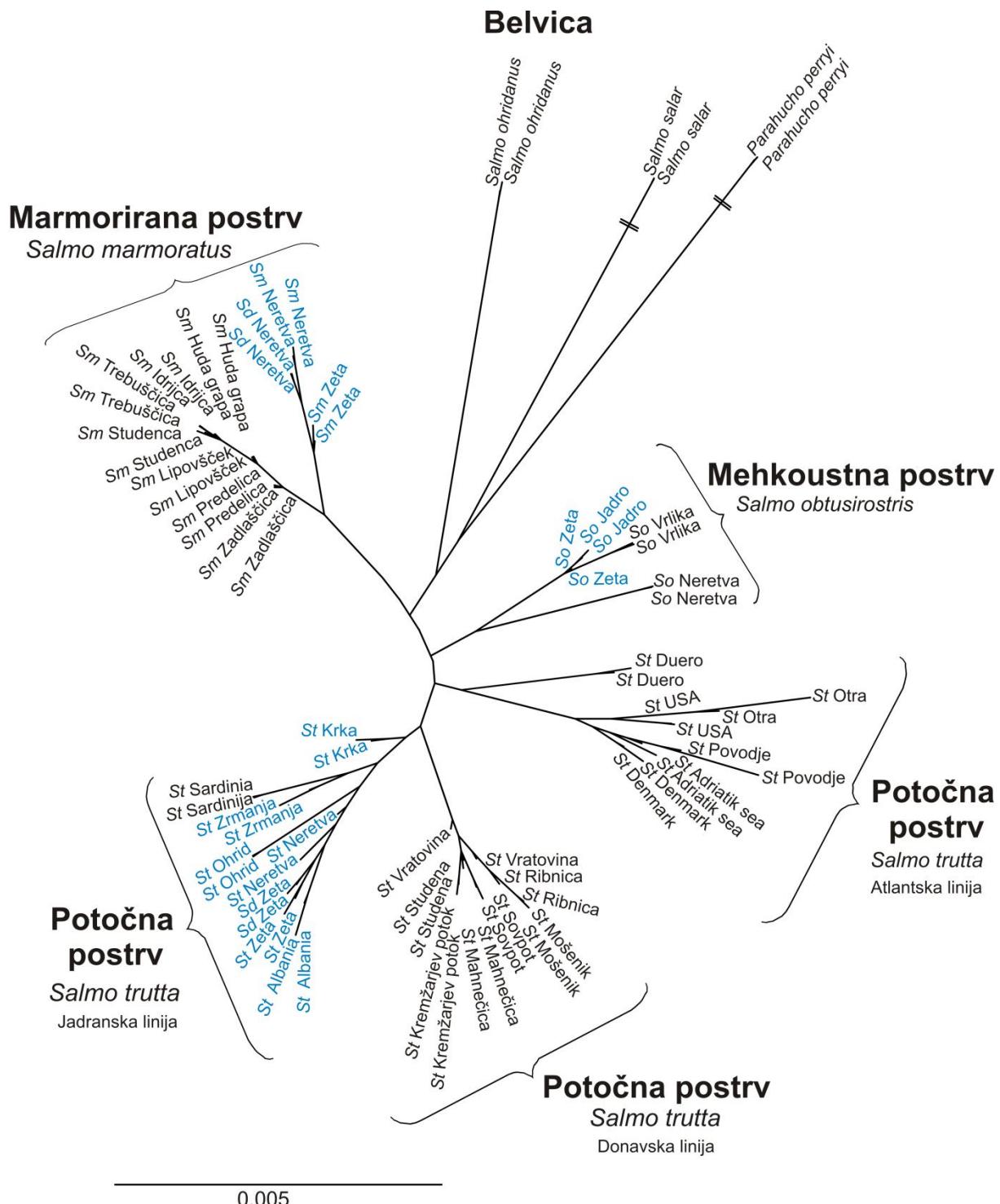
Marmorirana postrv je ribja vrsta, ki jo uvrščamo v rod *Salmo* (Kottelat in Freyhof, 2007). Za popolno razumevanje njene evolucijske zgodovine pa je potrebno poznati filogenetske odnose med marmorirano postrvjo in preostalimi predstavniki rodu, kateremu pripada. Ker je določanje filogenetskih odnosov znotraj rodu *Salmo* v preteklosti temeljilo predvsem na analizi mtDNA (Antunes in sod., 2002; Bernatchez in sod., 1992; Snoj in sod. 2008) in so poznani številni primeri neujemanja s filogenijo na osnovi jedrne DNA (npr. Renault in sod., 2009; Sušnik in sod., 2007; Wiens in sod., 2010), smo evolucijske odnose znotraj omenjenega rodu analizirali še z uporabo 22 jedrnih regij. Ob poravnavi izbranih zaporedij smo določili 234 variabilnih mest, med katerimi je bilo 196 parsimonično informativnih. Pri razrešitvi filogenetskih odnosov v rodu *Salmo* smo uporabili ML metodo in Bayesov statistični pristop. Obe metodi sta se že v preteklosti izkazali kot zelo uporabni za določanje odnosov znotraj različnih rodov (npr. Faille in sod, 2010; Hedin in Thomas, 2010; Wiens in sod, 2010a).

V rodu *Salmo* smo tako določili vrsti atlantski losos in belvica ter večvrstni kompleks postrvi. Večvrstni kompleks smo nadalje razčlenili na: potočno postrv, marmorirano postrv in mehkoustno postrv. Tako lahko na osnovi lastnih analiz zaključimo, da je v rod *Salmo* pravzaprav uvrščenih vsaj pet vrst, natančne analize kompleksa *Salmo trutta* namreč nismo opravili. Opravljeni raziskava odraža nov pogled na omenjen rod, v katerem sta bila v začetku uvrščena le losos in potočna postrv (Delling, 2003), kasneje tudi belvica (Phillips in sod., 2000) in mehkoustna postrv (Snoj in sod., 2002). Na osnovi molekul smo dokazali samostojnost marmorirane postrvi, ki tvori monofiletsko skupino, zaradi česar menimo, da lahko marmorirano postrv obravnavamo kot samostojno vrsto rodu *Salmo*. Opazili smo tudi predhodno že poznano razdrobljenost mitohondrijske AD filogenetske linije (slika 26), ki se pojavlja pri populacijah potočnih postrvi v jadranskem porečju (Snoj in sod., 2009), pri južnih populacijah marmoriranih postrvi (Razpet in sod., 2007), ter pri mehkoustnih postrvih populacije Jadro (Sušnik in sod., 2007a) in Zeta (Sušnik in sod., 2007b). Pojavljanje podobnih mitohondrijskih filogenetskih linij pri različnih vrstah je moč razložiti z nepopolnim ločevanjem linij (angl. *incomplete lineage sorting*). Pri omenjenem fenomenu prihaja do pojava, kjer je mehanizem nastanka vrst hitrejši od nastanka nove mitohondrijske linije

(Heckman in sod., 2007). Pojav nepopolnega ločevanja linij je pogosto opažen ne samo pri ribah (npr. 12 endemičnih ribjih vrst (*Tropheini*) jezera Tanganyika v Afriki, Takahashi in sod., 2001, ribe centralnega Gabona vrste *Mormyroidea*, Sullivan in sod., 2007), ampak tudi pri drugih vrstah živali (npr. mišjem lemurju (*Microcebus*) z Madagaskarja, Heckman in sod., 2007, kobilicah (*Melanoplus*) Skalnega gorovja Severne Amerike, Carstens in Knowles, 2007), pojavlja pa se predvsem pri vrstah, ki se hitro razvijajo (Carstens in Knowles, 2007).

Razlika v filogeniji dobljeni na osnovi jadrne in mtDNA je teoretično lahko tudi posledica introgresivne hibridizacije (angl. *introgressive hybridization*), pri kateri lahko pride do zamenjave celotnega mitohondrijskega genoma z genomom druge sorodne vrste, kar imenujemo zajetje mitohondrijskega genoma (angl. *mtDNA capture*, npr. Good in sod., 2008). Pojav ni pogost, z njim pa so Sušnik in sodelavci (2007b) na podlagi mtDNA, dveh jadrnih regij, devetih mikrosatelinih lokusov in morfologije razložili neskladja v genetski strukturi mehkoustne postrvi iz Neretve in Jadra s potočno postrvjo. Zajetje mtDNA pa se pojavlja npr. tudi pri potočni zlatovščici (*Salvelinus fontinalis*) jezera Alain v Kanadi, ki imajo mtDNA haplotip značilen za jezersko zlatovščico (*Salvelinus alpinus*, Bernatchez in sod., 1995).

Zajetje mtDNA pri tako različnih linijah kot so južne populacije marmoriranih postrvi, dve populaciji mehkoustnih postrvi in potočne postrvi AD linije na tako različnih mestih pa je malo verjetno. Na osnovi analize rodu *Salmo* večjo verjetnost za razlike v filogenetskih odnosih na osnovi jadrne in mtDNA pripisujemo nepopolnemu ločevanju linij.



Slika 26: Zvezdasto filogenetsko drevo dobljeno z metodo največjega verjetja, pri katerem so z modro barvo označene populacije, za katere je značilno mitohondrijsko določena AD filogenetska linija (Sm, *Salmo marmoratus*; Sd, *Salmo dentex*; St, *Salmo trutta*)

Figure 26: Star shaped phylogenetic tree obtained by the maximum likelihood method. Populations characterized by mitochondrial AD phylogenetic lineage are marked with blue (*Sm*, *Salmo marmoratus*; *Sd*, *Salmo dentex*; *St*,

5.1.1 Belvica

Pri filogenetski analizi rodu *Salmo* smo potrdili samostojnost belvice, o kateri so prvi poročali Phillips in sod. (2000), ki zaseda bazalno pozicijo za večvrstni kompleks postrvi, od katerega se je ločila pred približno 3,9 milijoni let. Pri tem je potrebno omeniti, da je bila pri oceni uporabljena vrednost (4 milijone let s standardno deviacijo ± 1 milijon let) dobljena na podlagi analize variabilnosti citokrom b gena pri salmonidih (Sušnik in sod., 2006). Ločitev je najverjetneje močno povezana z nastankom Ohridskega jezera, ki je populacije izoliralo, zaradi česar se je belvica od skupnega prednika postrvi odcepila (Bănărescu, 1991).

V razvoju postrvi pa so pomembno vlogo odigrale tudi pleistocenske poledenitve, ki južnega jadranskega porečja niso prizadele, zaradi česar je območje služilo kot refuga in je še danes poznano kot center raznolikosti in izvora za mnoge vrste (Sket in sod., 2004).

Belvico lahko na osnovi zunanjega videza, morfoloških raziskav, filogenetskih raziskav na mtDNA in jedrnih regijah štejemo kot staro vrsto znotraj rodu *Salmo*, ki je najverjetneje kot prva naselila jadransko porečje (Sušnik in sod., 2006). Na njen posebnost nakazuje tudi dejstvo, da se za razliko od večvrstnega kompleksa postrvi belvica v naravnem okolju z ostalimi predstavniki rodu *Salmo* običajno ne križa (križanci so izredno redki; Sušnik in sod., 2006).

Z opravljenou filogenetsko analizo smo tako potrdili in utrdili njeni mesto v filogenetskem drevesu rodu *Salmo*.

5.1.2 Mehkoustna postrv

Mehkoustna postrv spada v kompleks postrvi, kjer se po opravljeni *BEAST analizi nahaja v bazalnem položaju za marmorirano in potočno postrvjo. ML analiza in analiza opravljena s programom MrBayes pa omenjenih odnosov ni razrešila (politomija). Od najbližjega skupnega prednika s potočno in marmorirano postrvjo naj bi se mehkoustna postrv ločila pred približno 2,4 milijoni let. Ločitev se je najverjetneje zgodila zaradi izolacij posameznih habitatov in s tem razvojem novih linij, iz katerih so se s časom izoblikovale nove vrste.

Od vseh treh vrst znotraj omenjenega kompleksa se prav mehkoustna postrv najbolj morfološko razlikuje (Sanford, 2000). Prav zaradi tega je bila dolgo časa uvrščena v svoj rod *Salmothymus* (Sanford, 2000; Svetovidov, 1975). Na osnovi mtDNA pa je bila prestavljena v rod *Salmo* (Snoj in sod., 2002b), kar smo potrdili tudi z opravljenimi filogenetskimi analizami jedrne DNA. Ugotovili smo, da mehkoustne postrvi predstavljajo samostojen klad, ki se deli na dve skupini: prvo sestavljajo vzorci populacije Neretve in drugo vzorci populacije Vrlike, Jadra in Zete. Sama razcepitev naj bi se zgodila pred približno 1,6 milijoni let in je najverjetnejše povezana s številnimi poledenitvami in otoplitrivami v pleistocenu, zaradi katerih so se posamezni rečni sistemi ločili. Na osnovi preučevanja mtDNA omenjenih populacij (Razpet in sod., 2007b; Snoj in sod., 2002b; Snoj in sod., 2007; Snoj in sod., 2008) je bilo ugotovljeno, da imata za mehkoustno postrv specifično mitohondrijsko linijo samo populaciji Vrlike in Neretva, medtem ko populaciji Jadra in Zeta pripadata AD filogenetski liniji, ki je značilna predvsem za potočno postrv jadranskega porečja. Povezanost med populacijami mehkoustne postrvi Vrlike in Neretve pa so ugotovili že Snoj in sodelavci (2008) na osnovi mikrosatelitne DNA.

Rezultati opravljenih filogenetskih analiz 22 jedrnih regij pa nakazujejo, da populaciji povezanih rek Vrlike in Neretve nista neposredno sorodni. Iz mtDNA in jedrne analize lahko sklepamo, da je mehkoustna postrv porečje Neretve naselila v dveh kolonizacijskih valovih. Prvi val je zajemal glavni tok reke, drugi pa pritok Vrliko, pri čemer so skupni predniki drugega vala naselili še reki Zeto in Jadro. Ker na območju kot kamnina prevladuje za kras značilen apnenec, ki omogoča hitro spreminjaanje pokrajine, obstaja možnost, da Neretva in Vrlika v preteklosti nista bili povezani in da so obstajale povezave med Jadrom in Vrliko, ki so omogočale prehajanja populacijam mehkoustne postrvi (Bianco, 1990), kar bi tudi pojasnilo rezultate filogenetske analize, ki nakazuje na povezanost Vrlike in Jadra.

5.1.3 Marmorirana postrv

Marmorirana postrv v analiziranih filogenetskih drevesih jedrnih regij DNA zaseda samostojen klad in ni razvrščena med potočne postrvi, kar je tudi ena izmed bolj očitnih razlik v primerjavi z že raziskano filogenijo mtDNA. Na osnovi mtDNA je obravnavana kot samostojna linija (*marmoratus*) znotraj potočnih postrvi, med katerimi ji je najbolj sorodna AD linija (Bernatchez, 2001). Obe liniji se nahajata v jadranskem porečju, katerega naj bi

AD linija potočne postrvi na osnovi analize 12 mikrosatelitnih označevalcev naselila pred približno 150 tisoč leti (Sušnik in sod., 2007a), kar sovpada z razširtvijo ME linije v mediteranskem porečju (Bernatchez, 2001; Cortey in sod., 2004).

Pomembna razlika med mtDNA in jedrno filogenijo je opažena tudi na nivoju primerjave severnih in južnih populacij marmorirane postrvi, pri čemer je za obe populaciji značilen marmoriran fenotip. Predhodno so bile na osnovi mtDNA južne populacije razvrščene v AD filogenetsko linijo (Razpet in sod., 2007b), severne pa v filogenetsko linijo *marmoratus* (Bernatchez in sod., 1992). Haplotipi linije *marmoratus* (MA), prvotno značilni le za marmorirano postrv severnih populacij, so bili nato odkriti tudi pri potočnih postrvih južnega jadranskega, egejskega in mediteranskega porečja z značilnim fenotipom potočne postrvi (Bernatchez, 2001; Apostolidis in sod., 1997; Snoj in sod., 2009; Splendiani in sod., 2006) in jih zato ni moč izključno povezati samo s fenotipom marmorirane postrvi. Prevladovalo je mnenje, da severne in južne populacije marmorirane postrvi niso neposredno sorodne (Razpet in sod., 2007b). Z analizo jedrnih regij pa smo prvič dokazali sorodnost obeh populacij in njihov skupen izvor (pri čemer z besedo izvor opredeljujemo obstoj najbližjega skupnega prednika).

Do ločitve obeh populacij je najverjetneje prišlo zaradi dviga jadranskega morja, ki je nastal zaradi otoplitrve v pleistocenu. Pri tem so se nekoč združene reke ločile, prehod po morju pa je bil zaradi povečanja slanosti onemogočen (Bianco, 1990). Tako je najverjetneje pred približno 0,84 milijona let prišlo do ločitve severnih in južnih populacij marmorirane postrvi. Ločitev severne in južne populacije je v preučevanih drevesih dobro podprta. Zaradi molekularnih markerjev, na osnovi katerih je mogoče obe populaciji medsebojno ločevati in zaradi njune geografske in reproduksijske izoliranosti obe ustrezata kriterijem, ki ju opredeljujejo kot evolucijsko signifikantni enoti ohranjanja (ESU, angl. Evolutionarily Significant Unit, Waples, 1991). Združevanje osebkov severnih in južnih populacij za namene ohranjanja posameznih ogroženih populacij zato ni primerno.

Pri analizi posameznih populacij severnega jadranskega porečja smo ugotovili genetsko povezanost populacij Predelica in Zadlaščica, za kateri je značilen tudi specifičen marmoriran fenotip, pri katerem se rdeča pigmentacija v obliki pik ne pojavlja. Značilen soški fenotip je

najverjetneje nastal v času poledenitve soškega porečja, ko je ledenik prekril Sočo vse do Kobarida (Bianco 1990), pri čemer obstaja možnost da je bilo prehajanje marmoriranih postrvi iz soškega v idrijsko porečje onemogočeno.

Prav tako je opazna genetska povezanost populacij Huda grapa in Lipovšček, ki sta si tudi geografsko blizu in sta del porečja Bače ter populacij Studenca, Idrijca in Trebuščica, ki predstavljajo genetsko čiste populacije marmoriranih postrvi izvirnih delov Idrijce in pritokov.

