

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA
GENOTIPIZACIJA MIKROSATELITNIH LOKUSOV
PRI VELIKEM PUPKU *Triturus carnifex*
(AMPHIBIA: URODELA)

GAJA PAVLIHA

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

Genotipizacija mikrosatelitnih lokusov pri velikem pupku
***Triturus carnifex* (Amphibia: Urodela)**

(Genotypization of microsatellite loci of crested newt *Triturus carnifex*
(Amphibia: Urodela))

Ime in priimek: Gaja Pavliha
Študijski program: Biodiverziteta
Mentor: izr. prof. dr. Elena V. Bužan
Somentor: dr. Martina Lužnik

Koper, avgust 2014

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Gaja PAVLIHA

Naslov zaključne naloge: Genotipizacija mikrosatelitnih lokusov pri velikem pupku *Triturus carnifex* (Amphibia: Urodela)

Kraj: Koper

Leto: 2014

Število listov: 29 Število slik: 7 Število preglednic: 9

Število referenc: 34

Mentor: izr. prof. dr. Elena V. Bužan

Somentor: dr. Martina Lužnik

Ključne besede: Genotipizacija, mikrosateliti, lokus, Hardy-Weinbergovo ravnotežje, heterozigotnost, inbriding, veliki pupek, polimorfnost.

Izvleček: Cilj zaključne naloge je opraviti preliminarno analizo mikrosatelitnih lokusov petnajstih populacij velikega pupka (*T. carnifex*). Uporabili smo vzorce DNA 135 osebkov velikega pupka z območja JZ Slovenije in hrvaške Istre. Opravili smo laboratorijske in računalniške analize šestih mikrosatelitnih lokusov. S programom GeneMapper smo ugotavljali pozicije posameznih alelov ter heterozigotnost lokusov. Na podlagi analiziranih podatkov smo ugotavljali odstopanja od Hardy-Weinbergovega ravnotežja, izračunali pričakovano in opazovano heterozigotnost za vse lokuse, število alelov in bogastvo alelov. Preučevane parametre smo primerjali s tremi predhodnimi raziskavami. Ugotovili smo visoko polimorfnost lokusov, z najvišjim številom alelov na lokusu Tcri35 (15). Pri štirih populacijah je bilo odstopanje od Hardy-Weinbergovega ravnotežja statistično značilno. Povprečna pričakovana heterozigotnost za vse populacije je bila 0,59; povprečna opazovana heterozigotnost pa 0,54. Višek heterozigotnosti je značilen le za eno populacijo. Povprečna vrednost bogastva alelov je znašala 1,62 na populacijo, povprečno število alelov pa 4,14 na populacijo. Vrednosti povprečne pričakovane in opažene heterozigotnosti so med raziskavami precej podobne, nekoliko višje so pri raziskavi Mikulíček in sod. (2012), bogastvo alelov pa je v primerjavi z raziskavo Maletzky in sod. (2008) precej nižje. V vhodnih podatkih so bili zabeleženi tudi ničelni aleli, ki so jih programi obravnavali kot prave alele, zaradi česar so nekatere ocene lahko pristranske, vzorce s takšnimi aleli pa bi

morali iz analize odstraniti. Naši preliminarni rezultati bodo osnova za nadaljevanje podrobnih populacijskih študij velikega pupka na tem območju, ki bodo morda razjasnile varstveni status in morebitno ogroženost populacij velikega pupka.

Key words documentation

Name and SURNAME: Gaja PAVLIHA

Title of the final project paper: Genotypization of microsatellite loci of crested newt *Triturus carnifex* (Amphibia: Urodela)

Place: Koper

Year: 2014

Number of pages: 29 Number of figures: 7 Number of tables: 9

Number of references: 34

Mentor: Assoc. Prof. Elena V. Bužan, PhD

Co-Mentor: Assist. Martina Lužnik, PhD

Keywords: Genotypization, microsatellite, heterozygosity, allele, locus, Hardy-Weinberg equilibrium, polymorphism.

Abstract: The aim of final study is to do a preliminary analysis of six microsatellite loci from 15 populations of Crested Newt (*Triturus carnifex*). We used DNA samples of 135 specimens in the Karst Edge (SW Slovenia). For the visualisation of alleles we used GeneMapper Software. We counted the number of alleles on each locus and determined heterozygosity or homozygosity of alleles. We used statistical program Genepop to observe population out of Hardy-Weinberg equilibrium model (HW). Deviations from this model (Fis), expected (He) and observed (Ho) heterozygosity were measured with programme Genetix, number of alleles (NA) and allelic richness (AR) were measured in FSTAT software. We compared our study with some previously analysed studies. Loci are highly polymorphic (the maximum number of alleles per locus was 15 (Tcri35)), four populations are showing statistically significant results, their HW value is less than 0.05. We calculated the average He and Ho for all populations (He = 0.59, Ho = 0.54). Fis revealed excess of heterozygosity in only one population (8). Average NA per population is 1,62, average AR per population is 4.14. Due to a presence of null alleles, our results are biased. Some of the populations contain only one or two exemplary specimen, such populations were excluded from the interpretation of the results. A re-sampling of selected ponds is proposed, for better determination on conservation status. On the basis of our results, it is difficult to directly predict the fate of populations of Crested Newt.

Zahvala

Za pomoč pri interpretaciji rezultatov se zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. Eleni V. Bužan in somentorici dr. Martini Lužnik, za pomoč pri celotni izdelavi zaključne naloge.

Za pomoč pri laboratorijskem delu zaključne naloge bi se rada zahvalila asis. Sari Zupan in asis. dr. Matjažu Hladniku ter Laboratoriju za molekularno ekologijo, Znanstveno-raziskovalnega središča, Univerze na Primorskem, v katerem sem opravila laboratorijski del naloge.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1.1 Veliki pupek (<i>Triturus carnifex</i>) (Laurenti 1768).....	1
1.1.1 Morfologija.....	2
1.1.2 Življenjski cikel in razvojni krog	3
1.1.3 Razširjenost in življenjski prostor	3
1.1.4 Dinamičnost populacij velikega pupka (<i>T. carnifex</i>)	5
1.1.5 Varstveni status in ogroženost velikega pupka (<i>T. carnifex</i>)	5
1.2 Mikrosateliti.....	6
1.3 Genska diverziteteta in njeni parametri	7
1.3.1 Heterozigotnost alelov.....	7
1.3.2 Hardy-Weinbergovo (H-W) ravnotežje	8
1.3.3 Koeficient inbridinga (Fis).....	8
1.3.4 Število alelov (NA) in bogastvo alelov (AR).....	9
1.4 Predhodne raziskave genske pestrosti velikega pupka in sorodnih vrst	9
1.5 Namen dela	10
2 MATERIALI IN METODE	12
2.1 Zbiranje vzorcev	12
2.2 Laboratorijsko delo	13
2.2.1 PCR, denaturacija in sekvenčna analiza lokusa Tcri35.....	14
2.3 Vizualizacija alelov in priprava vhodnih podatkov	15
2.4 Statistična obdelava.....	16

3 REZULTATI IN DISKUSIJA.....	17
3.1 Vizualizacija alelov.....	17
3.2 Med-populacijska genska struktura	18
4 ZAKLJUČEK	25
5 VIRI IN LITERATURA.....	27

KAZALO SLIK

Slika 1: Samec velikega pupka (<i>T.carnifex</i>).....	2
Slika 2: Distribucija velikega pupka (<i>T.carnifex</i>) v Evropi.....	4
Slika 3: Primer mikrosatelitnega zaporedja treh sekvenc.....	126
Slika 4: Lokacije vzorčenih kalov	12
Slika 5: Primer izrisa elektroferograma.....	17
Slika 6: Pričakovana (H_e) in opažena (H_o) heterozigotnost po populacijah.....	21
Slika 7: Faktorski prikaz distribucije populacij.....	24

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Število populacij, lokacije in število vzorčenih osebkov posamezne populacije	13
Preglednica 2: Karakterizacije šestih mikrosatelitnih lokusov za <i>T. carnifex</i> in <i>T. cristatus</i>	14
Preglednica 3: Primer preurejene preglednice	15
Preglednica 4: Primerjava števila opaženih alelov med našimi rezultati, raziskavo Krupa in sod. (2002) ter Mikuliček in sod. (2012)	18
Preglednica 5: Rezultati pričakovane (H_e) in opažene (H_o) heterozigotnosti, Hardy-Weinbergovo ravnotežje (HW), koeficient inbridinga (FIS), število alelov v posamezni populaciji (NA) in bogastvo alelov posamezne populacije (AR)	19
Preglednica 6: Hardy-Weibergov test ravnotežja za posamezen lokus in populacijo	20
Preglednica 7: Primerjava H_e in H_o med našo in raziskavo Krupa in sod. (2002), Maletzky in sod. (2008), Mikuliček in sod. (2012) in Jehle in sod. (2005)	20
Preglednica 8: Število alelov (NA), vzorčenih na posameznem lokusu	22
Preglednica 9: Bogastvo alelov (AR) lokusov na populacijo	23

Seznam kratic

AFLP – dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov (angl. amplified fragment length polymorphism)

AR – bogastvo alelov

DNK – deoksiribonukleinska kislina

AFC – analiza faktorske korespondence (angl. factorial correspondence analysis)

Fis – koeficient inbridginga

He – pričakovana heterozigotnost

Ho – opažena heterozigotnost

HW – Hardy-Weinbergovo ravnotežje

NA – število alelov

PCR – verižna reakcija s polimerazo

RAPD – naključno pomnoževanje polimorfne DNK (angl. random amplified polymorphic DNA)

RFLP – polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)

SD – standardne deviacije

SNP – polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphism)

STR – kratka tandemska zaporedja (angl. short tandem repeats)

SSR – enostavna zaporedja (angl. simple sequence repeat)

1 UVOD

Pupki imajo zelo omejene disperzijske zmožnosti in so izrazito filopatrični. V paritvenem obdobju se zadržujejo v vodnih telesih, v katera se vračajo vsako leto in so idealni modelni organizmi za populacijske študije (Jehle in sod. 2005b). Dvoživke so ena izmed bolj ogroženih skupin na svetu, kar povečuje potrebo po poznavanju njihove populacijske biologije in dinamike.