5.1.4 Potočna postrv

Na podlagi opravljenih filogenetskih raziskav sklepamo, da je do prvih ločitev posameznih linij potočne postrvi prišlo pred približno 1,2 milijoni let. Pri tem naj bi se prva odcepila AT linija (bazalna linija), ki je v času pleistocenske poledenitve ostala ujeta v refugijih severne Afrike in Iberskega polotoka (Cortey in sod., 2004), do koder ledenik, ki je pokrival osrednjo Evropo, ni segal. Snoj in sodelavci (2011) pa so z analizo mtDNA potočnih postrvi Maroka dokazali, da AT filogenetska linija še danes naseljuje severozahodne dele Afrike tako atlantskega kot tudi mediteranskega porečja. Da je AT linija bazalna linija potočnih postrvi, je na podlagi analize mtDNA ugotovil že Bernatchez (2001). Nekateri avtorji se z njim ne strinjajo in kot bazalno opredeljujejo DA linijo (Cortey in sod., 2004), naše raziskave pa so potrdile Bernatchezeva opažanja. Dodaten dokaz za bazalnost AT linije je prilagojenost njenih anadromnih populacij na slano okolje, kar je prav tako značilnost atlantskega lososa in najverjetneje predstavlja prednisko lastnost, ki je bistveno vplivala na migracijo in distribucijo postvi. Tako je anadromnost še vedno prisotna pri številnih populacijah atlantske linije postrvi (Degerman in sod., 2012), poleg tega pa so bili najdeni primerki AT potočne postrvi tudi v severnem Jadranskem morju (Snoj in sod., 2002a); le-ti seveda niso avtohtoni, ampak so bili tja zaneseni s poribljanjem severno-jadranskih rek z domesticirano linijo atlantske postrvi, ki je kljub intenzivni selekciji na ribogojniške razmere očitno ohranila anadromni nagon.

Za nastanek različnih linij potočne postrvi so najverjetneje najbolj odgovorne velike klimatske spremembe, ki so se zgodile v pleistocenu (Bernatchez in sod., 1992). Te so povzročile prerazporejanje vodnih sistemov, s tem pa tudi izolacijo posameznih populacij potočne postrvi. Tako naj bi se na osnovi *BEAST filogenetske analize pred približno 0,82

milijoni let od prednje linije ločila DA linija. Pri tem je potrebno omeniti, da je podatek dobljen na osnovi analize mtDNA kontrolne regije kompleksa potočne postrvi ($0,7 \pm 0,2$ milijona let, Bernatchez, 2001). Časovna opredelitev sovpada s sredino pleistocena, ko sta se ločili današnje donavsko in jadransko porečje in posledično migracijske poti potočnih postrvi med obema porečjem (Bernatchez in sod., 1992), pri čemer sta obe populaciji ostali izolirani. Sama ločitev je bila opažena tudi na nivoju mtDNA, izvor DA linije pa naj bi bilo porečje Črnega morja (Bernatchez, 2001; Georgijev, 2003).

Na osnovi filogenije jedrnih regij ni bilo mogoče ločevati med populacijami ME in AD linije. Obe liniji povezuje tudi njuna izvorna zgodovina, saj je v času poledenitve mediteranski refugij predstavljal vir za kasnejšo naselitev tako mediteranskega kot tudi jadranskega porečja (Bernatchez, 2001). Omenjena sorodnost je bila opažena tudi preko filogenetskih analiz mtDNA (Bernatchez in sod., 1992; Cortey in sod., 2004; Giuffra, 1994; Suarez in sod. 2001), poleg tega pa se distribuciji AD in ME mtDNA linije marsikje prekrivata (npr., AD haplotipi v mediteranskem porečju na Iberskem polotoku (Cortey in sod., 2004) ter ME haplotipi v jadranskem porečju Italije (Splendiani in sod., 2006)). Vendar moramo poudariti, da smo v svoji študiji pri filogenetskih analizah uporabili le dva vzorca ME linije, zato ne moremo z gotovostjo ocenjevati, ali je markerski sistem temelječ na jedrni DNA zmožen ločevati med obema linijama.

5.1.5 Zubatek

V filogenetske analize smo vključili tudi dva vzorca tako imenovanega zubatka (*S. dentex*) iz reke Neretve in dva vzorca iz reke Zete. Pri tem sta bila vzorca Neretva uvrščena skupaj z vzorci marmorirane postrvi iz Neretve, vzorca iz Zete pa z vzorci potočnih postrvi iz te lokacije. Na osnovi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da zubatek kot vrsta ne obstaja, ampak se pojavlja kot morfološka prilagoditev potočnih in marmoriranih postrvi na podobno okolje. Do enakih dognanj so na osnovi mtDNA in posameznih jedrnih regij prišli že Snoj in sodelavci (2010), ki so ugotovili, da forma dentex (zubatek) značilna predvsem kot jezerska oblika potočne in marmorirane postrvi.

5.2 POPULACIJSKO GENETSKA STRUKTURA MARMORIRANE POSTRVI V SLOVENIJI

5.2.1 SNP označevalci pri določanju genetsko čistih marmoriranih postrvi ter AT in DA filogenetske linije potočne postrvi.

V preteklosti so se za ločevanje genetsko čistih osebkov od hibridov uporabljali alocimi (Alarcón in Alvarez, 1999; Gaur in Slinkard, 1990; Yang in sod., 2001), mtDNA (Avise in Saunders, 1984; Chen in Leibenguth, 1995; Harrison, 1989), mikrosateliti (Alendorf in sod., 2001; Crooijmans in sod., 1997; Hansen in sod., 2001) in RAPD (Bardakci in Skibinski, 1994; Jug in sod., 2004; Partis in Wells, 1996). Z razvojem novih molekularnih tehnik in vse višji zahtevi po natančnem ločevanju pa se čedalje več uporablja SNP označevalce (Morin in sod., 2004).

Da bi lahko zanesljiveje določili delež genetsko čistih osebkov v coni križanja severnega jadranskega porečja v Sloveniji, kjer sicer prihaja do križanja med marmorirano in potočno postrvjo AT in DA filogenetske linije, smo uporabili KASPar sistem s 36 diagnostičnimi SNP označevalci. Pri tem se pojavi pomembno vprašanje, kolikšno število označevalcev je potrebno za zanesljivo določanje genetsko čistih osebkov. Na populacijskem nivoju lahko že z relativno majhnim številom (tri do pet) označevalcev dokaj zanesljivo ugotavljamo, ali je posamezna populacija genetsko čista. Tako je zanesljivost čistosti populacije, ki vsebuje 30 osebkov testiranih na treh označevalcih enaka kot zanesljivost, da je naključni posameznik genetsko čist po testiranju z 90 označevalci (Pustovrh in sod., 2012). Boecklen in Howard (1997) pa sta s poskusom križanja ugotovila, da je v coni križanja štiri do pet označevalcev dovolj za grobo razdelitev osebkov na genetsko čiste in križance, medtem ko je potrebnih vsaj 17 označevalcev za ločevanje med čistim osebkom in povratnim križancem tretje generacije.

Glede na omenjeno smo mnenja, da je 36 SNP-jev zadostno število za ločevanje genetsko čistih osebkov in različnih generacij povratnih križancev, ob tem pa KASPar genotipizacijski sistem omogoča hitro in zanesljivo metodiko. Uporaben pa ta sistem ni le za testiranje čistosti osebkov na območju Slovenije (soško in idrijsko porečje); z uspešno analizo dveh populacij iz italijanskega dela jadranskega porečja, kjer so pred kratkim pričeli s programom zaščite in

odbire genetsko čistih marmoriranih postrvi in kjer se marmorirane postrvi od tistih iz Slovenije nekoliko razlikujejo glede na mtDNA haplotipe, smo dokazali uporabnost te metode tudi na širšem območju severnih populacij marmorirane postrvi. Pri tem smo odkrili, da v porečju reke Adige pri nekaterih populacijah do popolnega križanja med vrstama ne prihaja in da v njih še živijo posamezni genetsko čistih osebki, s čimer smo potrdili rezultate mikrosatelitne analize, ki so jo opravili Meraner in sodelavci (2010).

Omenjen sistem smo s pravilnim izborom diagnostičnih lokusov preliminarno uporabili še za določanje genetske čistosti marmoriranih postrvi reke Neretve in Zete, kjer prav tako prihaja do križanja marmorirane postrvi s potočno postrvjo različnih linij (Razpet in sod., 2007b). Ker se severne in južne populacije genetsko nekoliko razlikujejo, smo lahko uporabili le pet SNP označevalcev (GP31_ma, GP57_ma, PG5_ma, HMG1_ma in RH_ma; priloga B), za katere smo ugotovili alele, ki so skupni tako severnim kot tudi južnim populacijam marmoriranih postrvi (še neobjavljeni podatki).

Za gojenje v ribogojnicah in poribljavanje različnih rek Evrope pa tudi Amerike, Azije, Nove Zelandije in Avstralije (MacCrimmom in sod., 1970) se je in se najpogosteje uporablja domesticirano AT filogenetsko linijo potočne postrvi. Vzreja temelji na odbiri hitrorastočih osebkov, pri čemer je bila genetska variabilnost linije močno zmanjšana (Marič in sod., 2010; Ryman in Stahl, 1980). Ker so domesticirano AT linijo vnašali v različna porečja, kjer so bile naravno prisotne avtohtone potočne postrvi, je prihajalo do križanja. Poznan je primer donavskega porečja, kjer je ribogojniška AT linija močno izrinila avtohtonou DA filogenetsko linijo potočne postrvi (Bogataj, 2010; Marič in sod., 2006, Weiss in sod., 2001). Poznani so tudi primeri vnosa DA linije v atlantsko porečje (Hansen in sod., 2001), ki so prav tako povzročili določeno škodo pri avtohtonih populacijah. Ker nam zasnovan genotipizacijski sistem omogoča ločevanje med AT in DA linijo, ga je mogoče uporabiti tudi pri odbiri genetsko čistih potočnih postrvi obeh filogenetskih linij in s tem pri njuni zaščiti.

Iz opisanih primerov je razvidno, da zasnovani genotipizacijski sistem ni uporaben le za zaščito marmorirane postrvi v Sloveniji, ampak je njegova uporabnost veliko širša, pri čemer ga je moč uporabiti kot pomembno orodje za ohranjanje avtohtonih linij potočne postrvi tako v atlantskem kot tudi donavskem porečju.

5.2.2 Variabilnost osmih genetsko čistih marmoriranih postrvi v Sloveniji

Pri ohranjanju marmorirane postrvi je poleg njene evolucijske zgodovine potrebno poznavati tudi genetsko strukturo populacij. V Sloveniji je znanih osem genetsko čistih populacij marmorirane postrvi, ki naseljujejo izolirane potoke soškega in idrijskega porečja (Jug in sod., 2005). S pregledom naključnih nukleotidnih zaporedij jedrne DNA smo ugotovili, da je ob primerjavi osebkov teh populacij relativno malo polimorfnih mest. Pri tem smo z genotipizacijskim sistemom KASPar uspeli umeriti le pet SNP-jev, ki so bili za omenjene populacije polimorfni. Rezultat nakazuje, da velikih genetskih razlik med populacijami ni, kot se je sprva sklepalo na osnovi analize 15 mikrosatelitnih označevalcev (Fumagalli in sod., 2002). Pri tem se je potrebno zavedati, da je stopnja mutacij nekaterih delov jedrne DNA nižja od drugih, visoko stopnjo pričakujemo predvsem pri mikrosatelitih. Kljub uporabi le petih SNP označevalcev pa smo osem populacij dokaj zanesljivo uspeli razdeliti v sedem skupin, pri čemer nismo uspeli ločiti osebkov Zadlaščice in Predelice, kar nakazuje na tesno sorodnost obeh populacij, ki pripadata zgornjemu soškemu porečju.

Glede na izkušnje sklepamo, da bi z razširitvijo nabora SNP označevalcev najverjetneje lahko vzpostavili sistem za ločevanje med vsemi osmimi populacijami. Tako bi bilo možno genetsko čiste posameznike marmorirane postrvi iz cone križanja zanesljivo razdeliti glede na izvorno populacijo.

5.2.3 Filogeografski odnosi med osmimi genetsko čistimi populacijami marmorirane postrvi v Sloveniji

Nekatere populacije marmorirane postrvi so si bolj sorodne od drugih. Posebno dobro podprt je bil skupen izvor Predelice in Zadlaščice ter Hude grape in Lipovščka, ki so jo podpirale vse analize tako na osnovi nukleotidnih zaporedij 22 jedrnih lokusov, kot tudi genotipizacije petih polimorfnih SNP-jev. Skupen izvor osmih genetsko čistih populacij marmorirane postrvi s pomočjo analize 15 mikrosatelitnih lokusov so predhodno raziskovali že Fumagalli in sodelavci (2002), ki skupnega izvora Predelice in Zadlaščice ter Hude grape in Lipovščka niso zaznali, ugotovili pa so skupen izvor populacij Sevnice, Studenca, Idrijce in Trebuščice. Na osnovi vseh analiz zaporedij 22 jedrnih lokusov ter FCA analize smo potrdili povezanost izvora populacij Studenca, Idrijce in Trebuščice, z analizo nekoreninjenega drevesa izrisanega

po metodi NJ pa povezanost Idrijce in Trebuščice. Sama povezanost izvora posameznih populacij sovpada z geografsko porazdelitvijo. Tako se Zadlaščica in Predelica neposredno izlivata v reko Sočo, populaciji Huda grapa in Lipovšček sta del porečja Bače, populacije Sevnica, Idrijca, Trebuščica in Studenca pa so del zgornjega idrijskega porečja. Sama porazdelitev populacij podpira teorijo o neenakomerni poledenitvi v času pleistocena (Bianco, 1990), pri čemer je soško porečje pokrival ledenik, ki pa ni segal čez idrijsko porečje. Tako naj bi se reka Idrijca v tem času stikala s savskim porečjem, kar nakazuje tudi študija na raku koščaku, ki je prisoten tako v idrijskem kot v savske porečju (Budihna, 2001). Na osnovi dobljenih rezultatov povezanosti posameznih populacij bi lahko genetsko čiste populacije razdelili v tri skupine (soško: Predelica, Zadlaščica, baško: Lipovšček, Huda grapa in zgornje idrijsko: Sevnica, Idrijca, Trebuščica in Studenca), katerih združevanje za namene pridobivanje zaroda zaradi genetske različnosti ni priporočljivo.

5.2.4 Nastanek fenotipa marmorirane postrvi idrijskega in soškega porečja

Če se je idrijsko porečje v času poznega pleistocena zaradi neenakomerne poledenitve soškega porečja res stikalo s savskim, potem obstaja možnost, da je bil omogočen prehod potočnih postrvi v jadransko porečje in marmoriranih postrvi v donavsko porečje.

Da bi zanesljivo preverili hipotezo o možnem prehodu postrvi iz severnega jadranskega v sosednje donavsko porečje, smo v analizo vključili vzorce 10 populacij donavskega porečja (med katerimi so bile na osnovi Structure analize štiri opredeljene kot genetsko čiste donavske populacije), ki na idrijsko porečje mejijo. Pri preiskovanih populacijah nismo našli niti enega predstavnika, ki bi na jedrnem genomu izražal alele značilne za marmorirano postrv. Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da prehoda marmoriranih postrvi v donavsko porečje ne moremo potrditi. Zaradi geološko razgibanega terena pa obstaja možnost, da je bil prehod le enosmeren in je omogočal prehajanje le potočnih postrvi v jadransko porečje. Takšno migracijo bi lahko povzročile začasne spremembe v smeri toka (ang. river capture) reke Save, ki bi omogočile izlivanje savskega v idrijsko porečje.

Da bi hipotezo preverili, smo podrobnejše analizirali še populacije v idrijskem porečju, ki ležijo blizu meje med donavskim in jadranskim porečjem. S STRUCTURE analizo smo potrdili dve populaciji, (Peklenski potok, PEK in Cerknica, CER), pri katerih je tako na

mitohondrijski kot tudi jedrni DNA prevladovala DA filogenetska linija potočne postrvi. Pri populaciji Peklenski potok je dobršen delež (več kot 30%) jedrne DNA pripadal marmorirani postrvi. Pri STRUCTURE analizi ostalih populacij tako idrijskega kot tudi soškega porečja pa smo ugotovili, da se je DA filogenetska linija potočne postrvi le redko uporabljala za poribljavanje omenjenih porečij. Da bi preverili možnost vnosa ribogojniško vzrejenih postrvi v populaciji Peklenski potok (PEK) in Cerknica (CER), smo pregledali še arhivske podatke RD Idrija v zadnjih 50 letih in ugotovili, da takšen vnos v omenjeni populaciji ni zaveden. Vsa našteta dejstva močno podpirajo hipotezo o možnosti prehoda potočnih postrvi iz savskega v idrijsko porečje in križanje obeh vrst. Pri tem je potrebno omeniti, da smo pri obeh populacijah našli tudi določen delež AT filogenetske linije (značilne za ribogojniške potočne postrvi), ki nakazuje možen vnos oz. migracijo AT linije potočne postrvi v populacijo, zaradi česar ne moremo popolnoma izključiti, da tudi genom DA linije v obeh populacijah ni vnesen.

Pri podrobnejši primerjavi petih SNP označevalcev (variabilnih pri marmorirani postrvi) med osmimi genetsko čistimi populacijami marmorirane postrvi in potočne postrvi AT in DA filogenetske linije smo ugotovili, da zaznavne razlike v prisotnosti za potočno postrv značilnih SNP-jev pri marmorirani postrvi med populacijami idrijskega in soškega porečja ni (preglednica 8). Enako so ugotovili že Jug in sodelavci (2005), ki so tako pri populacijah idrijskega kot tudi soškega porečja opazili potočne alele. To zagotovo ne potrjuje hipoteze o možnem prehodu potočnih postrvi v jadransko porečje, zavrača pa je tudi ne povsem, saj so se preučevane mutacije v različnih populacijah marmorirane postrvi lahko pojavile neodvisno in niso nujno posledica križanja s potočno postrvjo. Kljub temu, da razlik v prisotnosti za potočno postrv značilnih SNP-jev med populacijami marmorirane postrvi v idrijskem in soškem porečju nismo ugotovili, pa so to razliko opazili Berrebi in sodelavci (2000), ki so analizirali 31 izocimskih alelov in ugotovili povezavo med LDH lokusom in odsotnostjo rdeče pigmentacije pri populaciji Zadlaščica.

Preglednica 8: Deleži posamezne nukleotidne variante pri osmih genetsko čistih populacijah marmorirane postrvi in potočni postrvi donavske (DA) in atlantske (AT) evolucijske linije (* označuje povprečni delež nukleotida značilnega za potočno postrv v populaciji) analiziranih s petimi za marmorirano postrv variabilnimi lokusi

Table 8: Proportion of different nucleotide variant in eight populations of genetically pure marble trout and danubian (DA) and Atlantic (AT) phylogenetic lineage of brown trout (* average proportions of brown trout specific nucleotide in population) tested with five marble trout variable loci

	PG20_mam		plagl2_mam		GP16_mam		GP34_mam		GP94mam		*
	A	C	G	A	G	T	indel	T	T	C	
AT	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
DA	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
Sevnica	0	100	18	82	64	36	18	82	100	0	40
Studenca	0	100	0	100	100	0	100	0	80	20	56
Idrijca	0	100	0	100	100	0	100	0	0	100	40
Huda grapa	0	100	100	0	0	100	100	0	0	100	40
Zadlaščica	54	46	39	61	4	96	59	41	96	4	50
Trebuščica	4	96	90	10	4	96	11	89	2	98	22
Predelca	100	0	37,5	62,5	0	100	100	0	98	2	67
Lipovšček	52	48	92	8	12,5	87,5	20	80	22	78	57

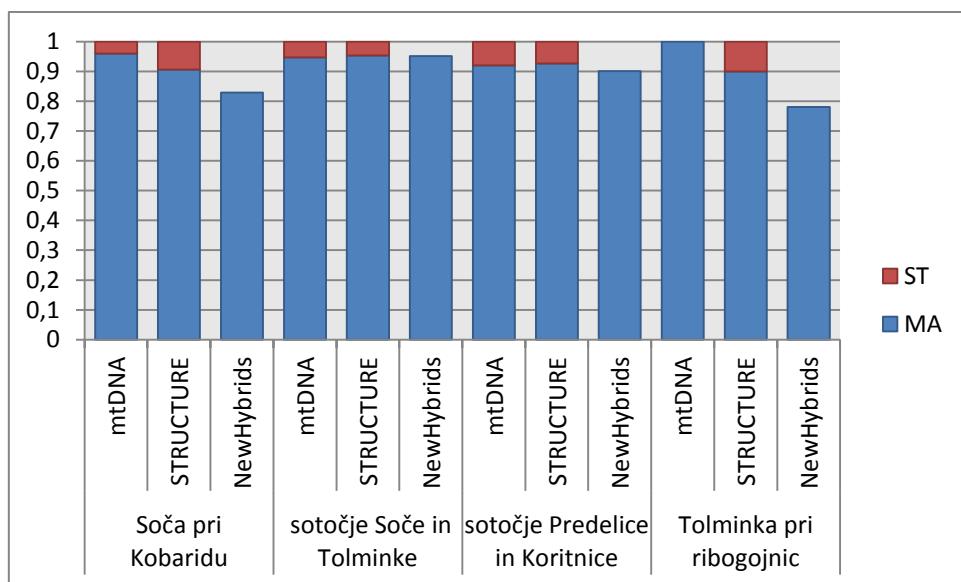
Potočna in marmorirana postrv sta se v procesu nastajanja vrst najverjetnejše popolnoma ločili v dve samostojni vrsti. V primeru, da pa je prišlo do ponovnega srečanja (sekundarnega stika), je med njima lahko prišlo do izmenjave genetskega materiala. Količina migrantov potočne postrvi, ki so hipotetično prešle v jadransko porečje, najverjetnejše ni bila velika, zato je delež genoma, ki so ga pri izmenjavi prispevale potočne postrvi, majhen. Pri tem so se lahko izmenjali deli, ki vplivajo na fenotip, kar pojasnjuje razliko med idrijskim (marmorirana postrv z rdečimi pikami po boku) in soškim fenotipom (marmorirana postrv brez rdečih pik), ohranil pa se je tako za linijo značilen haplotip *marmoratus* (Bernatchez, 2001) kot tudi večji del jedrnega genoma, pri čemer bi lahko vlogo odigral tudi seleksijski pritisk. Po končani poledenitvi se naj bi povezava med savskim in jadranskim porečjem dokončno prekinila. Ker pa se osem genetsko čistih populacij nahaja v izoliranih pritokih, do njihovega stika ni prišlo, zaradi česar so se značilni fenotipi ohranili. Kljub temu, da je nekoč v preteklosti po odcepitvi marmoriranih in potočnih postrvi morebiti prišlo do sekundarnega kontakta idrijskih in savskih populacij, se je vrstna identiteta marmorirane postrvi idrijskega porečja ohranila, zaradi česar jo lahko obravnavamo kot del genetsko čiste marmorirane postrvi. Fenomen ponovnega srečanja že razdvojenih vrst je pogosto prepoznan tako pri ribah (npr. med dvema

ameriškima postrvema (*Salmo gairdneri* in *Salmo clarki clarki*), Campton in Utter, 1985, med potočno postrvjo in atlantskim lososom, McGowan in Davidson, 1992, med dvema vrstama zlatovščice (*Salvelinus malma* in *Salvelinus confluentus*), Baxter in sod., 1997), kot tudi pri številnimi drugih vrstah živali (npr. med rjavim medvedom (*Ursus arctos*) in polarnim medvedom (*Ursus maritimus*), Edwards in sod., 2011, med dvema vrstama male progaste veverice (*Tamias ruficaudus* in *Tamias amoenus*), Good in sod., 2008, med dvema vrstama rac (*Anas falcata* in *Anas strepera*), Peters in sod., 2007). Pri vseh omenjenih primerih naravna hibridizacija močno vpliva na posamezne lastnosti različnih vrst in jo je nujno potrebno upoštevati pri njihovi zaščiti (Allendorf in sod., 2001).

5.2.5 Delež marmoriranih postrvi v coni križanja

Zaradi nenehnega vnosa potočne postrvi v reke severnega jadranskega porečja je marmorirana postrv kot posledica križanja z njo začela izginjati (Jug in sod., 2005; Razpet in sod., 2007a). Na podlagi zapisanih podatkov naj bi bilo med leti 1980 in 1993 od vseh ujetih postrvi v reki Soči le 5,15% po fenotipu čistih marmoriranih postrvi (Povž in sod., 1996). Po nekaterih podatkih pa naj bi bilo v soškem in idrijskem porečju konec 90 let v povprečju okoli 1/3 genoma marmorirane in 2/3 potočne postrvi (Crivelli in sod., 2000). Leta 1996 je bil dokončno prepovedan vnos potočnih postrvi v soško in idrijsko porečje, začelo se je pospešeno vnašanje genetsko čistih marmoriranih postrvi (Crivelli in sod., 2000). Da bi lahko ocenili trenutno genetsko stanje populacij križanja severnega jadranskega porečja predvsem na območju Slovenije, smo s KASPar genotipizacijskim sistemom, zasnovanim na 36 diagnostičnih SNP označevalcih, analizirali kar 52 različnih populacij križanja in ocenili njihovo genetsko strukturo. Za lažjo interpretacijo smo povodje razdelili na porečja različnih rek (Soča, Idrijca, Vipava, Reka, Rižana in Adige), ki predstavljajo geografsko zaokrožene celote. Analize so pokazale, da je delež genetsko čistih marmoriranih postrvi v večini populacij dokaj visok. Tako je danes v povprečni populaciji 20% genetsko čistih osebkov. Ugotovljeno je bilo tudi, da se populacije z večjim deležem čistih osebkov nahajajo predvsem v zgornjih delih soškega porečja, pri čemer je potrebno poudariti predvsem populacije Soča pri Kobaridu (KOB), sotočje Soče in Tolminke (SPS), sotočje Predelice in Koritnice (PRM) ter Tolminka pri ribogojnici (RIT), v katerih je bil s STRUCTURE analizo dokazan vsaj 90% delež marmorirane postrvi. Pri omenjenih populacijah je visok tudi delež genetsko čistih osebkov dokazan s NewHybrids analizo. Tako smo pri populaciji sotočje Soče in Tolminke

(SPS) in populaciji sotočje Predelice in Koritnice (PRM) ugotovili več kot 90% delež, pri populaciji Soča pri Kobaridu (KOB) več kot 80% delež, pri populaciji Tolminka pri ribogojnici (RIT) pa več kot 70% delež genetsko čistih marmoriranih postrvi (slika 27). Za nastalo stanje imajo velike zasluge lokalne ribiške družine, predvsem RD Tolmin.



Slika 27: Delež genoma izračunanega z analizo mtDNA ter STRUCTURE analizo, in delež genetsko čistih osebkov dobljen s programom NewHybrids, ki pripadajo marmorirani (MA) oz. potočni (ST) postrvi

Figure 27: The proportion of genome calculated using mtDNA and STRUCTURE analyses and amount of pure individuals calculated with NewHybrids belonging to marble (MA) or brown (ST) trout

Stanje glede deleža genoma, ki pripada marmorirani postrvi, je nekoliko slabše v spodnjem toku reke Soče in njenih pritokih (v Sloveniji), kjer dobršen delež genoma predstavlja AT linija potočne postrvi. Pri tem se je potrebno zavedati, da prepoved vnosa potočnih postrvi v jadransko porečje velja samo za Slovenijo in da v italijanske dele reke Soče še vedno vnašajo potočno postrv predvsem AT linije, ki izvira iz različnih lokalnih ribogojnic (Meraner in sod., 2007). Ker migracija postrvi spodnjega toka reke Soče ni popolnoma onemogočena, lahko vnesene potočne postrvi migrirajo v hibridne populacije slovenskega dela Soče. Pri NewHybrids analizi smo tako v populacijah spodnjega toka Soče in njenih pritokov od celokupno 253 pregledanih rib določili 27 osebkov genetsko čistih potočnih postrvi. Potrebno je izpostaviti predvsem populaciji Idrija (IDJ) in Belski potok (BEP), kjer z več kot 90% prevladujejo potočne postrvi, pri čemer je populacija Belski potok (BEP) tudi edina populacija soškega porečja, kjer smo določili povečan delež (15%) DA filogenetske linije

potočne postrvi. Omenjene ugotovitve nakazujejo na dejstvo, da je vnos potočnih postrvi na italijanski strani soškega porečja še vedno močno prisoten, pri čemer ne moremo izključiti nenadzorovanega vnosa potočnih postrvi v slovenske dele soškega porečja.

Pomemben delež slovenskega dela severnega jadranskega porečja predstavlja idrijsko porečje, kjer se nahaja šest od osmih genetsko čistih populacij marmorirane postrvi. V porečju pa je marmorirana postrv predvsem zastopana v populacijah zgornje Idrijce in Bače, v spodnjih delih Idrijce pa se pojavlja velik delež AT linije potočne postrvi. Naseljevanje AT linije po podatkih RD Idrija sega v čas italijanske okupacije Idrije, ki je potekala do leta 1943. Pri tem so italijanske oblasti močno pospeševale ribogojstvo in vzgojo predvsem potočne postrvi (Razpet in sod., 2007a). Zaznali smo tudi dobršen delež DA filogenetske linije v populacijah zahodnega dela idrijskega porečja, ki pa bi lahko nakazovali na prehod potočnih postrvi iz savskega v idrijsko porečje.

V porečju rek Rižane, Reke in Vipave je delež genetsko čistih marmoriranih postrvi zelo nizek, ponekod takšnih osebkov sploh ni. V tem delu prevladuje vnesena neavtohtona AT linija potočne postrvi. Pri tem je potrebno izpostaviti populacijo Perilo (PER), ki se nahaja v izoliranem potoku, kjer je stik z drugimi populacijami onemogočen. V populaciji prevladuje AT linija potočne postrvi, medtem ko DA linije in marmorirane postrvi v potoku nismo zasledili. Zaradi omenjenih dejstev populacija najverjetneje predstavlja potomce osebkov, ki so jih v preteklosti uporabljali za poribljavanje teh predelov in so bili najverjetneje v omenjen potok naseljeni potem, ko je bil ta izpraznjen.

Da v predelih rek Rižane, Reke in Vipave prevladuje predvsem AT linija potočne postrvi, je krivo poribljavanje s potočno postrvijo ribogojniškega izvora in okoljske spremembe v zadnjih 30 letih. Zaradi podnebnega segrevanja je letni nivo vodotokov močno upadel (avtorjeva opažanja), temperatura pa se je v povprečju zvišala. Ker marmorirani postrvi ustrezajo zlasti hitri in mrzli vodotoki, je selekcijski pritisk dodelil prednost potočni postrvi, ki se je toplejši vodi lažje prilagodila (Jesenšek, 1994).

Za primerjavo in oceno stanja zaščitenih populacij marmorirane postrvi Italije (Meraner in sod., 2010) smo analizirali še dve populaciji porečja Adige in ugotovili, da delež genoma v

obeh populacijah presega 80% celotnega genoma ter določili 28 (od analiziranih 50 vzorcev) genetsko čistih marmoriranih postrvi. Rezultati so primerljivi z rezultati Meranerja in sodelavcev (2010), ki so omenjeni populaciji analizirali z 12 mikrosatelitnimi označevalci. Tako smo dokazali uporabnost postavljenega genotipizacijskega sistema na 36 SNP-jih tudi za določanje genetske čistosti marmoriranih postrvi italijanskega dela jadranskega porečja.

Pri zaščiti vrst oz. linij se pogosto pojavlja vprašanje, kakšen delež genoma pri posamezniku mora pripadati določeni vrsti/liniji, da osebek lahko uporabimo za nadaljnje razmnoževanje in s tem zaščito te vrste/linije. Odgovor je odvisen od števila genetsko čistih osebkov določene vrste/linije, ki naseljujejo naravno okolje in njihove genetske variabilnosti. Ker se v conah križanja predvsem zgornjega soškega pa tudi idrijskega porečja nahaja zadostno število genetsko čistih osebkov marmorirane postrvi in ker bi lahko že manjši delež genoma ribogojniške potočne postrvi povzročil znižanje genetske variabilnosti marmorirane postrvi (Ingvarsson, 2001), je priporočljivo, da se za ohranjanje vrste uporablja le genetsko čiste posameznike. Da pa z vnosom ribogojniško vzgojene marmorirane postrvi ne bi zmanjšali variabilnosti naravnih populacij, je potrebno matično jato vsako leto osvežiti z novimi genetsko čistimi marmoriranimi postrvmi. Ker le te običajno izvirajo iz cone križanja, nam bo v prihodnje pri njihovi odbiri pomagal postavljen genotipizacijski sistem, ki ga bo moč z leti še nadgraditi z novimi SNP označevalci.

5.2.6 HWE in F_{IS} vrednosti preučevanih populacij

Populacije križanja so si med seboj po sami genetski strukturi zelo različne, kar nakazuje na dejstvo, da je bilo vlaganje neavtohtonih potočnih postrvi neenakomerno. Če se vsi posamezniki v določeni populaciji naključno parijo med seboj, bodo frekvence alelov v HWE (Masel, 2011). Kadar pa populacija ni v HWE, pa to nakazuje na dejstvo, da je nedavno prišlo do vnosa osebkov v populacijo, da se osebki ne parijo naključno ali da selekcija deluje proti križancem (Okasha, 2008). Med populacijami, ki niso bile v HWE, so bile zlasti populacije porečja Rižane (Faremski potok, FAR, Kortinska mlinščica, KOR, Sveta nedelja, SVN in izvir Rižane, RIZ), kjer se vnaša zarod marmorirane postrvi vzgojen v ribogojnici Kobarid, možna pa je tudi migracija potočnih postrvi iz Jadranskega morja, za katere Snoj in sodelavci (2002) ugotavljajo, da pripadajo AT filogenetski liniji in so prisotni predvsem v obalnih predelih tržaškega, piranskega in koprskega zaliva v spomladanskem času poplav. Ker prihaja

do križanja migrantov in lokalnih populacij, se alelna frekvenca spreminja v neskladju s pričakovano alelno frekvenco, kar se odraža v odstopanju populacij od HWE.

Pri ostalih populacijah, ki niso bile v HWE (Idrijca pri Belci, IDZ, Branica, BRA, Bača pri Modreju, BAC, korita Tolminke in Zadlaščice, KOT, Lepena, LEP), pa je najverjetneje glavni vzrok predvsem vnos ribogojniško vzrejenih marmoriranih postrvi. Ribogojniške matične jate predstavljajo genetsko čiste osebke različnih populacij soškega in idrijskega porečja (pri tem se običajno upošteva, da se osebkov obeh porečij ne združuje). Pri populacijah, kjer prihaja do križanja, pa se je zaradi prepovedi vnosa potočne postrvi z leti vzpostavilo genetsko ravnotežje. Tako vsakič, ko v populacijo vnesemo nove osebke (kar je ekvivalentno migraciji), porušimo alelna frekvenco, ki pa se že po eni generaciji naključnega parjenja zopet vzpostavi. Ker je pri preučevanih populacijah vnos pogost, se to lahko odraža v neravnovesju HWE.

Od HWE sta odstopali tudi populaciji Passer (IPAS) in Eisack (IEIS), ki sta del porečja Adige. Pri obeh populacijah ni vnašanja ribogojniško vzgojenih osebkov, so pa takšni osebki vneseni v populacije, ki z omenjenima komunicirajo (Meraner in sod., 2010). Tako lahko pride do migracije vnesenih osebkov, kar povzroči neravnovesje v alelni frekvenci.

Pri vseh 11 populacijah, ki niso bile v HWE, smo izračunali koeficient parjenja v sorodstvu (F_{IS}), pri čemer so bile signifikantne vrednosti za posamezne populacije v povprečju pozitivne, kar nakazuje na primanjkljaj heterozigotov. Ta prav tako nakazuje na vnos genetsko čistih marmoriranih postrvi (saj je vnos potočnih postrvi prepovedan) v hibridne populacije. Ker smo pri analizi izbirali le označevalce, ki so diagnostično ločevali genetsko čiste osebke od križancev, kar pomeni, da je genetsko čist osebek homozigot na vseh lokusih, bomo pri populacijah, kjer so takšni osebki vneseni v večjem številu, pričakovano zasledili primanjkljaj heterozigotov. To smo tudi potrdili z izračunom F_{IS} vrednosti za populacije, ki niso v HWE (priloga D).

5.2.7 LD med lokusi in populacijami

Pri ocenjevanju porazdelitve genotipov križancev in ocenjevanju, kdaj je do križanja prišlo, nam pomaga še ocena LD med posameznimi pari lokusov. V populaciji, kjer je prišlo do

križanja nedavno, bomo opazili LD, medtem ko pri populaciji, pri kateri je do križanja prišlo nekoč v preteklosti in je prisotno naključno parjenje, LD med pari lokusov ne bomo ugotovili (Allendorf, 2001; Jiggins in Mallet, 2000). Tako se bo LD pri populaciji, kjer je nedavno prišlo do izmenjave genetskega materiala, na začetku povečal, s časom pa v primeru odsotnosti selekcije, parjenja v sorodstvu in migracije, zmanjšal (Jiggins in Mallet, 2000). LD med lokusi se je pojavil pri populacijah Faremski potok (FAR), Hubelj pri sotočju z Vipavo (HUP), Kortinska mlinščica (KOR), Mlinščica pri rdeči hiši (MRH), Lepena (LEP), korita Tolminke in Zadlaščice (KOT), Bača pri Modreju (BAČ) in Branica (BRA), kar nakazuje na dejstvo, da se v omenjenih populacijah še ni vzpostavilo naključno parjenje, kar je lahko posledica vnosa marmoriranih postrvi. Kljub omenjenemu pa za populacije, kjer LD med lokusi nismo zaznali, ne moremo trditi, da ni prišlo do nedavnega križanja med različnimi vrstami oz. populacijami. Običajno namreč LD ne zaznamo, kadar gre za povratna križanja in križanja med F₂, F₃, itd. križanci, zato v populacijah, kjer LD ni bil izražen, nedavnega križanja med potočno in marmorirano postrvjo ne moremo izključiti.