Nov pogled na genski pretok med populacijami in znotraj njih lahko pridobimo s pomočjo jedrnih genskih markerjev s hitro evolucijo. Mikrosateliti so primerni markerji, saj so sestavljeni iz edinstvenega ponavljajočega zaporedja, iz enega, dveh ali več baznih parov (Brown 1999). Stopnja polimorfizmov v genomu organizma je sorazmerna s stopnjo mutacije, ki je pri mikrosatelitih zelo visoka, okarakterizirana pa je s stopnjo heterozigotnosti na posameznih lokusih (Ellegren 2004).

Merjenje genske diverzitete je eno ključnih orodij za napoved usode ogroženih populacij. S pomočjo genskih parametrov izsledimo vzorce, ki lahko nakazujejo upad genske variabilnosti, kar vodi v oslavljen fitnes populacije. Naš namen je oceniti gensko variabilnost, ugotoviti njen razpon in predvideti usodo populacij. Le populacije z visoko variabilnim genskim zapisom se lahko prilagodijo hitro spreminjajočem okolju (Frankham in sod. 2009).

V zaključni nalogi smo preliminarno analizirali šest mikrosatelitnih lokusov 135 vzorcev DNK velikega pupka (*Triturus carnifex*). Naše rezultate smo primerjali s predhodno analiziranimi rezultati treh raziskav (Krupa in sod. (2002), Maletzky in sod. (2008), Mikulíček in sod. (2012)) in skušali dokazati uporabnost mikrosatelitnih markerjev za to vrsto. Rezultati bodo pripomogli k izbiri optimalnih polimorfnih lokusov za oceno populacijske strukture populacij.

1.1 Veliki pupek (*Triturus carnifex*) (Laurenti 1768)

Velikega pupka (*T. carnifex*) uvrščamo v družino pupkov in močeradov (Salamandridae), v razred dvoživk (Amphibia), med repate dvoživke (red Caudata) (Jehle in sod. 2011, . Poleg velikega pupka so v Sloveniji prisotne še tri vrste pupkov: navadni pupek (*Lissotriton vulgaris*), planinski pupek (*Mesotriton alpestris*) in nedavno odkriti panonski pupek (*T. dobrogicus*) (Stanković in Delić 2012). Od repatih dvoživk najdemo v Sloveniji še človeško ribico (*Proteus anguinus*) ter navadnega in planinskega močerada (*Salamandra salamandra* in *Salamandra atra*) (Kryštufek in Janžekovič 1999, cit. po Prirodoslovni muzej Slovenije).

Rod *Triturus* trenutno vključuje 7 vrst velikih pupkov, ki se delijo v dve večji skupini. Prvo skupino predstavljajo marmorirani pupki, v katero uvrščamo vrsti *T. marmoratus* in *T. pygmaeus*. Ti dve vrsti sta razširjeni predvsem v zahodni in jugozahodni Evropi (Arntzen in sod. 2007). Ostalih pet vrst je tesno sorodnih in tvorijo skupino velikih pupkov (angl. *T. cristatus superspecies*), kamor poleg *T. carnifex* uvrščamo še *T. cristatus*, *T. karelinii*, *T. dobrogicus* in *T. macedonicus* (Arntzen in sod. 2007, Jehle in sod. 2011). V kontaktnih conah pogosto prihaja do hibridizacije med njimi (Maletzky in sod. 2008; Mikuliček in sod. 2012), kot tudi na kontaktu med *T. cristatus* in *T. marmoratus* (Jehle in sod. 2005a).

1.1.1 Morfologija

Trebuh velikega pupka je živo oranžne barve, s črnimi pikami, vzorci so edinstveni za vsak posamezen osebek. Samice so drugačne, manj izrazite, z rumeno neprekinjeno črto, ki poteka po sredini hrbta. Samce prepoznamo po nazobčanemu hrbtnemu grebenu, ki se pojavi v paritvenem obdobju in se od grebena sorodne vrste *T. cristatus* razlikuje v tem, da je nekoliko manjši in manj nazobčan (Jehle in sod. 2011). Dorzalna obarvanost variira od rjavo-zelene do črne, tako pri samcih kot pri samicah. Prav tako so pri obeh spolih na grlu prisotne majhne bele pike. Povprečna velikost velikih pupkov je 10 do 15 cm (Griffiths 1999, cit. po Lužnik 2013; Jehle in sod. 2011).