5.3 SKLEPI

Na podlagi opravljenih filogenetskih in populacijsko-genetskih raziskav lahko povzamemo številne pomembne sklepe, ki bodo v prihodnje vplivala na razumevanje evolucije marmorirane postrvi in njeno zaščito ter ohranjanje. Pri tem je potrebno poudariti, da smo s filogenetskimi analizami dokazali samostojnost marmorirane postrvi kot vrste ter skupno izvorno zgodovino njenih severnih in južnih populacij. Ob tem smo tudi prvi na osnovi večih jedrnih regij DNA določili filogenetske odnose znotraj rodu *Salmo*.

Pri primerjavi različnih delov jedrnega genoma smo uspeli postaviti hitro in zanesljivo metodo za ločevanje marmoriranih in potočnih postrvi DA in AT filogenetske linije od njihovih križancev. Metoda bo služila ne le za populacijske študije in oceno stanja marmorirane postrvi in obeh linij potočne postrvi, ampak tudi za namene odbire genetsko čistih osebkov za vzrejo tako v Sloveniji kot tudi drugod, kjer sta omenjeni vrsti (marmorirana in potočna postrv) oz. liniji (AT in DA) prisotni.

Pri analizi cone križanja slovenskega dela jadranskega porečja smo ugotovili, da je v nekaterih populacijah tudi več kot 50% genetsko čistih marmoriranih postrvi in da se glede na

že objavljene genetske raziskave delež genoma marmoriranih postrvi povečuje. Za prihodnost marmorirane postrvi v Sloveniji se ob ohranjanju dosedanjih trendov tako ni bat. Potrebno pa se je zavedati, da je pomembno ohranjati tudi njeno fenotipsko in genetsko pestrost, pri čemer bi poudarek moral biti na različnosti osmih genetsko čistih populacij. Dokazali smo še povezanost izvora čistih populacij zg. Soče, Bače in Idrijce ter podali razlago o možnem nastanku značilnega idrijskega fenotipa.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Marmorirana postrv je endemna ribja vrsta jadranskega porečja, za katero je značilen marmoriran vzorec. Nekateri avtorji jo razvrščajo kot samostojno vrsto (Berrebi in sod., 2000; Kottelat in Freyhof, 1997; Laikre in sodelavci, 1999), spet drugi kot linijo potočne postrvi (Polž, 1989; Rebešek 1990). Sodi v rod *Salmo*, njeno mesto znotraj rodu kot tudi evolucijski odnosi z ostalimi predstavniki rodu pa niso povsem razrešeni. Večino genetskih analiz rodu je v preteklosti temeljilo na analizi kontrolne regije mtDNA, katere omejitve so znane (Renoult in sod., 2009). Evolucijske odnose znotraj rodu *Salmo* smo zato analizirali še z uporabo 22 jedrnih regij. Znotraj rodu smo določili pet vrst: atlantski losos, belvica in večvrstni kompleks postrvi, v katerega sodijo potočna, marmorirana in mehkoustna postrv. Pri podrobnejši analizi posameznih vrst smo ugotovili, da je znotraj rodu poleg atlantskega lososa najstarejša vrsta belvica, ki zaseda bazalno pozicijo za ostale vrste in je najverjetneje kot prva naselila jadransko porečje. V večvrstnem kompleksu postrvi morfološko najbolj izstopa mehkoustna postrv, ki zaseda bazalni (*BEAST) oz. sestrski (ML in MrBayes) klad z marmorirano in potočno postrvjo. Marmorirana postrv tvori v analiziranih filogenetskih drevesih jedrnih regij DNA samostojen monofiletski klad in ni razvrščena med potočne postrvi, zato jo lahko obravnavamo kot samostojno vrsto rodu *Salmo* (*Salmo marmoratus*). Klad sestavlja dve monofiletski skupini (severne in južne populacije marmoriranih postrvi), kar potrjuje skupen izvor teh populacij. Najpozneje naj bi se od večvrstnega kompleksa odcepile potočne postrvi. Kot najstarejšo linijo znotraj potočnih postrvi štejemo atlantsko/duero filogenetsko linijo, ki se je kasneje razcepila na duero in atlantsko filogenetsko linijo. Nato naj bi se od preostalih predstavnikov potočne postrvi odcepila donavska filogenetska linija, ki je najverjetneje nastala zaradi ločitve donavskega od ostalih porečij. Kot zadnji sta se znotraj potočnih postrvi ločili jadranska in mediteranska filogenetska linija, katerih ločevanje na osnovi rezultatov opravljenih analiz ni bilo popolno.

S filogenetsko analizo 22 jedrnih regij DNA smo ugotovili, da je najverjetnejši vzrok za razdrobljenost jadranske mitohondrijske filogenetske linije, ki se pojavlja pri populacijah potočnih postrvi v jadranskem porečju (Snoj in sod., 2009), pri južnih populacijah

marmoriranih postrvi (Razpet in sod., 2007b), ter pri mehkoustnih postrveh populacije Jadro (Sušnik in sod., 2007a) in Zeta (Sušnik in sod., 2007b), nepopolno ločevanje linij.

Marmorirana postrv se s potočno križa, njuni potomci pa so plodni. Zaradi vnašanja potočnih postrvi in križanja obeh vrst je začela marmorirana postrv iz potokov jadranskega porečja hitro izginjati (Jug in sod., 2005; Razpet in sod., 2007a). Za zaščito te vrste v Sloveniji že dve desetletji poteka program revitalizacije marmorirane postrvi z namenom izpodrinjanja neavtohtone potočne postrvi in križancev iz soškega porečja (Snoj in sod. 2000). Program temelji na vnašanju potomstva marmoriranih postrvi, ki izvirajo iz osmih genetsko čistih populacij, identificiranih v izoliranih območjih zgornjega porečja Idrijce in Soče, v soško porečje (Berrebi in sod., 2000; Fumagalli in sod., 2002). Za uspešnost repopulacijskega programa je ključnega pomena, da se ohrani genetska raznolikost. Ta omogoča vrsti, da se učinkovito prilagaja na spremembe v okolju in se tako ohranja iz generacije v generacijo. Populacije iz naštetih lokacij so majhne in odražajo zelo nizko genetsko pestrost (Berrebi in sod., 2000), potencialen vir genetsko čistih osebkov pa predstavlja cona križanja. Tako smo s pomočjo 36 SNP označevalcev zasnovali sistem za natančno in hitro ločevanje genetsko čistih marmoriranih postrvi od potočnih postrvi atlantske in donavske filogenetske linije. Uporabnost sistema nismo dokazali le pri analizi genetske strukture v coni križanja in določanju genetske čistosti posameznih osebkov marmoriranih postrvi soškega in idrijskega porečja, ampak tudi ostalih delov jadranskega porečja, pa tudi pri potočnih postrveh atlantske in donavske filogenetske linije.

S 36 SNP-ji smo analizirali preko 50 različnih hibridnih populacij severnega jadranskega porečja, pri analizi pa ugotovili, da se v hibridnih populacijah nahaja velik delež genetsko čistih marmoriranih postrvi. Te naseljujejo predvsem zgornje dele porečja Soče. Izpostaviti je potrebno zlasti populacije Soča pri Kobaridu, sotočje Soče in Tolminke, sotočje Predelice in Koritnice in populacijo Tolminka pri ribogojnici, kjer je delež genoma marmorirane postrvi presegal raven 90%. V porečju Reke, Rižane in Vipave pa prevladuje predvsem neavtohtonatalantska filogenetska linija potočne postrvi. Zaznali smo povečan delež donavske filogenetske linije potočne postrvi v zahodnem delu idrijskega porečja, kar bi lahko potrdilo hipotezo o prehodu potočnih postrvi iz donavskega v jadransko porečje v času pleistocena in razjasnilo razlike v fenotipu marmorirane postrvi idrijskega (rdeča pigmentacija po telesu) in

soškega porečja (brez rdeče pigmentacije). Ker se osem genetsko čistih populacij marmorirane postrvi tako fenotipsko kot genotipsko razlikuje, smo omenjene populacije podrobneje analizirali in ugotovili povezanost izvora Predelice in Zadlaščice, Hude grape in Lipovščka, ter Sevnice, Studence, Idrijce in Trebuščice. Povezanost posameznih populacij sovpada tudi z njihovo geografsko porazdelitvijo.

V študiji smo dokazali samostojnost marmorirane postrvi kot vrste ter skupno izvorno zgodovino njenih severnih in južnih populacij. Postavili smo hitro in zanesljivo metodo za ločevanje marmoriranih in potočnih postrvi donavske in atlantske filogenetske linije od njihovih križancev, ugotovili da soško porečje naseljuje dobršen delež genetsko čistih marmoriranih postrvi in dokazali povezanost čistih populacij v zgornjem toku reke Soče, Bače in Idrijce ter podali razlago o možnem nastanku značilnega idrijskega fenotipa.

6.2 SUMMARY

Marble trout is an endemic fish species of the Adriatic basin, characterized by its marbled-color pattern. Some authors recognize it as a separate species (Berrebi et al., 2000; Kottelat and Freyhof, 1997; Laikre et al., 1999), others as a lineage of brown trout (Povž, 1989; Rebeušek 1990). Marble trout is classified in the *Salmo* genus, where its position as well as evolutionary relations with other species of the genus is not completely resolved. In the past, most of the genetic analyses of *Salmo* genus were based on mtDNA control region, whose limits are known (Renoult et al., 2009). For this reason we analyzed evolutionary relations within the genus using 22 nuclear regions and determined five *Salmo* species: Atlantic salmon, Ohrid trout and *Salmo trutta* species complex containing brown trout, marble trout and softmouth trout. Excluding Atlantic salmon that was not specifically analyzed in this study, the oldest species within the genus is Ohrid trout that was probably the first species that inhabited the Adriatic basin. Out of the three species within *Salmo trutta* species complex, softmouth trout is the most morphologically unique and is in comparison with brown and marble trout placed at basal (*BEAST) or sister (ML and MrBayes) position. According to the phylogenetic analyzes of nuclear DNA regions marble trout is classified as an independent monophyletic clade. For this reason we can consider it as a separate species within the *Salmo* genus. The marble trout clade is divided into two groups (presenting northern and southern populations) with common origin. The last species to separate from the *Salmo trutta* species

complex was the brown trout. Within the species, atlantic/duero lineage was the first to split from *Salmo trutta* common ancestor and was later divided to Duero and Atlantic phylogenetic line. Danubian lineage was the next that split from brown trout common ancestor, probably as a consequence of Danubian basin formation. The separation of Adriatic and Mediterranean lineage was not well supported.

With the analyses of nuclear SNPs we were able to prove that incomplete lineage sorting is the main reason for the fragmentation of the Adriatic mitochondrial phylogenetic lineage, that is present in the Adriatic brown trout (Snoj et al., 2009), southern populations of marble trout (Razpet et al., 2007) and in the populations of softmouth trout from river Jadro (Sušnik et al., 2007a) and Zeta (Sušnik et al., 2007b).

Marble and brown trout successfully hybridize and produce fertile offspring. Brown trout has been for decades introduced to the marble trout native range, resulting in hybridization between marble and brown trout, which led to the near-extinction of marble trout from the rivers of the Adriatic basin (Jug et al., 2005; Razpet et. al., 2007a). To protect genetic integrity of endangered marble trout in Slovenia an action plan was undertaken with the goal of decreasing the amount of hybrids and nonnative brown trout in Soča tributaries (Snoj et al., 2000). The restoration program was based on supplementary breeding of pure marble trout originating from eight small isolated tributaries of upper Soča and Idrijca that were found to be populated with genetically pure marble trout. Genetic diversity among the progeny to be used for stocking is essential for the success of rehabilitation program. Genetic diversity helps the species to adapt to the changing environment and survive. Genetic analysis of eight pure marble trout populations revealed extremely low intra-population genetic diversity (Berrebi et al., 2000; Fumagalli et. al., 2002). To establish greater genetic diversity of genitor stocks, hybridization zones have been considered as a possible source of pure marble trout. To select purebreds from hybrids, a genotyping system using 36 SNP markers was described, that enables discrimination between marble trout and brown trout of Atlantic and Danubian phylogenetic origin. We proved the applicability of the genotyping system not only for genetic structure analyses and separation of hybrids from pure marble trout in Soča and Idrijca river systems, but also for genetic analyses of marble trout throughout its distribution

range. We also proved applicability of the system in the protection of brown trout of Atlantic and daubing phylogenetic lineage.

Using 36 SNP markers we tested 50 different hybrid populations of northern Adriatic basin and discovered substantial amount of genetically pure marble trout individuals that are mostly present in upper Soča populations. More than 90% of pure marble trout genome was present in populations Soča at Kobarid, confluence of Soča and Tolminka, confluence of Predelica and Koritnica and in population Tolminka at fish farm. On the other hand Atlantic lineage of brown trout is dominating the tributaries of Reka, Rižana and Vipava. An increased amount of Danubian brown trout genome was discovered in the western part of Idrijca tributary which could confirm the hypotheses of brown trout crossing from Sava tributary to the Adriatic basin during Pleistocene glaciation and explain the differences in phenotype between populations of marble trout from Idrijca (red dots on the body) and Soča (no red dots on the body) river system. Eight populations of genetically pure marble trout already have proved to be phenotypically as well as genetically different. We compared them also using SNP marker system and discovered relationship between populations Predelica and Zadlaščica, Huda grapa and Lipovšček, Sevnica, Studenca, Idrijca and Trebuščica. The described relations are also geographically supported.

In our study we were able to prove that the marble trout is a separate species and not a lineage of brown trout and that northern and southern population have a common origin. We discovered 36 SNP markers that can separate genetically pure marble trout individuals from hybrids and brown trout of the Atlantic and Danubian origin. Analyses of different hybrid populations of the northern Adriatic basin showed that a substantial amount of pure marble trout individuals still exist in the Soča river system. We proved genetic relationship between populations of Soča, Bača and Idrijca tributaries and gave a possible explanation for the difference in Soča and Idrijca marble trout phenotype.

7 VIRI

- Ackerman M.W., Habicht C., Seeb L.W. 2011. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) under diversifying selection provide increased accuracy and precision in mixed-stock analyses of sockeye salmon from the Copper River, Alaska. *Transactions of the American Fisheries Society*, 140, 3: 865-881
- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic control*, 19, 6: 716-723
- Alarcón J.A., Alvarez M.C. 1999. Genetic identification of sparid species by isozyme markers: application to interspecific hybrids. *Aquaculture*, 173, 1-4: 95-103
- Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 613-622
- Anderson E.C., Williamson E.G., Thompson E.A. 2000. Monte Carlo evaluation of the likelihood for Ne from temporally-spaced samples. *Genetics*, 156: 2109-2118
- Anderson E.C., Thompson E.A. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, 160: 1217-1229
- Antunes A., Templeton A.R., Guyomard R., Alexandrino P. 2002. The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: Genealogy of the transferrin gene in the brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 8: 1272-1287
- Apostolidis A.P., Triantaphyllidis C., Kouvatsi A., Economidis P.S. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology*, 6, 6: 531-542
- Avise J.C., Saunders N.C. 1984. Hybridization and Introgression among Species of Sunfish (Lepomis): Analysis by Mitochondrial DNA and Allozyme Markers. *Genetics*, 108, 1: 237-255
- Avise J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 7, 6: 766-767
- Bănărescu P. 1991. Zoogeography of fresh waters. Distribution and dispersal of freshwater animals in North America and Eurasia, vol. 2. Wiesbaden, AULA-Verlag GmbH: 572 str.
- Bardakci F., Skibinski D.O. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73, 2: 117-123
- Baxter J. S., Taylor E. B., Devlin R. H., Hagen J., McPhail J. D. 1997. evidence for natural hybridization between Dolly Varden (*Salvelinus Malma*) and Bull trout (*Salvelinus Confluentus*) in a Northcentral British Columbia watershed. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 2: 421-429
- Behnke R. J. 1968. A new subgenus and species of trout *Salmo* (*Platysalmo*) *platycephalus*, from south-central Turkey with comments on the classification of the subfamily Salmoninae. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Museum und Institut*, 66: 1–15

- Behnke R.J. 1992. Native trout of western North America. American Fisheries Society Monograph, 6: 1-275
- Belkhir K., Borsa P., Chikki L., Raufaste N., Bonhomme F. 1996-2004. Genetix Version 4.05.2, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations, Page Web de Genetix. <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/constr> (2. dec. 2011)
- Bernatchez L., Guyomard R., Bonhomme F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. Molecular Ecology, 1, 3: 161-173
- Bernatchez L., Glemet H., Wilson C., Danzmann R. 1995. Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture Science, 52: 179-185
- Bernatchez L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta L.*) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. Evolution, 55, 2: 351-379
- Berrebi P., Povž M., Jesenšek D., Cattaneo-Berrebi G., Crivelli A.J. 2000. The genetic diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soča river, Slovenia. Heredity, 85: 277-287
- Bianco P. G. 1990. Potential role of the palaeohistory of the Mediterranean and Para Tethys basin on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. Ichthyologic Exploration of Freshwaters, 1: 167–184
- Boecklen W.J., Howard D.J., 1997. Genetic analysis of hybrid zones: Numbers of markers and power of resolution. Ecology, 78: 2611-2616
- Bogataj K. 2010. Analiza genetske čistosti populacij avtohtone potočne postrvi (*Salmo trutta*) v Sloveniji. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 61 str.
- Brumfield R. T., Beerli P., Nickerson D. A., Edwards S. V. 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. Trends in Ecology and Evolution, 18, 5: 249-256
- Budihna N. 2001. Raki (Decapoda). V: Raziskava razširjenosti evropsko pomembnih vrst v Sloveniji. Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije: 207-218
- Cabin R.J., Mitchell R.J. 2000. To Bonferroni or Not to Bonferroni: When and How Are the Questions. Ecological Society of America, 81, 3: 246-248
- Campton D.E., Utter F. M. 1985. Natural Hybridization between Steelhead Trout (*Salmo gairdneri*) and Coastal Cutthroat Trout (*Salmo clarki clarki*) in Two Puget Sound Streams. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42, 1: 110-119
- Carsten B.C., Knowles L.L. 2007. Estimating Species Phylogeny from Gene-Tree Probabilities Despite Incomplete Lineage Sorting: An Example from *Melanoplus* Grasshoppers. Systematic Biology, 56, 3: 400-411

- Castro J.A., Picornell A., Ramon M. 1998. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. International Microbiology, 1: 327-332
- Chen H., Leibenguth F. 1995. Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers, and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*). Biochemical Genetics, 33, 9-10: 297-306
- Cooper A.M., Miller L.M., Kapuscinski A.R. 2010. Conservation of population structure and genetic diversity under captive breeding of remnant coaster brook trout (*Salvelinus fontinalis*) populations. Conservation Genetics, 11: 1087-1093
- Cortey M., Pla C., Garcia-Marin J.L. 2004 Historical biogeography of Mediterranean trout. Molecular Phylogenetics and Evolution, 33, 3: 831-844
- Crespi B.J., Fulton M.J. 2004. Molecular systematics of Salmonidae: combined nuclear data yields a robust phylogeny. Molecular Phylogenetics and Evolution, 31, 2: 658-679
- Crivelli A., Poizat G., Berrebi P., Jesenšek D., Rubin J.F. 2000. Conservation biology applied to fish: The example of a project for rehabilitating the marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. Cybium, 24, 3: 211-230
- Crooijmans R. P. M. A., Van Der Poel J.J., Groenen M. A. M., Bierbooms V. A. F., Komen J. 1997. Microsatellite markers in Common Carp (*Cyprinus Carpio L.*). Animal Genetics, 28, 2: 129-134
- Crow J. 1999. Hardy, Weinberg and language impediments. Genetics, 152, 3: 821-825
- Degerman E., Leonardsson K., Lundqvist H. 2012. Coastal migrations, temporary use of neighbouring rivers, and growth of sea trout (*Salmo trutta*) from nine northern Baltic Sea rivers. ICES Journal of Marine Science, 69, 6: 971-980
- Delling B., Crivelli A., Rubin J.F., Berrebi P. 2000. Morphological variation in hybrids between *Salmo marmoratus* and alien *Salmo* species in the Volarja stream, Soča river basin, Slovenia. Journal of Fish Biology, 57: 1199-1212
- Delling B. 2002. Morphological distinction of the marble trout, *Salmo marmoratus*, in comparison to marbled *Salmo trutta* from River Otra, Norway. Cybium, 26, 4: 283-300
- Delling B. 2003. Species Diversity and Phylogeny of *Salmo* with Emphasis on Southern Trouts (Teleostei, Salmonidae). Stockholm University, Department of Zoology: 7-25
- DeWoody J.A., Avise J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared to other animals. Journal of Fish Biology, 56: 461-473
- Doka G. 2006. 3D scatter plot for MS Excel (VBA macro). Doka LCA.
<http://www.doka.ch/Excel3Dscatterplot.htm> (14.feb. 2012)
- Dorofeeva E.A. 1974. Systematic relations of salmons of genus *Salmo*. Ichthyologia, 6: 27-36
- Dorofeeva E.A., Sidrovski M., Petrovski N. 1983. Osteological peculiarities of ohrid trouts (*Salmo letnica*) with reference to their taxonomy. Zoologichesky Zhurnal, 62, 11: 1691-1700

- Dorofeeva E.D. 1998. Systematics and distribution history of European Salmonid fishes of the genus *Salmo*. *Journal of Ichthyology*, 38: 419-429
- Dowling T.E., Childs M.R. 1992. Impact of hybridization on a threatened trout of the southwestern United States. *Conservation Biology*, 6: 355-364
- Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214
- Echelle A.A. 1991. Conservation genetics and genetic diversity in freshwater fishes of western North America. V: Battle against Extinction: Native Fish Management in the American West. Minckley W.L., Deacon J.E. (eds.). Arizona, University of Arizona Press: 141-153
- Edwards S.V. 2009. Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution*, 63: 1-19
- Edwards C.J., Suchard M.A., Lemey P., Welch J.J., Barnes I., Fulton T.L., Barnett R., O'Connell T.C., Coxon P., Monaghan N., Valdiosera C.E., Lorenzen E.D., Willerslev E., Baryshnikov G.F., Rambaut A., Thomas M.G., Bradley D.G., Shapiro B. 2011. Ancient Hybridization and an Irish Origin for the Modern Polar Bear Matriline. *Current Biology*, 21, 15: 1251-1258
- Emerson B.C., Paradis E., Thébaud C. 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 707-716
- Emigh, T.H. 1980. A comparison of tests for Hardy-Weinberg equilibrium. *Biometrics*, 36, 4: 627-642
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 8: 2611-2620
- Faillie A., Ribera I., Deharveng L., Bourdeau C., Garnery L., Quéinnec E., Deuve T. 2009. A molecular phylogeny shows the single origin of the Pyrenean subterranean Trechini ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 1: 97-106
- Faillie A., Casale A., Ribera I. 2010. Phylogenetic relationships of western Mediterranean subterranean Trechini Groundbeetles (Coleoptera: Carabidae). *Zoologica Scripta*, 40, 3: 282-295
- Falconer D., Mackay T. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. 4th edition. Harlow, Essex, UK, Addison Wesley Longman: 94-134
- Fitch W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20: 406-416
- Fitch W.M. 1981. A non-sequential method for constructing tree and hierarchical classifications. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 30-37
- Felsenstein J. 1978. The number of evolutionary trees. *Systematic Zoology*, 27: 27-33

- Fumagalli L., Snoj A., Jesenšek D., Balloux F., Jug T., Duron O., Brossier F., Crivelli F., Berrebi P. 2002. Extreme genetic differentiation among the remnant populations of marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Molecular Ecology*, 11, 12: 2711-2716
- Garvin M.R., Saitoh K., Gharrett A.J. 2010. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Molecular Ecology*, 10, 16: 915-934
- Gaur P.M., Slinkard A.E. 1990. Genetic control and linkage relations of additional isozyme markers in chick-pea. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 648-656
- Georgiev S.B. 2003. The Balkan Peninsula Salmonids On the origin of the Balkan Peninsula Salmonids. *Ribarstvo*, 61, 4: 147-174
- Giuffra E., Bernatchez L., Guyomard R. 1994. Mitochondrial control region and protein-coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology*, 3, 2: 161-171
- Good J.M., Hird H., Reid N., Demboski J.R., Steppan S.J., Martin Nims J.R., Sullivan J. 2008. Ancient hybridization and mitochondrial capture between two species of Chipmunks. *Molecular Ecology*, 17, 5: 1313-1327
- Gridelli, E. 1936. I pesci d'aqua dolce della Venezia Giulia. *Bollettino della Società Adriatica di Scienze Naturali in Trieste*, 35: 7-140
- Griffith J. 1994. Native rocky mountain trout and stocked trout: can we have both? Wild Trout and planted Trout: Balancing the Scale. Laramie, Wyoming Game and Fish Department: 22-39
- Gyllesten U., Wilson A.C. 1988. Mitochondrial DNA of salmonids. Population genetics and fishery management. Seattle, Washington press: 301-317
- Habicht C., Seeb L. W., Myers K. W., Farley E. V., Seeb J. E. 2010. Summer-fall distribution of stocks of immature sockeye salmon in the Bering Sea as revealed by single-nucleotide polymorphisms (SNPs). *Transactions of the American Fisheries Society*, 139: 1171-1191
- Hansen M.M., Ruzzante D.E., Nielsen E.E., Mensberg K.L.D. 2001. Brown Trout (*Salmo trutta*) Stocking Impact Assessment Using Microsatellite DNA Markers. *Ecological Applications*, 11, 1: 148-160
- Hardy G. H. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, 28: 49-50
- Harig A. L., Fausch K. D. 2002. Minimum habitat requirements for establishing trans located cutthroat trout populations. *Ecological Applications*, 12: 535-551
- Harrison R.G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 1: 6-11
- Hartl G. B., Willing R., Nadlinger K. 1994. Allozymes in mammalian population genetics and systematics: Indicative function of a marker system reconsidered. *EXS*, 69:299-310

- Hastings W.K. 1970. Monte Carlo Sampling Methods using Markov Chains and their Applications. *Biometrika*, 57, 1: 97-109
- Hayes J.P., Guffrey S.Z., Kriegler F.J., McCracken G.F., Parker C.R. 1996. The genetic diversity of native, stocked and hybrid populations of Brook trout in the southern Appalachians. *Conservation Biology*, 10: 1403-1412
- Heaton M.P., Harhay G.P., Bennett G.L., Stone R.T., Grosse W.M., Casas E., Keele J.W., Smith T.P., Chitko-McKown C.G., Laegreid W.W. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome*, 13: 272-281
- Heckman K.L., Mariani C.L., Rasoloarison R., Yoder A.D. 2007. Multiple nuclear loci reveal patterns of incomplete lineage sorting and complex species history within western mouse lemurs (*Microcebus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, 2: 353-367
- Hedin M., Thomas S.M. 2010. Molecular systematics of eastern North American Phalangodidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores), demonstrating convergent morphological evolution in caves. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4, 1: 107-121
- Heled J., Drummond A.J. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 3: 570-580
- Hendrick P.W. 1999 Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53: 313-318
- Horreo J.L., Garcia-Vazquez E. 2011. Foreign brown trout in protected landscapes as a consequence of connectivity. *Fisheries Management and Ecology*, 18: 431-436
- Hyten D.L., Song Q., Zhu Y., Choi I.Y., Nelson R.L., Costa J.M., Specht J.E., Shoemaker R.C., Cregan P.B. 2006. Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 6666-16671
- Ingvarsson P.K., 2001. Restoration of genetic variation lost - The genetic rescue hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 62-63
- Jesenšek D. 1994. Artificial propagation of Marble trout (*Salmo marmoratus* Cuvier 1817) in the Fisheries Society of Tolmin. V: Symposium on the Conservation of endangered Freshwater Fish in Europe. Abstract book, Bern, Switzerland, University of Bern: 24
- Jesenšek D. 2010. "Genetsko čiste populacije marmorirane postrvi". Tolmin, Ribiška družina Tolmin (osebni vir, maj 2010)
- Jiggins C.D., Mallet J. 2000. Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 6: 250-255
- Jug T. 2002. Genetska raznolikost soške postrvi (*Salmo marmoratus*) v Sloveniji. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 93 str.

- Jug T., Dovč P., Pohar J., Snoj A. 2004. RAPD analysis as a tool for discriminating marble trout from hybrids (marble trout × brown trout) in the zones of hybridization. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 121, 3: 156-162
- Jug T., Berrebi P., Snoj A. 2005. Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout populations as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation*, 123, 3: 381-388
- Keller I., Veltsos P., Nichols R.A. 2008. The frequency of rDNA variants within individuals provides evidence of population history and gene flow across a grasshopper hybrid zone. *Evolution*, 62: 833-844
- Kliman R.M., Andolfatto P., Coyne J.A., Depaulis F., Kreitman M., Berry A.J., McCarter J., Wakeley J., Hey J. 2000. The population genetics of the origin and divergence of the *Drosophila simulans* complex species. *Genetics*, 156: 1913-1931
- Kohout J., Jaškova I., Papoušek I., Šediva A., Šlechta V. 2012. Effects of stocking on the genetic structure of brown trout, *Salmo trutta*, in Central Europe inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers. *Fisheries Management and Ecology*, 19, 3: 252-263
- Koskinen M.T., Piironen J., Primmer C.R. 2001. Interpopulation genetic divergence in European grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) at a micro geographic scale: implications for conservation. *Conservation Genetics*, 2: 133-143
- Kottelat M., Freyhof J. 2007. *Handbook of European Freshwater Fishes*. Cornol, Switzerland and Berlin, Germany, Kottelat and Freyhof: 401-430
- Laikre L., Antunes A., Apostolidis A., Berrebi P., Duguid A., Ferguson A., Garcia-Marin J.L., Guyomard R. 1999. Conservation genetic management of brown trout (*Salmo trutta*) in Europe. V: Report by the Concerted Action on identification, management and exploitation of genetic resources in the brown trout (*Salmo trutta*). Troutconcert EU FAIR CT97-3882: 91 str.
- Lande R. 1988. Genetic and demography in biological conservation. *Science*, 241: 1455-1460
- Langella O. 1999. Populations, 1.2.30. Bioinformatics Organization.
<http://www.bioinformatics.org/populations/> (16. jan. 2010)
- Larget B., Simon D.L. 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. Duquesne University, Department of Mathematics and Computer Science: 750-759
- Leary R.F., Allendorf F.W., Sage G.K. 1993. Conservation of genetics of Bull trout in the Columbia and Klamath River drainages. *Conservation Biology*, 7: 856-865
- Li C.H., Orti G., Zhang G., Lu G.Q. 2007. A practical approach to phylogenomics: the phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. *Bmc Evolutionary Biology*, 7: 44
- Li W.H., Graur D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland , Massachusetts, Sinauer associates, inc. Publishers: 99-135

- MacCrimmon H.R., Marshall T.L., Gots B.L. 1970. World distribution of brown trout, *Salmo trutta*: further observations. Journal Fisheries Research Board Canada, 27, 4: 811-818
- Machado C.A., Kliman R.M., Markert J.A., Hey J. 2002. Inferring the history of speciation from multilocus DNA sequence data: the case of *Drosophila pseudoobscura* and close relatives. Molecular Biology and Evolution, 19: 472-488
- Masel J. 2011. Genetic drift. Current Biology, 21, 20: 837-838
- Marič S., Sušnik S., Simonović P., Snoj A. 2006. Phylogeographic study of brown trout from Serbia, based on mitochondrial DNA control region analysis. Genetics Selection Evolution, 38: 411-430
- Marič S., Simonović P., Razpet A. 2010. Genetic characterization of broodstock brown trout from Bled fish-farm, Slovenia. Periodicum Biologorum, 112: 145-148
- McGowan C., Davidson W. S. 1992. Unidirectional natural hybridization between Brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*S. salar*) in Newfoundland. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 49, 9: 1953-1958
- Meraner A., Baric S., Pelster B., Della Via J. 2007. Trout (*Salmo trutta*) mitochondrial DNA polymorphism in the center of the marble trout distribution area. Hydrobiologia, 579: 337-349
- Meraner A., Baric S., Pelster B., Della Via J. 2010. Microsatellite DNA data point to extensive but incomplete admixture in a marble and brown trout hybridization zone. Conservation Genetics, 11: 985-998
- Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.H., Teller E. 1953. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. Journal of Chemical Physics, 21, 6: 1087-1092
- Miller R.R. 1972. Classification of native trout of Arizona with the description of new species, *Salmo apache*. Copeia, 3: 401-422
- Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16, 3: 1215-1215
- Minckley W.L. 1995. Translocation as a tool for conserving imperiled fishes: Experiences in western United-States. Biological Conservation, 72: 297-309
- Morin P.A., Luikart G., Wayne R.K., SNP workshop group 2004. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. Trends in Ecology and Evolution, 19, 4: 208-216
- Namroud M.C., Beaulieu J., Juge N., Laroche J., Bousquet J. 2008. Scanning the genome for gene single nucleotide polymorphisms involved in adaptive population differentiation in white spruce. Molecular Ecology, 17: 3599-3613
- Nielsen R. 2000. Estimation of population parameters and recombination rates using single nucleotide polymorphisms. Genetics, 154: 931-942

- Nei M., Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 3, 5: 418-426
- Nylander J.A.A., Ronquist F., Huelsenbeck J.P., Nieves-Aldrey J.L. 2004. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, 53, 1: 47-67
- Nylander J.A.A., Wilgenbusch J.C., Warren D.L., Swofford D.L. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics*, 24, 4: 581-583
- Ocvirk J. 1992. Soška postrv (*Salmo marmoratus* Cuvier 1817): Značilnosti razvoja fenotipa ter njena umetna vzreja. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 168 str.
- Ocvirk J., Pleško S. 1998. Kontrolirano križanje soške postrvi (*Salmo marmoratus* Cuvier 1817) z nekaterimi salmonidi. *Ichthyos*, 15: 2-11
- Okasha S. 2008. Population Genetics. V: The Standford Encyclopedia Philosophy. Zalta E. N. (ed.) Stanford University, <http://plato.stanford.edu/archives/fall2008/entries/population-genetics> (16 sep. 2012)
- Partis, L., Wells R.J. 1996. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Molecular and Cellular Probes*, 10, 6: 435-441
- Peters J. L., Zhuravlev Y., Fefelov I., Logie A., Omland K. E. 2007. Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between Gadwall and Falcated duck (*Anas spp.*). *Evolution*, 61, 8: 1992–2006
- Phillips, R.B., Matsuoka M.P., Konon I., Reed, K.M. 2000. Phylogenetic analysis of mitochondrial and nuclear sequences supports inclusion of *Acantholingga ohridana* in the genus *Salmo*. *Copeia* 2, 546-550
- Polž M., 1989. Distribution and biometric characteristics of the Marble trout (*Salmo marmoratus* Cuvier 1817) in Slovenia. *Ichthyos*, 8: 29-36
- Polž M., Jesenšek D., Berrebi P., Crivelli A.J. 1996. Soška postrv *Salmo trutta marmoratus*, Cuvier 1817, v porečju Soče v Sloveniji. Arles, Tour du Valat: 11-15
- Poteaux C., Beaudou D., Berrebi P. 1998. Temporal variation of genetic introgression in stocked brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Journal of Fish Biology*, 53: 701-713
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 7: 1253-1256
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 2: 945-959
- Pustovrh G., Snoj A., Sušnik Bajec S. 2011. A set of SNPs enabling identification of trouts and their hybrids in *Salmo* genus. *Conservation Genetics Resources*, 3, 1: 147-150