Slika 1: Samec velikega pupka (*T. carnifex*). (Foto: Trapp B.)

1.1.2 Razvojni krog

Veliki pupki preživijo del leta v vodi, del pa na kopnem, kjer si poleg skrivališč in ustreznih prehranjevalnih habitatov poiščejo tudi primerna vlažna prezimovališča, kot so trohneča drevesa ali med razpokami v kamenju. Konec februarja ali v začetku marca jih zapustijo in migrirajo do najbližjih vodnih teles, kjer preživijo paritveno obdobje. Samci dosežejo spolno zrelost pri približno treh letih, samice pa leto kasneje (Griffiths 1999, cit. po Lužnik 2013).

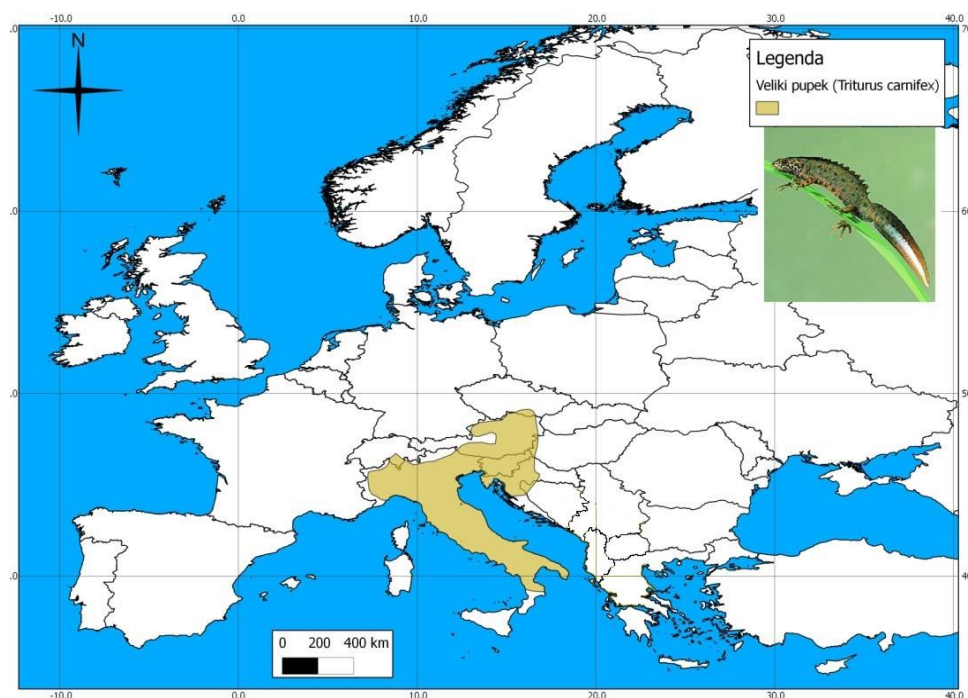
Migracije pupkov so odvisne od okoliških podnebnih razmer, kot so količina vlage, razpoložljivost sence in podobnih, zaradi tega so vezane na temnejši del dneva in niso daljše od 100 m v eni noči, njihova celotna pot pa ne presega več kot 1500 m (Jehle in sod. 2011). V vodi preživijo od nekaj tednov do nekaj mesecev, paritvena doba je pri različnih vrstah različno dolga, večinoma odvisna od lokalne klime. Pri velikem pupku je vodna faza, ki nastopi v času mrestenja, dolga približno štiri mesece (Arntzen in Wallis 1999).

Samci velikih pupkov so še posebej opazni v paritvenem obdobju. Takrat skušajo s paritvenim plesom privabiti samice in zagotoviti prenos genov na potomce. Poleg plesa so jim v pomoč tudi feromoni in dorzalni nazobčan greben, ki se razteza od zatilja do repa (Jehle in sod. 2011). Dorzalni greben, ki ima pomembno vlogo pri spolni selekciji (Wiens in sod. 2011), predstavlja lahko tudi breme, saj je pupek z večjim grebenom bolj opazen za plenilce.

Samec po uspešnem dvorjenju odloži na dno skupek semenčic imenovanih spermatofor, ki jih samica sprejme vase in oplojena jajčeca nato posamično zavije v liste ali stebila vodnih rastlin. Po približno dveh tednih se iz jajčec izležejo majhne ličinke, ki se po zunanemu izgledu ločijo od odraslih po zunanjih škrgah in slabše razvitih sprednjih in zadnjih okončinah. Larvalno življenje zaključijo pri treh mesecih starosti. Razvijejo se jim pljuča, preoblikujejo se jim okončine in kot odrasli osebki migrirajo na kopno (Griffiths 1999, cit. po Lužnik 2013).