- Pustovrh G., Sušnik Bajec S., Snoj A. 2012. A set of SNPs for *Salmo trutta* and its application in supplementary breeding programs. *Aquaculture*, 370-371: 102-108
- Rambaut A., Drummond A.J. 2007. Tracer v1.4. BEAST. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (21. dec. 2010)
- Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249
- Razpet A. 2004. Genetska raznolikost salmonidov v porečju Neretve. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 69 str.
- Razpet A., Marić S., Parapot T., Nikolić V., Simonović P. 2007a. Re-evaluation of *Salmo* data by Gridelli (1936) - description of stocking, hybridization and repopulation in the Soča basin. *Italian Journal of Zoology*, 74, 1: 63-70
- Razpet A., Sušnik S., Jug T., Snoj A. 2007b. Genetic variation among trout in the River Neretva basin, Bosnia and Herzegovina. *Journal of Fish Biology*, 70: 94-110
- Rebeušek F. 1990. Morfološke primerjave soške postrvi (*Salmo marmoratus* Cuvier 1817) in potočnice (*Salmo trutta*. *M. fario* L 1758). Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 55 str.
- Renoult J. P., Geniez P., Bacquet P., Benoit L., Crochet P. A. 2009. Morphology and nuclear markers reveal extensive mitochondrial introgressions in the Iberian Wall Lizard species complex. *Molecular Ecology*, 18, 20: 4298-4315
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 12: 1572-1574
- Rice W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evoluion*, 43, 1: 233-225
- Ryman N., Stahl G. 1980. Genetic Changes in Hatchery Stocks of Brown Trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 1: 82-87
- Ryynanen H.J., Primmer C.R. 2006. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in duplicated genomes: intron-primed exon-crossing (IPEC) as a strategy for avoiding amplification of duplicated loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and other salmonid fishes. *BMC Genomics*, 7: 11
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425
- Sanford C. P. J. 2000. Salmonoid fish osteology and phylogeny (Teleostei: Salmonoidei). A.R.G. Gantner (ur.). Liechtenstein, Verlag KG Ruggell: 264 str.
- Schmid S.M., Fügenschuh B., Kissling E., Schuster R. 2004. Tectonic map and overall architecture of the Alpine origin. *Eclogae Geologicae Helvetiae*, 97: 93-117
- Schöffmann J., Sušnik S., Snoj A., 2007. Phylogenetic origin of *Salmo trutta* L 1758 from Sicily, based on mitochondrial and nuclear DNA analyses. *Hydrobiologia*, 575: 51-55

- Schönhof A.L., Martens J. 2010. Hidden Mediterranean diversity: assessing species taxa by molecular phylogeny within the opilionid family Trogulidae (Arachnida, Opiliones). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 1: 59-75
- Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6, 2: 416-464
- Seeb J. E., Seeb L. W., Utter F. M. 1986. Use of genetic markers to assess stock dynamics and management programs for chum salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115, 3: 448-454
- Sekino M., Hara M. 2001. Application of microsatellite markers in population genetics studies of Japanese flounder *Paralichthys alivaceus*. *Marine Biotechnology*, 3: 572-589
- Shedko S.V. 1980. Phylogenetic relationship of mitochondrial DNA in salmonids of the subfamily Salmoninae: analysis of the cytochrome b gene sequences. *Genetika*, 38, 3: 357-67
- Siebold C. 1863. Die Süßwasserfische von Mitteleuropa. Leipzig, Verlag von Wilhelm Engelmann: 430 str.
- Skaala O., Solberg G., 1997. Biochemical genetic variability and taxonomy of a marmorated salmonid in River Otra, Norway. *Nordic Journal of Freshwater Research*, 73: 3-12
- Sket B., Paragamian K., Trontelj P. 2004. A census of the obligate subterranean fauna of the Balkan Peninsula. V: Balkan Biodiversity, Pattern and Process in the European Hotspot. Griffiths H.I., Kryštufek B., Reed J.M. (eds.). Dordrecht, Kluwer: 309-322
- Smith C. T., Templin W. D., Seeb J. E., Seeb L. W. 2005. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) provide rapid and accurate estimates of the proportions of U.S. and Canadian Chinook salmon caught in Yukon River fisheries. *North American Journal of Fisheries Management*, 25, 3: 944-953
- Smith C. T., Seeb L. W. 2008. Number of alleles as a predictor of the relative assignment accuracy of short tandem repeat (STR) and single-nucleotide-polymorphism (SNP) baselines for chum salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 137: 751-762
- Snoj A. 1997. Molekularno biološka karakterizacija soške postrvi (*Salmo marmoratus* Cuvier 1817). Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 111 str.
- Snoj A., Pohar J., Dovč P. 1997. Rapid communication: The first microsatellite DNA marker for marble trout, BFRO 001. *Journal of Animal Science*, 75: 1983
- Snoj A., Jug T., Melkič E., Sušnik S., Pohar J., Dovč P., Jesenšek D., Budihna N. 2000. Mitochondrial and microsatellite DNA analysis of marble trout in Slovenia. *Journal of Freshwater Biology*, 29: 5-11
- Snoj A., Marčeta B., Sušnik S., Melkič E., Meglič V., Dovč P. 2002a. The taxonomic status of the 'sea trout' from the north Adriatic Sea, as revealed by mitochondrial and nuclear DNA analysis. *Journal of Biogeography*, 29, 9: 1179-1186

- Snoj A., Melkič E., Sušnik S., Muhamedagić S., Dovč P. 2002b. DNA phylogeny supports revised classification of *Salmo thymus obtusirostris*. Biological Journal of the Linnean Society, 77, 3: 399-411
- Snoj A. 2004. Filogeografska struktura postrvi (*Salmo trutta L.*) v Sloveniji. Ribič, 10: 239-243
- Snoj A., Razpet A., Tomljanovič T., Treer T., Sušnik S. 2007. Genetic composition of the Jadro softmouth trout following translocation into a new habitat. Conservation Genetics, 8, 5: 1213-1217
- Snoj A., Bogur I., Sušnik S. 2008. Evidence of genetically distinct population of Vrlika softmouth trout *Salmo obtusirostris Heckel* evolved by vicariance. Journal of Fish Biology, 72, 8: 1945-1959
- Snoj A., Marić S., Berrebi P., Crvelli A., Shumka S., Sušnik S. 2009. Genetic architecture of trout from Albania as revealed by mtDNA control region variation. Genetics Selection Evolution, 41: 22
- Snoj A., Glamuzina B., Razpet A., Zablocki J., Bogut I., Lerceteau-Köhler E., Pojskić N., Sušnik S. 2010. Resolving taxonomic uncertainties using molecular systematics: *Salmo dentex* and the Balkan trout community. Hydrobiologia, 651, 1: 199-212
- Snoj A., Marić S., Sušnik Bajec S., Berrebi P., Janjani S., Schöefmann J. 2011. Phylogeographic structure and demographic patterns of brown trout in North-West Africa. Molecular Phylogenetics and Evolution, 61: 203-211
- Soria-Carrasco V., Talavera G., Igea J., Castresana J. 2007. The K tree score: quantification of differences in the relative branch length and topology of phylogenetic trees. Bioinformatics, 23, 21: 2954-2956
- Splendiani A., Giovannotti M., Cerioni P.N., Caniglia M.L., Caputo V. 2006. Phylogeographic inferences on the native brown trout mtDNA variation in central Italy. Italian Journal of Zoology, 73, 2: 179-189
- Suarez J., Bautista J.M., Almodovar A., Machordom A. 2001. Evolution of the mitochondrial control region in Palearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. Heredity, 87: 198-206
- Sullivan J. P., Lavoué S., Arnegard M. E., Hopkins C. D. 2004. AFLPs resolve phylogeny and reveal mitochondrial introgression within a species flock of African Electric Fish (Mormyroidea : Teleostei). Evolution, 58, 4: 825-841
- Sušnik S. 2001. Polimorfizem kromosomske in mitohondrijske DNA lipana (*Thymallus thymallus*) in filogenetski odnosi med njegovimi geografsko ločenimi populacijami. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 156 str.
- Sušnik S., Schöefmann J., Weiss S. 2005. Genetic verification of native brown trout from the Persian Gulf (Catak Cay River, Tigris basin). Journal of Fish Biology, 67, 3: 879-884

- Sušnik S., Knizhin I., Snoj A., Weiss S. 2006. Genetic and morphological characterization of a Lake Ohrid endemic, *Salmo (Acantholingga) ohridanus* with comparison to sympatric *Salmo trutta*. *Journal of Fish Biology*, 68: 2-23
- Sušnik S., Snoj A., Wilson I., Mrdak D., Weiss S. 2007a. Historical demography of brown trout (*Salmo trutta*) in the Adriatic drainage including the putative *S. letnica* endemic to lake Ohrid. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 1: 63-76
- Sušnik S., Weiss S., Odak T., Delling B., Treer T., Snoj A. 2007b. Reticulate evolution: ancient introgression of the Adriatic brown trout mtDNA in softmouth trout *Salmo obtusirostris* (Teleostei: Salmonidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 90, 1: 139-152
- Sušnik S., Sivka U., Snoj A. 2008. A set of nuclear DNA markers diagnostic for marble trout, *Salmo marmoratus*. *Aquaculture*, 285: 260-263
- Svetovidov A. N. 1975. Comparative osteological study of the Balkan endemic genus *Salmothymus* in relation to its classification. *Zoological Journal*, 54: 1174-1190
- Swofford D.L., 1993. PAUP - a computer-program for phylogenetic inference using maximum parsimony. *Journal of General Physiology*, 102, 6: A9-A9
- Takahashi K., Terai Y., Nishida M., Okada N. 2001. Phylogenetic Relationships and Ancient Incomplete Lineage Sorting Among Cichlid Fishes in Lake Tanganyika as Revealed by Analysis of the Insertion of Retroposons. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 11: 2057-2066
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 8: 1596-1599
- Taylor E.B., Redenbach Z., Costello A.B., Pollard S.M., Pacas C.J. 2001. Nested analysis of genetic diversity in northwestern North American char, Dolly Varden (*Salvelinus malma*) and bull trout (*Salvelinus confluentus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58: 406-420
- Tenesa A., Navarro P., Hayes B.J., Duffy D.L., Clarke G.M., Goddard M.E., Visscher P.M. 2007. Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome Research*, 17: 520-526
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 22: 4673-4680
- Tierney L. 1994. Markov Chains for Exploring posterior Distributions. *Annals of Statistics*, 4: 1701-1728
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers ant their use in animal genetics. *Genetics, Selection, Evolution*, 34, 3: 275-305

- Waples R.S. 1991. Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp. and the definition of species under the Endangered Species Act. *Marine Fisheries Review*, 53: 11-22
- Weir B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 6: 1358-1370
- Weiss S., Schlötterer C., Waidbacher H., Jungwirth M. 2001. Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish by man or nature? *Molecular Ecology*, 10, 5: 1241-6
- Wiens J.J., Kuczynski C.A., Arif S., Reeder T.W. 2010a. Phylogenetic relationships of Phrynosomatid lizards based on nuclear and mitochondrial data, and a revised phylogeny for *Sceloporus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 1: 150-61
- Wiens J. J., Kuczynski C. A., Stephens P. R. 2010b. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: implications for speciation and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99, 2: 445-46
- Yang L., Yang S.T., Wei X.H., Gui1 J.F. 2001. Genetic Diversity among Different Clones of the Gynogenetic Silver Crucian Carp, *Carassius auratus gibelio*, Revealed by Transferrin and Isozyme Markers. *Biochemical Genetics*, 39, 5-6: 213-25
- Yang Z., Rennala B. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 17: 717-724
- Zenger K.R., Khakkar M.S., Cavanagh J., Hawken R.J., Raadsma H.W. 2007 Genome-wide genetic diversity of Holstein Friesian cattle reveals new insights into Australian and global population variability, including impact of selection. *Animal Genetics*, 38: 7-14
- Zwickl, D.J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation. Austin, The University of Texas: 22-109

ZAHVALA

Na prvem mestu bi se rad zahvalil moji družini za potrežljivost in vso podporo, ki mi jo je namenila.

Zahvala gre tudi moji mentorici dr. Simoni Sušnik Bajec in somentorju dr. Alešu Snoju za strokovno svetovanje in spodbudo pri laboratorijskem delu ter nastajanju doktorske disertacije.

Hvala dr. Jerneju Jakšetu in dr. Eleni Varljen Bužan za tehtne pripombe.

Iskreno hvala tudi Dušanu Jesenšku in ostalim članom Zveze ribiških družin Primorske, ki so pomagali pri vzorčenju.

Zahvalil bi se rad še sodelavcem, ki so bili pripravljeni svoje znanje vedno deliti z menoj.

Nazadnje, a zato nič manj lepa hvala vsem, ki niso navedeni, a so mi vsa ta leta pomagali in stali ob strani.

PRILOGE

Priloga A:

Ime testa in referenčnega lokusa, številka nukleotidnega zaporedja vnesenega v gensko banko ter mesto nukleotidne zamenjave, temperatura prileganja (Ta) in nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov, ki služijo pri pomnoževanje dela izbranega lokusa

Ime testa in lokusa	Genska banka (SNP); (mesto nukleotidne zamenjave)	Referenca	Ta (°C)	Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje dela izbranega lokusa
GP2_da GP2	JX089593(A); JX089592(T); (239)	Pustovrh in sod. (2012)	56	F: 5'-TCATATTGGAGGAAGAAATACAGA-3' R: 5'-TTGACAGTTCTCAGTGCCTT-3'
GP2_ma GP2	JX089594(G); JX089592(A); (381)	Pustovrh in sod. (2012)	56	F: 5'-TCATATTGGAGGAAGAAATACAGA-3' R: 5'-TTGACAGTTCTCAGTGCCTT-3'
GP5_da GP5	HM066826(T); HM066828(A); (57)	Pustovrh in sod. (2011)	52	F: 5'-GATTCCCTGGTGGACTTGATTGTT-3' R: 5'-AAGAGCTCCAGTGGTCCGATA-3'
GP11b_da GP11	JX089624(T); JX089623(C); (77)	Pustovrh in sod. (2012)	56	F: 5'-AGCAAGGCCATAATCAGTC-3' R: 5'-TCTCAGGATGGTAAGTTGG-3'
GP12b_ma GP12	JX089596(-); JX089595(T); (85)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-TCTCTCTGTGTGTTCCATC-3' R: 5'-TGCTCTTCCCTATCTCATC-3'
GP14_da GP14	HM635380(T); HM635381 (C); (156)	Pustovrh in sod. (2011)	61	F: 5'-CGGAGCAGAGGGAGTTGAGT-3' R: 5'-ACCTGCACACTAATAAACAAACAAA-3'
GP16_da GP16	HM066833(G); HM066840(T); (89)	Pustovrh in sod. (2011)	60	F: 5'-AAGGGCACATATAAACGAACA-3' R: 5'-ATGGTGATGAAGAAGGTGGTTATGG-3'
GP16_mam GP16	HM066833(G); HM066841(T); (294)	Pustovrh in sod. (2011)	60	F: 5'-AAGGGCACATATAAACGAACA-3' R: 5'-ATGGTGATGAAGAAGGTGGTTATGG-3'
GP31_at GP31	HM066844(T); HM066845(G); (84)	Pustovrh in sod. (2011)	52	F: 5'-AGACCAGGAGGGTATTACTAACACA-3' R: 5'-AAGTTTCAGTACTTGGCATTGAT-3'

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime eseja in lokusa	Genska banka (SNP); (mesto nukleotidne zamenjave)	Referenca	Ta (°C)	Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje dela izbranega lokusa
GP31_ma GP31	HM066844(G); HM066846(C); (53)	Pustovrh in sod. (2011)	52	F: 5'-AGACCAGGAGGGTATTACTAACACA-3' R: 5'-AAGTTTCAGTACTTGGCATTGAT-3'
GP34_at GP34	HM066848(G); HM066851(A); (239)	Pustovrh in sod. (2011)	61	F: 5'-CTTGAACTGTTGGCATGTAGG-3' R: 5'-AACACCACAGGCCACTATTT-3'
GP34_mam GP34	HM066848(-); HM066854(T); (42)	Pustovrh in sod. (2011)	61	F: 5'-CTTGAACTGTTGGCATGTAGG-3' R: 5'-AACACCACAGGCCACTATTT-3'
GP37_ma GP37	HM066863(T); HM066869(C); (129)	Pustovrh in sod. (2011)	52	F: 5'-GTATGTGCCATATTCCTATGCTT-3' R: 5'-CAGAACATGTCAGCCAACTCC-3'
GP38_ma GP38	HM066875(G); HM066882(T); (140)	Pustovrh in sod. (2011)	56	F: 5'-CAAAGAAATATGGCAAAC-3' R: 5'-AGCCATTTCATTGTTGATAAT-3'
GP47_at GP47	JX089597(T); JX089598(A); (56)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-TCCTACCTCCATAGACTAGATCA-3' R: 5'-CGGTAATTGACCATGAGTACTACA-3'
GP47_ma GP47	JX089599(A); JX089598(C); (168)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-TCCTACCTCCATAGACTAGATCA-3' R: 5'-CGGTAATTGACCATGAGTACTACA-3'
GP57_ma GP57	JX089601(T); JX089600(A); (230)	Pustovrh in sod. (2012)	63	F: 5'-TGGCCTGCTTGACAGAGTGACAT-3' R: 5'-TTGGGTCCATTGCCTTGCTACA-3'
GP73_da GP73	HM066892(A); HM066896(C); (171)	Pustovrh in sod. (2011)	61	F: 5'-GGCACTCCCTGTATATAGCTTC-3' R: 5'-AGAGCTCACGGTTTACCA-3'
GP85_at GP85	HM066903(A); HM066909(G); (367)	Pustovrh in sod. (2011)	61	F: 5'-CAGCATCCAGCCAATATCAT-3' R: 5'-CACTGCCACTTGTGTTGTTAGA-3'
GP85_da GP85	HM066903(G); HM066909(A); (240)	Pustovrh in sod. (2011)	61	F: 5'-CAGCATCCAGCCAATATCAT-3' R: 5'-CACTGCCACTTGTGTTGTTAGA-3'