1.1.3 Razširjenost in življenjski prostor

Veliki pupek je v Sloveniji splošno razširjena vrsta. V Evropi je pogost še v Avstriji, Italiji in osrednji Hrvaški, srečamo ga lahko še na manjših območjih J Švice, J Češke, V Madžarske in Z Bosne, kot je prikazano na sliki 2. V Sloveniji se najpogosteje nahaja na nadmorski višini med 100 in 900 m, srečamo ga lahko tudi na višinah do 1800 m (Poboljšaj in Lešnik 2003).

Slika 2: Distribucija *T.carnifex* v Evropi (vir: IUCN).

Pomembno vlogo v življenju pupkov imajo vodna telesa. Na Kraškem robu (jugo-zahodni del Slovenije), kjer je zaradi prepustnega apnenca pomanjkanje površinskih voda, so pupki in ostale dvoživke vezani na manjše kotanje z vodo, kot so kali ali lokve, ribniki ter podobne. Kali so manjše kotanje umetnega nastanka, ki v povprečju zajemajo od 100 do 200 m³ prostornine. Vanje se steka deževnica, lahko pa se v kotanji nabira izvirska voda (Poboljšaj 2007). V teh vodnih telesih količina vode med letom ni enakomerna, saj se v poletni vročini pogosto izsušijo, ob večjih deževjih pa se ponovno napolnijo in znova zaživijo s pestro biodiverzitetjo.

Kali so večinoma plitka vodna telesa (v povprečju meter in pol globoka), tako lahko prodre svetloba do dna in, je poleg vira svetlobe in pogoja za fotosintezo, tudi vir toplote. Nihanja v temperaturi ne opazimo samo čez leto, temveč tudi čez dan. Tako je temperatura vode ponoči nižja kot podnevi, ko je celoten kal segret. Prodornost svetlobe omogoča razvoj alg v globljih predelih kala in hitrejši razvoj višjih vodnih rastlin, ki s fotosintezo vplivajo na količino raztopljenega kisika v vodi (Poboljšaj 2007).

Veliki pupek si za mrestišča najraje izbere srednje velike kale ali mirne stoječe vode z bujno rastjo, ki predstavlja primerno skrivališče tako za jajca kot za pupke same (Poboljšaj in Lešnik 2003).

1.1.4 Dinamičnost populacij velikega pupka

Ocena povprečne velikosti populacij (cenzus) velikih pupkov (rod *Triturus*) je med 20 in 200 osebkov, zelo redke so populacije s 1.000 osebkami in več. Lužnik (2013) je v svoji disertaciji ocenila velikost populacij velikega pupka (*T. cristatus*) in navadnega pupka v enem kalu (kal nad Kastelcem) in za celoten Kraški rob. Vzorčenje je potekalo leta 2007 in 2008, od marca do junija meseca. V kalu nad Kastelcem je ocenila velikost celotne populacije na 145 osebkov, razmerje med spoloma je bilo približno enako. Na Kraškem robu je ocenila velikost populacij štirih kalov (Črnotiče JV, Movraž, Socerb S in Rakitovec JZ), vzorčenje na teh kalih pa je potekalo le dva dni, ocene velikosti populacije so razmeroma variabilni. Število ujetih osebkov je bilo razmeroma majhno (največ 41 v kalu na Socerbu), majhno je bilo tudi število ponovno ulovljenih osebkov (največ 5).

Število juvenilnih osebkov ne odseva števila odraslih, razmnožuje se le del populacije, t.j. efektivna velikost populacije (n_e), ki je od celotne velikosti populacije manjša. Velikost populacije je v največji meri regulirana z biotskimi in abiotskimi dejavniki, kot so kompeticija za hrano in predatorstvo (Frankham in sod. 2009; Jehle in sod. 2011).

1.1.5 Varstveni status in ogroženost velikega pupka

Veliki pupek (*T. carnifex*) je zavarovan z Uredbo o zavarovanju ogroženih živalskih vrst (Ur. l. RS 3(57): 2851-2854. Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst (Ur. l. RS 12(82)) ga uvršča na Rdeči seznam kot ranljivo vrsto – V (Poboljšaj 2007). Cipot in sod. (2011) so v končnem poročilu projekta »Vzpostavitev monitoringa velikega pupka (*Triturus carnifex*)« navedli rezultate vzorčenja velikega pupka (*T. carnifex*) za izbrana Natura 2000 območja v Sloveniji. Med letoma 2010 in 2011 so opravili monitoring razširjenosti velikega pupka na 37 območjih Nature 2000. Prisotnost velikega pupka so potrdili na 22 Natura 2000 območjih, kjer je bil znan tudi v preteklosti. Našli so ga tudi na 2 novih območjih, na 6 območjih, kjer je bil veliki pupek prej znan, ga ob enkratnem pregledu izbranih lokacij niso našli. Prav tako ga niso našli na 7 območjih, kjer najdb pred njimi še ni bilo. Velikega pupka so v okviru monitoringa našli na 31 lokalitetah, kjer je bil znan že pred to raziskavo, ter na 32 novih lokalitetah. Na 52 lokalitetah, kjer je bil znan pred njihovo raziskavo, njegove prisotnosti niso potrdili.

Veliki pupek je tudi t. i. evropsko pomembna vrsta – kvalifikacijska vrsta za območje Natura 2000, torej ena izmed vrst, ki moramo še posebej varovati in ohranjati njihove habitate. IUCN list ogroženih vrst ga uvršča med manj ogrožene vrste (LC – least concern), vendar se njihove populacije zmanjšujejo. V zadnjih desetletjih se je število kalov, primernih za mrestišča pupkov in drugih dvoživk, opazno zmanjšalo, večina je izpostavljena izsuševanju in zaraščanju (Poboljšaj 2007). Baza podatkov IUCN navaja

nekaj groženj, kot so intenzivno kmetijsko, onesnaževanje in urbanizacija krajine. Nevarnost predstavljajo tudi invazivne vrste, kot je zlata ribica (*Carassius auratus*) iz družine krapovcev (Cyprinidae), ki je v kalih vse bolj pogosta, njen plen so tudi ličinke pupkov.

1.2 Mikrosateliti

Velik del **KATEREGA** genoma je sestavljen iz ponavljajočih zaporedjih, imenovanih mikrosateliti ali kratka tandemska zaporedja STR (angl. *short tandem repeats*) ali enostavna zaporedja SSR (angl. *simple sequence repeat*). Večinoma so to ena do pet baznih parov dolge sekvence, ki nastanejo zaradi zdrsa alelov (angl. *alelic slippage*) med podvajanjem DNK verige, zato je število ponovitev posameznih mikrosatelitnih lokusov precej variabilno znotraj populacije. Dedujejo se kodominantno, po Mendlovih zakonih, kar je v genetskih raziskavah zaželeno, saj omogoča takšno dedovanje izraženost vseh genotipov v osebkju (Frankham in sod. 2009; Brown 1999).

Z mikrosateliti običajno merimo genetsko variabilnost nevtralnih lokusov (to so lokusi, ki niso izpostavljeni naravni selekciji) ne-kodirajočega dela genoma (Frankham in sod. 2009; Brown 1999). Za razliko od minisatelitov ali VNTR (angl. *variable number of tandem repeats*) imajo mikrosateliti krajša zaporedja, zaradi česar se sekvenca zaporedja hitreje in natančneje pomnoži v verižni reakciji s polimerazo (PCR) (angl. *polymerase chain reaction*) (Brown 1999). Primer mikrosatelitnega zaporedja je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Primer mikrosatelitnega zaporedja treh sekvenc. V prvem primeru (#1) se vzorec CA ponovi 30-krat, v drugem primeru (#2) 34-krat, v tretjem primeru (#3) pa 36-krat. V spodnjem okviru so prikazani vsi genotipi, ki iz teh treh sekvenc lahko nastanejo.

Poleg tandemskih zaporedij, kamor uvrščamo minisatelite in mikrosatelite, so za genetsko mapiranje uporabljeni še drugi markerji, kot so polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov RFLP (angl. *restriction fragment length polymorphism*), polimorfizem posameznih nukleotidov SNP (angl. *single nucleotide polymorphism*), dolžinski polimorfizem namnoženih fragmentov AFLP (angl. *amplified fragment length polymorphism*) in naključno pomnoževanje polimorfne DNK RAPD (angl. *random*

amplified polymorphic DNA). Genetski marker je definiran kot znano zaporedje nukleotidov DNK, ki se na kromosomu nahaja tako blizu nekega gena, da se deduje kar skupaj s tem genom (Frankham in sod. 2009; Brown 1999).

1.3 Genska diverziteta in njeni parametri

Genska diverziteta je pestrost genskih variacij oz. raznolikost alelov in genotipov v preučevanem taksonu, in je ena bistvenih temeljev za prilagoditev taksona na evlucijske spremembe. Izguba genske diverzitet je v največji meri posledica parjenja v sorodstvu, kar pripelje do zmanjšanja reproduktivne aktivnosti populacije ter poslabša njen fitness. Determinirana je s stopnjo mutacij ter številom migracij (Frankham in sod. 2009).

Gensko diverzitetu lahko merimo za različne markerje, kot so lokusi jedrne DNK, mitrohondrijska DNK, kloroplastna DNK, proteini, kromosomi in druge, vse bolj v uporabi pa so ravno mikrosateliti. Njihova prednost je ta, da so izjemno variabilni, ne invazivni ter cenovno dostopni (Frankham in sod. 2009).

1.3.1 Heterozigotnost alelov

Heterozigotnost je stanje osebkov, da ima na enem lokusu dva različna alela. Takšnemu osebkov pravimo heterozigot. Nasprotno je osebek z dvema enakima aleloma na posameznem lokusu homozigot. Heterozigotnost se v populacijski genetiki nanaša na celotno populacijo, kjer se opazuje skupino osebkov preučevane populacije, ki so na določenem lokusu heterozigotni. Na podlagi heterozigotnosti lahko ugotovimo stopnjo genske raznolikosti lokusov v posameznih populacijah. Izgubo genske raznolikosti lahko merimo s primerjavo heterozigotnosti v daljšem časovnem obdobju (Frankham in sod. 2009).