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime eseja in lokusa	Genska banka (SNP); (mesto nukleotidne zamenjave)	Referenca	Ta (°C)	Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje dela izbranega lokusa
GP94_at GP94	HM066926(A); HM066928(G); (194)	Pustovrh in sod. (2011)	52	F: 5'-TTCTATATTGTGCAGTTAGCTGT-3' R: 5'-TACCTTTACCTTATGGGA-3'
GP94_ma GP94	HM066926(C); HM066929(A); (232)	Pustovrh in sod. (2011)	52	F: 5'-TTCTATATTGTGCAGTTAGCTGT-3' R: 5'-TACCTTTACCTTATGGGA-3'
GP94_mam GP94	HM066926(T); HM066930(C); (356)	Pustovrh in sod. (2011)	52	F: 5'-TTCTATATTGTGCAGTTAGCTGT-3' R: 5'-TACCTTTACCTTATGGGA-3'
GP96_ma GP96	JX089604(T); JX089602(C); (302)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-TCGACAGCATTACAATATGTGG-3' R: 5'-TACGGGTTTGATTAGATG-3'
PG5_ma PG5	JX089607(T); JX089605(G); (85)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-ACAGGGAGGCTACAGTCATC-3' R: 5'-GAGCGGAATAGGTGGAATG-3'
PG13_ma PG13	JX089609(C); JX089608(A); (262)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-TGTACGAGGTTCATCACTG-3' R: 5'-CATTCTGTGTGCTTGTGTG-3'
PG20_at PG20	JX089610(T); JX089611(A); (380)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-CAGGAGGGTTACATTCTGTG-3' R: 5'-GCAGACTCAGGAGAAGGATG-3'
PG20_da PG20	JX089611(T); JX089610(A); (361)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-CAGGAGGGTTACATTCTGTG-3' R: 5'-GCAGACTCAGGAGAAGGATG-3'
PG20_mam PG20	JX089612(A); JX089613(C); (167)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-CAGGAGGGTTACATTCTGTG-3' R: 5'-GCAGACTCAGGAGAAGGATG-3'
PG42_at PG42	JX089614(C); JX089616(G); (16)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-GCTGCCTGCAGAATAGAGAG-3' R: 5'-TGGGATTGGTGGTAGTG-3'
PG42_da PG42	JX089615 (A); JX089616(G); (91)	Pustovrh in sod. (2012)	61	F: 5'-GCTGCCTGCAGAATAGAGAG-3' R: 5'-TGGGATTGGTGGTAGTG-3'

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime eseja in lokusa	Genska banka (SNP); (mesto nukleotidne zamenjave)	Referenca	Ta (°C)	Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje dela izbranega lokusa
HMG1_da HMG1	HM066730(C); HM066736(A); (486)	Rynanen in Primmer (2006)	61	F: 5'-TCAATCCCTTGATAGTTGTCTTG-3' R: 5'-GGGACACCCTGATTAAATTGTAG-3'
HMG1_ma HMG1	HM066730(T); HM066737(A); (167)	Rynanen in Primmer (2006)	61	F: 5'-TCAATCCCTTGATAGTTGTCTTG-3' R: 5'-GGGACACCCTGATTAAATTGTAG-3'
plagl2_ma plagl2	JX089618(T); JX089617(C); (760)	Li in sod. (2007)	56	F9: 5'-CCACACACTCYCCACAGAA-3' R930: 5'-TTCTCAAGCAGGTATGAGGTAGA-3'
plagl2_mam plagl2	JX089618(G); JX089619(A); (625)	Li in sod. (2007)	61	F51: 5'-AAAAGATTTCACCGMAAAGA-3' R920: 5'-GGTATGAGGTAGATCCSAGCTG-3'
RH_da RH	HM635421(G); HM635424(C); (508)	Sušnik in sod.. (2008)	60	F: 5'-CXTATGAATAYCCTAGTACTACC-3' R: 5'-CCRCAGCACARCGTGGTGATCATG-3'
RH_ma RH	HM635421(C); HM635425(T); (179)	Sušnik in sod. (2008)	60	F: 5'-CXTATGAATAYCCTAGTACTACC-3' R: 5'-CCRCAGCACARCGTGGTGATCATG-3'
SH3_at SH3PX3	JX089620(T); JX089622(C); (408)	Li in sod. (2007)	56	F461: 5'-GTATGGTSGGCAGGAACYTGAA-3' R1303: 5'-CAAACAKCTCYCCGATGTTCTC-3'
SH3_da SH3PX3	JX089621(T); JX089622(C); (276)	Li in sod. (2007)	61	F532: 5'-GACGTTCCCATGATGGCWAAAAT-3' R1299: 5'-CATCTCYCCGATGTTCTCGTA-3'
SILVA_ma SILVA	HM635434(C); HM635440(T); (300)	Sušnik in sod. (2008)	60	F: 5'-CATACAACGGACTTGGTG-3' R: 5'-TTACTGTAGCTCCGTGTGG-3'
SL_at SL	HM635447(C); HM635451(T); (352)	Sušnik in sod. (2008)	52	F: 5'-TGGCCCGTTGAATCCATATAAAG-3' R: 5'-ACTGTGAAACACTAAGCTCTCCA-3'
SS2_at SS2	HM066738(T); HM066740(A); (109)	Rynanen in Primmer (2006)	61	F: 5'-CACTGCAGTAAGGATTATCTGCTT-3' R: 5'-GAGGAAGAGCGAGGAAGATAAAAG-3'

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime eseja in lokusa	Genska banka (SNP); (mesto nukleotidne zamenjave)	Referenca	Ta (°C)	Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje dela izbranega lokusa
TF_at TF	HM635461(C); HM635463(A); (51)	Sušnik in sod. (2008)	60	F: 5'-CCAGTCTCCTTTACCCCTACT-3' R: 5'-CTTGACGGCCACCAGTTT-3'
TF_ma TF	HM635461(GGATCTGGATCT); HM635464(-); (253)	Sušnik in sod. (2008)	60	F: 5'-CCAGTCTCCTTTACCCCTACT-3' R: 5'-CTTGACGGCCACCAGTTT-3'
TFGB_at TFG-beta	HM066748(-); HM066756(GT); (146)	Rynanen in Primmer (2006)	61	F: 5'-GTGAGACTATCCTTATTCCAACG-3' R: 5'-TGTGGTTGGGTAAACAAACAGTAGA-3'
tnfa_da tnfa	HM066769(A); HM066774(G); (41)	Rynanen in Primmer (2006)	56	F: 5'-CTTTCATTAATTGCTTCTCACT-3' R: 5'-GCAGTAGAACAGAAAGGTTCAT-3'
tnfa_ma tnfa	HM066769(T); HM066782(C); (104)	Rynanen in Primmer (2006)	56	F: 5'-CTTTCATTAATTGCTTCTCACT-3' R: 5'-GCAGTAGAACAGAAAGGTTCAT-3'

Priloga B:

Ime testa in referenčnega lokusa, nukleotidno zaporedje alelno specifičnih sond in skupnega začetnega oligonukleotida, obe alelni varianti (X/Y) ter delež posameznih alelov, ki se pojavlja pri marmorirani (MA) in potočni postrvi atlantske (AT) in donavske (DA) filogenetske linije (* označuje GGATCTGGATCT)

Ime testa in lokusa	Alelno specifični sondi VIC in FAM	skupen začeten oligonukleotid	X/Y	AT	DA	MA
GP2_da GP2	GGCAAACAAATGTAATTGTACCAACATTMA GGCAAACAAATGTAATTGTACCAACATTMT	CGGCACGTTGGTCCTCYATAATTAT	A/T	0/100	100/0	0/100
GP2_ma GP2	TGAGAGCTGGGTAGCAGGT GAGAGCTGGGTAGCAGGC	CGACAGAATTGACAACTGCTGGAA	G/A	0/100	0/100	100/0
GP5_da GP5	AGGGTTACTTACTGTAKGAAGGAAC AGGGTTACTTACTGTAKGAAGGAACA	CTGGCCATATGAGAGTGTAACATTAGTTT	A/T	0/100	100/0	0/100
GP11b_da GP11	GGAGTCGGGAGACACGGTG GAGGAGTCGGGAGACACGGTA	CTGCTGGGGTAACGACAGAT	T/C	0/100	100/0	0/100
GP12b_ma GP12	AGGAGGAGATTCCATTCTCAGTTAAA AGGAGGAGATTCCATTCTCAGTTAAR	CTAAATTGCCCTTTAAAGGGAACTACTA	-T	0/100	0/100	100/0
GP14_da GP14	AAACACCCAGKCAAGAGGTTAATTCA CACCCAGKCAAGAGGTTAATTG	CATAAGAGGCTGTCCCGCATCAATT	C/T	0/100	100/0	0/100
GP16_da GP16	CGTGATGGTAACAATKAGCC CTCTCGTGATGGTAACAATKAGCA	AGTTCCATGCATGAAAGATTTATAAACAA	T/G	0/100	100/0	0/100
GP16_mam GP16	GGTTATGCCCTTAAAAGTATTAAAACC GTGGTTATGCCCTTAAAAGTATTAAAACA	AAACGTGCACCTGGTTTATTTGGTTA	G/T	0/100	0/100	47/53
GP31_at GP31	CATGCTGTGTTGTATGAAGCCTAT GTGTTGTATGAAGCCTAG	CCAGTGTGCCTCTGGCCCAT	T/G	45/55	0/100	0/100
GP31_ma GP31	ACCTAGAATTCATGGTAGTCATGG ACCTAGAATTCATGGTAGTCATGC	GGCTTCATCACACACAGCATGACTT	C/G	0/100	0/100	100/0

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime eseja in lokusa	Alelna specifične probe VIC in FAM	skupen začeten oligonukleotid	X/Y	AT	DA	MA
GP34_at GP34	CAGGCCACTATTAAGGCCACC ACAGGCCACTATTAAGGCCACT	CTTTCTCATCCAGTAGTCCTGCAGAA	G/A	82/18	0/100	1/99
GP34_mam GP34	ACACTTAGAATAACTATTATAACCTTTTTTT ACACTTAGAATAACTATTATAACCTTTTTTTA	GTACTTTAATTGATAAAACTTCACATTACAA	-T	0/100	0/100	65/35
GP37_ma GP37	CACTATACTAGCTTAGTTGTACAAACT CTATACTAGCTTAGTTGTACAAACC	CTGGTTGCTAAAATTCTAATAGTCGCCTA	C/T	0/100	0/100	100/0
GP38_ma GP38	CACAATAGAACAGTGTAGATTCTG AAACTCACAAATAGAACAGTGTAGATTCTT	CCGCCCTYTAGTCTCCCTCGA	T/G	0/100	0/100	100/0
GP47_at GP47	ATTCGGTCCTCAAAAAAATACATTCTYAT TCGGTCCTCAAAAAAATACATTCTYAA	CTGTATGACCCAGTGTTGATACAGTATTA	T/A	100/0	0/100	0/100
GP47_ma GP47	CTGCTTCTCTGGTATATTCTCTCAA CTGCTTCTCTGGTATATTCTCTCAAC	TTCATCCTTGTCTGTTCTCTACWATTAA	A/C	0/100	0/100	100/0
GP57_ma GP57	GCATACTGTGGTCCTTTCTTTTA GCATACTGTGGTCCTTTCTTTTTTT	AGGGGTAAACTTCTGAACAYCAAACAAA	T/A	0/100	0/100	100/0
GP73_da GP73	CCTGGGTGTAAAAACACTTCAAC CCCTGGGTGTAAAAACACTTCAAA	CACATTTTAAGTGCTCCAATGGTCAAAT	C/A	1/99	75/25	0/100
GP85_at GP85	ACTGTGTAACAAAGCCTGTTCACTG GACTGTGTAACAAAGCCTGTTCACTA	GCCTCATGTCATCACAAAGTAGAMCTT	A/G	100/0	0/100	0/100
GP85_da GP85	CTACCTTAACGCTTCATTTAAGGG AATCTACCTTAACGCTTCATTTAAGGA	GTGTTGAGCCTATTTCAGATGTCTCAA	A/G	0/100	100/0	0/100
GP94_at GP94	GAGGTTAGTGAAGTAACCCCTGAT AGGTTAGTGAAGTAACCCCTGAC	TAATCATAGTGTCTACCACACAGCAGATA	A/G	67/33	0/100	0/100

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime eseja in lokusa	Alelno specifične probe VIC in FAM	skupen začeten oligonukleotid	X/Y	AT	DA	MA
GP94_ma GP94	CAGATTGGGGATGCTGTATTGTTG CCAGATTGGGGATGCTGTATTGTTT	GTTACTTCACTAACCTCTCGGGAGAA	A/C	0/100	0/100	100/0
GP94_mam GP94	CAACTTAGGTATTAACATCCAATTAGAAC AACAACTTAGGTATTAACATCCAATTAGAACATT	TGGGATACAATCATTCCCTATGGAGTTAT	C/T	0/100	0/100	50/50
GP96_ma GP96	CATGAAAAGGGGATGTAACCTGCG CTCATGAAAAGGGGATGTAACCTGCA	TAGCCGTATTCTCCTGCTACATAGTAATA	T/C	0/100	0/100	100/0
PG5_ma PG5	GTCCGACCTGTTGGAATGAGG CTGTCCGACCTGTTGGAATGAGT	TTGTTCTCCCTCCACCATCCCTTT	T/G	0/100	0/100	100/0
PG13_ma PG13	CCACATACTTTGTATATATCGTGTATATTTT CCACATACTTTGTATATATCGTGTATATTTG	GGGGCAATGTGTTAAGATATTMATGTGAAT	C/A	0/100	0/100	100/0
PG20_at PG20	TGTGTGCATTATGAAAATGATACGACATT GTGTGCATTATGAAAATGATACGACATA	AGAGCTATGTGCAATCAATAAWGACCGAA	T/A	100/0	0/100	0/100
PG20_da PG20	ACCCAGAGCTATGTGCAATCAATAAA ACCCAGAGCTATGTGCAATCAATAAT	CGGCTACTTGTGTCATTATGAAAATGAT	T/A	0/100	100/0	0/100
PG20_mam PG20	GTGTCCAAGTGACAGTCGCCT GTCCAAAGTGACAGTCGCCG	CAAATAGACTAGATATGGCACCGTAGAAA	A/C	0/100	0/100	28/72
PG42_at PG42	AGCTAGCATGAGCTAACATTGC AGCTAGCATGAGCTAACATTGG	AGAGCTTTCAGACATTACATGCTCTA	C/G	100/0	0/100	0/100
PG42_da PG42	GACAAGGAAAAACACTACTWAGGGC GACAAGGAAAAACACTACTWAGGGT	GTGTGTTACCAATAAACCCAGAGAAA	A/G	0/100	100/0	0/100
HMG1_da HMG1	ACCAACTACTGCATTAATGCACCC AAACCAACTACTGCATTAATGCACCA	GACACCCTGATTTAATTGAGTGTAAAT	A/C	0/100	100/0	0/100
HMG1_ma HMG1	GTACTTAAATACCTTCKTCATGTTGTTGT GTACTTAAATACCTTCKTCATGTTGTTGA	CTTGGCGGACATGGTYTGAGAGAA	A/T	0/100	0/100	100/0

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime eseja in lokusa	Alelno specifične probe VIC in FAM	skupen začeten oligonukleotid	X/Y	AT	DA	MA
plagl2_ma plagl2	TGGGC GGCGGCTGGG ACTTGGGCGGGCTGGGA	CCCACCTGCAGCAGCCCCAA	T/C	0/100	0/100	100/0
plagl2_mam plagl2	ATCCCCCATGGCAGCGGAC CATCCCCATGGCAGCGGAT	TGGGCCACCACCACTCTCTGAT	G/A	0/100	0/100	66/34
RH_da RH	CGTCCACTTTCGATTCCCTG CGTCCACTTTCGATTCCCTC	GTTGCCGTAGCAGAAGGTGATGATA	C/G	0/100	100/0	0/100
RH_ma RH	CAGCCC GTTCTTCAAAGACG GCAGCCC GTTCTTCAAAGACA	GATGTACACCTCCATGCATGGCTAT	T/C	0/100	0/100	100/0
SH3_at SH3PX3	GCGCACATGAGGAAGTGCTCG GCGCACATGAGGAAGTGCTCA	CCACCCGGTCCTGTCGCAGTA	T/C	100/0	0/100	0/100
SH3_da SH3PX3	GCACAAGTTCACCGTCATCTCC GCACAAGTTCACCGTCATCTCT	CGAAGGCCCTGTTGCCTGTTT	T/C	0/100	100/0	0/100
SILVA_ma SILVA	ACCCAATACGTAGTAGGCTATGC CACCCAATACGTAGTAGGCTATGT	GACCATTCAATT CCTATT TTYTTGGTCAA	T/C	0/100	0/100	100/0
SL_at SL	TTCTAGTAATGGTATTGTACTCCG ATCTTCTAGTAATGGTATTGTACTCCA	CGCGAAGCGAGGC GGCCAT	T/C	100/0	0/100	0/100
SS2_at SS2	CATTAGATAGATATAAAACTCATAGATGTGA CATTAGATAGATATAAAACTCATAGATGTGT	GGTTCATGGATTGACAGTCTCTAACTAA	T/A	67/33	0/100	0/100
TF_at TF	CCCTATTGGAATCGGCAGATAWTTTA CCTATTGGAATCGGCAGATAWTTTC	GAGATAGAGAGTACTGATAGAAGGAGAAA	C/A	100/0	0/100	0/100
TF_ma TF	TTGCCACARTTGTAAATTGTAAATTCTAGAT GCCACARTTGTAAATTGTAAATTCTAGAG	CTAGC ATACCGATATTGAATTACAAC TGTA	-/*	0/100	0/100	100/0

se nadaljuje

nadaljevanje

Ime eseja in lokusa	Alelno specifične probe VIC in FAM	skupen začeten oligonukleotid	X/Y	AT	DA	MA
TFGB_at TFG-beta	AAGGTGTATAACTCCTAGGTGTG ATAAGGTGTATAACTCCTAGGTGTGA	TCAATGTAAAGTCTTCGCACACAGCAA	-/GT	100/0	0/100	0/100
tnfa_da tnfa	GGGTATCTGAGGGAGAGAACAT GGGTATCTGAGGGAGAGAACAC	GGCTTTGCTTGTGTTATTCATGGCTAAT	G/A	0/100	100/0	0/100
tnfa_ma tnfa	CCGGCAATGCAAARGCAGCC GCCGGCAATGCAAARGCAGCT	GACACAGTCAAGGCTGGCTGCAA	T/C	0/100	0/100	100/0