Določamo lahko pričakovano in opaženo heterozigotnost, ki ju primerjamo v Hardy-Weinbergovem testu ravnotežja (angl. *Hardy-Weinberg equilibrium test*). Opažena heterozigotnost (H_o) nam poda razmerje med številom osebkov, ki so na določenem lokusu heterozigotni in številom vseh osebkov tiste populacije. Pričakovana heterozigotnost (H_e) pa je vrednost, ki jo pričakujemo na podlagi opažene frekvence alelov, predpostavljene na podlagi Hardy-Weinbergovega ravnotežja (H-W ravnotežja) (Jelenič 2008; Frankham in sod. 2009).

1.3.2 Hardy-Weinbergovo (H-W) ravnotežje

Spremembe v sestavi genskega zapisa neke populacije so osnova za evolucijo. To so vse majhne spremembe znotraj populacije, ki nastajajo iz generacije v generacijo in so lahko razlog za postopen prehod v novo vrsto. Biološke vede opredeljujejo evolucijo kot seštevek vseh gensko podedovanih sprememb pri posamezniku, katerega genotip je del genskega bazena populacije. Čeprav učinke evolucije občutijo posamezniki, je populacija tista, ki se razvija in ne posameznik. Evolucija je torej sprememba frekvence alelov v genskem skladu populacije (Frankham in sod. 2009).

V bazi podatkov Hardy-Weinberg Equilibrium Model je obravnavano, da je vsaka je obravnavano, da je vsaka populacija podvržena evoluciji, le na en tip populacije evolucija nima nobenega učinka. To je predpostavljena idealna populacija, v kateri ni mutacij, migracij in naravne selekcije, kjer je parjenje med osebkami naključno, pariyo se vsi osebki, število potomcev je enako številu efektivne velikosti populacije, takšna populacija pa je neskončno velika. Pri takšnih pogojih je populacija v H-W ravnotežju, njene frekvence alelov in genotipov bodo v ravnotežju ostale skozi generacije. Takšne populacije v naravi ne obstajajo, zaradi česar pride do odstopanja frekvenc od tega ravnotežja. H-W ravnotežje opisuje torej idealno stanje populacij, katerih genske variacije v naravi lahko merimo kot odstopanja od tega ravnotežja, ki jih izračunamo s pomočjo koeficienta inbridinga (F_{is}) (Mikulíček in sod. 2012). Prav ta odstopanja nam povedo veliko ključnih informacij o dinamiki preučevane populacije in njene ogroženosti, ki nastane lahko tudi kot posledica parjenja v sorodstvu (angl. *inbreeding*). Populacije so v H-W ravnotežju, ko sta H_e in H_o posameznih lokusov enaki (Frankham in sod. 2009).

1.3.3 Koeficient inbridinga (F_{is})

F_{is} je eno od orodij, ki nam omogoča ugotavljanje parjenja v sorodstvu v populacijah, ki so morda nestabilne, predvsem pa majhne. Poda nam verjetnost, da sta dva alela enega lokusa sorodna glede na poreklo, lahko v celotni populaciji ali pa samo pri posamezniku (Neal 2004).

Velikost populacije ima velik vpliv na naključno parjenje znotraj populacije, saj so posamezniki v manjši populaciji bolj sorodni kot osebkovi večjih populacij. Parjenje v sorodstvu ali inbriding je oblika nenaključnega parjenja, pri katerem se parita osebkovi z zelo podobnim genotipom ali fenotipom, posledica tega pa je povišana stopnja homozigotnosti in znižana stopnja heterozigotnosti (Neal 2004). Z zmanjšanjem stopnje heterozigotnosti upade uspešnost populacije, ki je zaradi tega nezmožna prilagoditve na evolucijske spremembe (Frankham in sod. 2009).

1.3.4 Število alelov (NA) in bogastvo alelov (AR)

Bogastvo alelov (AR) in število alelov (NA) opazovanih lokusov med populacijami, sta pomembna označevalca genske variabilnosti. NA opiše polimorfnost lokusov (Mikuliček in sod. 2002), AR pa je povprečno število alelov posameznega lokusa (Maletzky in sod. 2008). Njihova primerjava med populacijami nam razkriva ali so katere izmed njih doživele učinek ozkega grla (angl. *bottleneck*) (Leberg 2002). V bazi podatkov Animal Genetics Training Resource navajajo, da nam AR poleg učinka ozkega grla, izslediti lahko še upad genske variabilnosti z izolacijo ali učinkom ustanovitelja.