Priloga C:
HWE vrednosti za preučevane populacije

	AVC	AVP	BAC	BEL	BEN	BEP	BRA	CER	CES	CRN	FAR	HLE	HUB	HUP	IDJ	IDZ	IEIS	IPAS	KAM	KLA
GP47_at	0,549	0,603	1	1	1	0,686	-	1	0,216	0,226	0,352	0,081	1	1	0,377	1	0,028	1	0,674	
PG20_at	-	0,235	0,17	1	1	0,652	1	1	0,298	1	-	1	0,502	0,582	0,206	1	4E-04	0,093	-	
PG42_at	-	0,034	0,169	1	0,62	0,122	0,104	0,383	1	1	0,041	0,557	0,334	0,149	0,387	0,687	0,045	1	0,222	0,537
SH3_at	1	1	0,152	0,388	1	0,224	1	-	1	0,007	0,693	1	0,233	1	1	0,205	0,321	0,237	1	1
GP85_at	0,245	1	1	0,356	0,157	1	0,214	0,557	1	1	0,43	1	1	0,679	1	0,665	0,008	0,369	1	0,008
TFGB_at	-	1	1	1	0,118	0,528	0,017	-	1	0,556	1	-	0,417	0,665	1	1	-	0,025	1	0,064
SL_at	1	0,112	1	0,262	0,252	0,235	0,042	-	1	0,556	0,226	1	0,347	0,299	0,29	1	1	0,074	1	0,409
TF_at	-	0,24	0,16	1	1	1	0,699	-	1	0,019	0,277	0,698	1	0,293	0,64	1	1	1	0,443	0,066
GP2_da	-	-	-	1	-	1	1	1	1	0,139	1	1	1	-	-	0,027	-	0,009	-	
GP11b_da	-	-	1	1	1	0,206	1	-	1	1	0,551	1	0,488	1	1	-	-	-	-	
PG20_da	-	-	1	1	-	1	0,216	0,301	1	0,699	0,624	-	1	1	-	-	-	-	-	
PG42_da	-	-	-	-	1	-	0,298	1	1	0,683	0,063	0,558	1	1	-	-	-	0,024	-	
SH3_da	-	1	-	-	1	0,057	1	-	1	0,035	1	1	-	-	-	-	-	1	-	
GP5_da	-	0,237	-	-	-	0,589	0,007	1	1	0,091	-	0,541	0,484	1	-	1	0,024	-	-	
GP14_da	-	-	1	-	1	1	1	-	1	0,654	0,5	-	1	1	-	-	1E-04	0,064	1	
GP85_da	-	0,237	1	-	-	1	0,556	0,298	1	0,683	0,5	1	1	1	-	-	1	-	-	
HMG1_da	-	1	1	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	-	-	1	-	-	-	
tnfa_da	-	-	-	-	-	0,527	1	1	1	1	1	0,545	1	-	1	-	1	-	-	
RH_da	-	0,508	-	-	-	0,234	0,019	1	1	-	1	0,542	1	-	-	1	-	-	-	
GP2_ma	1	1	0,354	0,257	0,549	-	1	-	-	1	-	1	0,208	0,556	0,117	2E-04	-	0,007	0,676	
GP12b_ma	2E-04	9E-04	0	0,024	0	0,004	2E-04	-	-	0,354	0,001	-	0	0	0,019	0	0,342	0,011	0	3E-04
GP47_ma	0,564	1	0,351	-	1	1	0,024	-	-	0	0,223	-	0,377	0,226	1	0,397	0,272	0,007	0,665	0,679
GP57_ma	-	0,142	1	0,264	1	-	0,697	1	-	0,428	0,014	-	0,697	0,292	1	1	1	7E-04	1	0,253
GP96_ma	1	0,206	0,211	1	0,244	0,257	0,41	0,195	-	0,676	0,665	-	1	1	0,699	-	1	0,321	0,025	0,002
PG5_ma	0,11	1	0,488	1	1	1	0,677	-	-	0,242	0,106	-	0,101	0,229	0,4	0,162	0,355	0,003	1	0,268
PG13_ma	1	1	0,02	-	0,277	-	1	-	-	0,415	0,108	-	0,189	1	1	1	0,021	0,081	0,683	0,369
plag12_ma	1	1	1	0,551	1	1	1	1	-	0,687	0,19	-	0,654	0,586	1	0,389	-	-	1	0,435
GP31_ma	1	1	0,272	0,02	1	0,035	0,584	0,333	-	1	1	-	0,184	1	0,385	0,432	0,252	0,156	0,691	1
GP37_ma	1	0,129	0,158	0,073	1	1	0,635	-	-	1	1	-	0,234	0,12	1	0,415	0,031	0,022	0,192	1
GP38_ma	0,273	0,527	1	1	1	1	8E-04	-	-	0,679	0,679	-	0,428	0,388	1	1	0,028	-	1	1
GP94_ma	1	1	0,168	0,469	0,353	-	0,421	1	-	0,551	0,004	-	0,676	0,022	1	0,235	0,418	0,001	1	0,683
HMG1_ma	-	0,328	1	1	0,121	-	4E-04	-	-	0,02	0,024	1	0,242	0,188	1	1	1	0,147	0,143	0,035
tnfa_ma	-	0,236	1	0,279	1	1	0,661	-	-	0,073	0,043	-	0,415	0,641	0,54	0,004	1	1	0,228	0,091
RH_ma	-	0,145	0,47	1	0,326	-	0,027	-	-	1	0,026	-	0,687	0,277	1	0,101	0,5	0,338	0,69	0,654
SILVA_ma	0,008	0,034	0,016	-	0,608	-	0,027	-	-	-	5E-04	-	0,105	0,025	1	0,421	0,002	0,033	0,076	1
TF_ma	-	0,236	0,259	-	1	-	0,241	0,37	-	-	0,694	-	0,688	0,352	0,235	1	-	-	0,688	0,068

se nadaljuje

nadaljevanje

	KOB	KOR	KOT	KOU	KOZ	LEP	LOC	LPM	MAJ	MRH	NIK	PEK	PER	PRD	PRL	PRM	PRP	PSU	RIT	RIZ	
GP47_at	1	0,676	0,001	0,385	1	1	0,144	1	1	1	-	-	1	0,2	0,57	-	1	1	1	0,659	
PG20_at	-	1	0,178	0,016	1	1	0,638	1	1	0,431	0,528	-	0,114	1	0,023	-	0,042	1	-	0,014	
PG42_at	-	0,354	0,031	0,568	0,69	0,085	1	-	0,347	1	-	-	0,558	1	-	1	-	-	1	0,014	
SH3_at	-	1	1	0,659	1	1	0,661	-	0,544	1	1	1	1	-	0,031	0,432	0,141	1	1	0,099	
GP85_at	-	0,016	0,105	0,079	0,678	1	0,673	-	0,529	0,68	-	-	0,661	0,199	-	1	-	-	1	0,198	
TFGB_at	1	1	0,404	0,669	0,394	1	1	1	0,212	1	-	-	1	-	0,594	-	1	0,293	1	0,014	
SL_at	0,121	0,203	1	0,653	0,221	1	1	1	0,489	0,016	0,54	1	0,371	1	1	1	0,439	0,655	1	0,229	
TF_at	-	0,427	1	0,673	0,666	1	0,643	-	0,275	0,618	1	1	-	1	-	1	0,688	0,372	-	1	
GP2_da	-	0,008	1	-	-	0,127	0,287	-	-	0,399	-	0,091	1	1	1	-	-	0,643	-	0,14	
GP11b_da	-	0,289	1	-	1	1	-	-	0,648	0,172	-	0,277	-	1	1	1	-	1	-	1	
PG20_da	1	0,275	-	-	1	-	0,626	-	-	0,662	-	0,188	1	-	0,007	-	1	0,27	-	1	
PG42_da	-	1	-	1	1	-	0,196	1	-	0,119	-	0,662	-	1	-	-	-	-	-	-	
SH3_da	-	1	1	1	1	1	0,132	-	-	1	-	0,416	1	-	0,03	-	0,408	1	-	1	
GP5_da	-	0,552	1	-	0,194	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	0,145	1	-	1	
GP14_da	-	0,653	-	0,268	0,54	1	-	-	1	1	-	1	-	0,026	1E-04	-	-	0,522	-	1	
GP85_da	1	0,021	-	-	1	-	0,569	-	1	0,651	-	1	1	0,203	-	-	-	-	-	1	
HMG1_da	-	1	-	-	1	-	1	-	-	1	-	0,682	0,212	1	-	-	1	0,606	-	0,503	
tnfa_da	1	0,047	1	0,312	0,084	-	0,409	1	1	1	-	1	1	-	-	-	0,302	0,506	-	1	
RH_da	-	0,55	-	-	0,287	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	0,277	1	-	1	
GP2_ma	-	0,558	1	1	0,099	0,02	1	1	0,465	0,06	0,527	0,09	0,201	-	-	1	1	-	1	0,143	
GP12b_ma	1E-04	0	3E-04	0,023	0	0	0,023	0	-	-	-	0,02	-	-	1	0	-	-	0,004	0,001	
GP47_ma	0,589	1	0,594	1	1	0,679	-	1	1	1	-	-	-	-	-	0,557	1	-	0,578	0,084	
GP57_ma	1	0,33	1	0,031	1	1	0,139	-	1	1	-	1	0,394	-	-	1	-	-	0,202	0,042	
GP96_ma	1	1	0,041	0,685	0,141	1	0,011	0,428	0,004	0,014	0,129	0,086	1	-	0,521	-	1	-	8E-04	0,384	
PG5_ma	1	0,012	0,596	0,675	0,404	0,213	0,401	1	0,471	0,002	-	0,02	1	-	-	0,125	0,661	-	-	0,01	
PG13_ma	0,074	0,007	1	0,646	1	0,689	1	1	0,027	-	-	1	1	-	1	1	0,328	-	1	0,012	
plag12_ma	1	0,001	0,294	0,201	0,087	0,007	-	-	0,131	1	-	0,103	-	-	-	-	0,186	-	1	0,032	
GP31_ma	0,061	1	0,101	0,002	0,691	0,55	-	-	0,468	0,542	-	0,641	0,689	-	-	0,31	-	-	1	0,372	
GP37_ma	-	0,298	0,558	1	1	0,484	1	-	0,634	0,615	1	0,376	-	-	1	0,556	0,302	-	1	0,673	
GP38_ma	0,198	0,084	1	1	0,689	0,209	0,54	1	1	-	1	0,588	0,54	-	-	-	1	-	1	0,419	
GP94_ma	1	0,665	9E-04	0,659	1	0,285	1	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	0,042	
HMG1_ma	1	0,114	1	0,674	0,021	1	1	-	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	1	0,058	
tnfa_ma	1	0,051	0,217	0,385	1	0,542	0,558	1	1	0,124	1	1	1	1	-	1	-	-	1	0,224	
RH_ma	1	0,662	1	0,664	0,223	0,33	1	-	-	1	1	0,662	-	-	-	-	1	-	1	0,106	
SILVA_ma	0,016	0,131	1	0,007	0,193	1E-04	-	-	0,549	-	0,526	1	-	-	-	0,025	1	-	0,117	0,015	
TF_ma	-	0,384	1	0,276	0,013	0,487	-	-	0,277	0,022	1	0,128	-	-	-	-	1	0,483	-	-	0,048

se nadaljuje

nadaljevanje

	SOK	SOS	SOT	SPB	SPS	SUS	SVN	TRS	VRT	ZEM
GP47_at	1	0,34	1	1	1	0,585	0,288	1	0,131	1
PG20_at	1	0,201	1	1	-	0,357	0,032	1	0,056	0,671
PG42_at	1	-	1	0,118	-	0,671	0,3	1	0,689	0,194
SH3_at	0,542	1	-	1	1	0,635	0,538	1	1	0,696
GP85_at	1	1	1	1	1	1	0,143	1	0,543	1
TFGB_at	1	0,103	1	1	-	0,661	1	1	-	0,651
SL_at	1	1	-	1	1	0,089	1	1	0,005	1
TF_at	0,539	1	1	-	-	0,691	0,126	1	1	1
GP2_da	-	1	-	1	-	0,2	1	-	-	1
GP11b_da	1	-	1	-	-	1	1	1	1	1
PG20_da	-	-	-	1	-	-	0,461	-	-	1
PG42_da	-	-	-	0,02	-	0,559	1	-	0,557	0,281
SH3_da	-	1	1	-	-	1	1	-	-	0,626
GP5_da	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1
GP14_da	-	-	1	1	1	-	0,299	1	0,267	0,163
GP85_da	-	-	1	-	-	1	0,239	-	0,542	1
HMG1_da	-	1	-	-	-	0,557	0,53	-	-	1
tnfa_da	-	-	-	-	-	0,588	1	1	0,06	1
RH_da	-	-	-	-	-	-	0,203	-	1	1
GP2_ma	1	1	-	1	1	1	0,019	1	0,119	1
GP12b_ma	1E-04	0	0	0	0,002	-	3E-04	0	0	-
GP47_ma	0,667	0,433	1	0,585	1	1	0,327	0,288	-	0,092
GP57_ma	1	1	0,196	1	-	0,286	0,465	0,205	1	1
GP96_ma	0,118	1	0,632	1	1	1	0,027	0,235	1	0,124
PG5_ma	0,143	1	1	1	-	0,057	0,059	1	0,008	0,034
PG13_ma	1	0,226	1	0,69	0,265	1	0,105	1	1	0,392
plag12_ma	1	1	1	1	-	1	0,238	1	-	1
GP31_ma	1	1	1	0,485	-	0,37	1	1	1	0,431
GP37_ma	0,302	0,587	1	1	1	1	0,063	1	1	1
GP38_ma	1	1	0,286	1	-	1	0,26	1	1	1
GP94_ma	1	0,299	1	1	1	0,429	0,055	1	0,625	0,076
HMG1_ma	0,387	0,005	1	1	1	1	0,458	1	0,677	1
tnfa_ma	0,049	0,558	1	1	-	0,539	1	0,554	0,146	1
RH_ma	1	1	1	1	-	0,551	0,222	0,284	-	1
SILVA_ma	0,145	0,002	0,003	0,002	0,191	0,206	0,003	1	-	0,207
TF_ma	0,134	0,546	1	0,023	-	1	0,632	1	-	0,597

Priloga D:
F_{IS} vrednosti za preučevane populacije

	IDZ	FAR	KOR	RIŽ	BRA	SVN	BAČ	KOT	LEP	IPAS	IEIS
GP47_at	0,2453	0,2941	0,1093	0,1667	0,1401	-0,3592	-0,1333	1	-0,1707	1	-0,0256
PG20_at	0,3125	0,063	0,0143	0,6034	0,16	0,6147	0,4603	0,6364	-0,0213	1	-0,0732
PG42_at	0,1344	0,4563	0,2542	0,5279	0,3684	0,3137	0,4603	0,766	0,4217	-0,0588	0,5141
SH3_at	0,3125	0,1028	0,0571	-0,3784	0,0464	0,2391	0,4648	-0,2222	-0,1429	0,3407	0,25
GP85_at	0,1011	0,1815	0,5306	-0,2932	-0,3237	-0,4393	0,0221	0,5286	-0,0909	0,234	0,785
TFGB_at	0,063	0,0204	0,0194	0,5279	0,5124	0,1026	-0,0857	0,2826	-0,1795	1	0
SL_at	0,0283	-0,2973	0,3333	0,2987	0,4528	0,0841	-0,1515	-0,2222	-0,0213	0,6552	-0,0256
TF_at	0,0837	0,2973	0,1873	0,04	0,0899	-0,4667	0,4627	0,0351	-0,1163	-0,0286	-0,0732
GP2_da	0	0,3407	0,785	0,3407	-0,0213	-0,12	0	-0,0476	0,4713	-	1
GP11b_da	-	0,2038	0,2812	-0,0455	-0,0909	-0,037	-0,027	-0,0476	-0,0213	-	0
PG20_da	-	-0,1707	-0,2973	-0,0272	0,269	0,2	-0,0909	0	0	-	-
PG42_da	-	0,6571	-0,0222	-	-0,2632	-0,2174	-	-	0	1	0
SH3_da	-	0,0204	-0,1282	-0,1707	-0,0435	-0,0769	0	0,0351	-0,0213	-	0
GP5_da	-0,0213	0	-0,2105	-0,0213	0,7857	-0,013	0	-0,0476	-0,0909	-	1
GP14_da	-	0,121	-0,1634	-0,0476	-0,0698	0,3137	-0,0857	-	-0,0222	-0,6667	-0,9
GP85_da	-	0,121	0,632	0,0204	-0,2	-0,4	-0,027	0	0	-	-0,0213
HMG1_da	-0,0667	-0,0667	-0,0455	0,121		-0,2727	-0,027		0	-	0
tnfa_da	-	-0,0435	0,5141	-0,0667	-0,0667	-0,037	0	-0,1	0	0	-0,0286
RH_da	-0,0213	-0,0909	0,2038	-0,0435	0,6336	0,451	0		-0,0667	-	-
GP2_ma	0,3475	-0,0213	0,195	0,3514	-0,0272	0,7742	0,24	-0,2222	0,6336	-	1
GP12b_ma	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,7816	0,2453
GP47_ma	0,2362	0,2987	-0,0402	0,4227	0,4958	0,3115	0,2267	0,2029	-0,1468	0,7037	0,3333
GP57_ma	0,0464	0,5152	0,2258	0,4419	-0,1016	0,2	0,0769	0,0149	0,0108	0,8615	0,0718
GP96_ma	0	0,1011	0,0638	0,1892	-0,1957	-0,6471	0,3066	1	-0,0952	0,25	-0,0698
PG5_ma	0,3275	0,3684	0,6066	0,5669	0,1506	0,6056	0,1509	0,2029	0,269	0,8333	0,24
PG13_ma	-0,0286	0,3514	0,5683	0,6066	-0,0827	0,65	0,5663	0,0435	0,1344		0,5506
plagI2_ma	0,2008	0,2836	0,6987	0,4864	0,04	0,4091	-0,0286	0,3529	0,7857	0,5761	0,2542
GP31_ma	0,1873	-0,0073	0,0552	-0,2188	0,1429	-0,037	0,3289	0,5286	0,2038	0,4627	1
GP37_ma	0,2079	0,0638	0,2581	0,1373	0,1481	0,6	0,4627	-0,2941	0,1273	-	1
GP38_ma	0,0143	-0,1541	0,4081	0,2182	0,6779	0,3333	0	-0,2222	0,3491	1	0,1791
GP94_ma	0,2552	0,6026	0,1321	0,4528	0,1864	0,6056	0,4603	1	0,2615	-	-0,1053
HMG1_ma	-0,0213	0,4947	0,3521	0,4545	0,7419	0,2	-0,0411	-0,082	0,0204	0,8372	0,0718
tnfa_ma	0,6104	0,4528	0,425	0,2987	0,1519	-0,12	-0,1032	-0,4667	-0,2308	0,4648	0,121
RH_ma	0,3684	0,4947	0,1011	0,3766	0,5152	0,3488	0,1593	0,1538	0,2258	-0,1351	1
SILVA_ma	0,1864	0,7241	0,4699	0,534	0,5152	1	0,625	0,0149	0,7543	0,2453	-
TF_ma	0,0909	-0,1163	0,2362	0,4331	0,2581	-0,1667	0,3333	0,0351	0,1273	1	-
polprečje	0,1793	0,2128	0,2447	0,2372	0,1998	0,1651	0,1716	0,1830	0,1210	0,5148	0,2591

Elektronska verzija doktorske disertacije je identična s tiskano verzijo.

Kot avtor doktorske disertacije se strinjam z njeno objavo v Digitalni knjižnici Biotehniške fakultete.

Gašper Pustovrh