Na odnos med velikostjo populacije in bogastvom alelov vpliva polimorfnost lokusov. Pri manj polimorfni lokusih so rezultati AR bolj nepristransko za različne vzorce (populacije), kot pri bolj polimorfni lokusih. Tako na primer učinek ozkega grla proizvede manjše razlike v AR, kot gre za manj polimorfne lokuse (Leberg 2002). Za razliko od heterozigotnosti, ki je prav tako eden izmed pokazateljev ozkega grla, je bogastvo alelov na to nekoliko bolj občutljivo, hkrati pa bolj učinkovito odraža dolgoročni razvojni potencial proučevane populacije (Leberg 2002; Neal 2004).

1.4 Predhodne raziskave genske pestrosti velikega pupka in sorodnih vrst

V preteklih desetih letih so potekale številne raziskave genske pestrosti velikega pupka in drugih vrst iz rodu *Triturus* s pomočjo mikrosatelitnih markerjev (Krupa in sod. (2002), Maletzky in sod. (2008) in Mikuliček in sod. (2012)). Raziskovali so predvsem hibridizacijo, do katere prihaja med tesno sorodnimi vrstami rodu *Triturus*, vendar pridobljeni podatki lahko služijo tudi primerjavi s podatki, pridobljenimi v naši raziskavi (polimorfnost lokusov, AR, obseg velikosti alelov, He, Ho in Fis). Rezultati nekaterih primerjav med našo in drugimi rezultati so prikazani v preglednici 7 (poglavje: Rezultati; Med-populacijska genska struktura).

Krupa in sod. (2002) so razvili parne začetne oligonukleotide (angl. *primer*), za osem polimorfni mikrosatelitni lokusov v *T. cristatus* in ocenjevali njihovo uporabnost v drugih vrstah velikih pupkov. Analizirali so 168 vzorcev DNK sedmih vrst rodu *Triturus* in ugotovili, da je večina lokusov izjemno polimorfna za več kot pol vrst tega rodu. Za vsak

posamezen lokus so izračunali H_e in H_o , izračunali obseg velikosti alelov in njihov vzorec ponavljanja. Razvite začetne oligonukleotide so uporabili v raziskavah, opisanih v nadaljevanju, tudi v naši. V primerjavo smo vključili le šest lokusov, ki smo jih uporabili tudi sami.

Maletzky in sod. (2008) so v svoji raziskavi, poleg drugih ciljev, sledili hibridizaciji med avtohtono vrsto *T. cristatus* in *T. carnifex*, ki je vnesena vrsta JV Bavarske (Nemčija), vendar avtohtona na SZ Avstrije. Raziskovali so hibridne cone (angl. *Hybrid zone*), to so ozka območja, kjer se dva sorodna genotipa ponovno srečata in med seboj parita. Analizirali so 305 vzorcev DNK iz 36 populacij, uporabili 7 mikrosatelitnih lokusov (Krupa in sod. 2002) in dokazali njihovo uporabnost za to vrsto. Za posamezno populacijo so izračunali H_e in H_o , AR, H-W ravnotežje in njegova odstopanja (Fis). Ugotovili so, da so hibridne cone vmesne področja, kjer se frekvence genotipov spreminjajo iz čistega *T. cristatus* v *T. carnifex*, v smeri SZ proti JV. Gre pravzaprav za unimodalna območja, kjer prevladujejo hibridni posamezniki, starševski genotipi pa so na robu te cone.

Mikulíček in sod. (2012) so s svojo raziskavo pojasnili distribucijo treh vrst rodu *Triturus* (*T. cristatus*, *T. dobrogicus* in *T. carnifex*) na območju Češke in Slovaške. S pomočjo mikrosatelitskih in drugih genetskih markerjev so ugotovili obseg hibridizacije v hibridnih conah. Uporabili so 354 vzorcev DNK vseh treh vrst iz 44 populacij in analizirali sedem polimorfni mikrosatelitnih lokusov. Za vsako populacijo so izračunali H_e , H_o , HWE in Fis ter druge parametre. Zaradi izolacije populacij, ki je posledica vse večje fragmentacije okolja, je obseg hibridne cone težko direktno določiti. Odkrili so, da je do hibridizacije *T. carnifex* in *T. dobrogicus* prišlo v Centralni Evropi. Iz dobljenih rezultatov so ugotovili, da v hibridnih conah potekajo dve vrsti pozigotne selekcije (angl. *postzygote selection*). Endogena selekcija določa uspešnost hibridov prek interakcij med geni, ki izvirajo iz različnih vrst, ne upoštevajoč habitata v hibridnem coni. Nasprotno pa je eksogena selekcija določena z okoljsko spremembo in pravi, da je uspešnost hibridov odvisna od vrste habitata, saj genotipi staršev razkrivajo prilagajanje alternativnim ekološkim razmeram.

1.5 Namen dela

Namen zaključne naloge je opraviti preliminarno analizo šestih mikrosatelitnih lokusov na populacijah velikega pupka. Uporabili smo vzorce DNK 135 osebkov velikega pupka, iz petnajstih lokacij z območja JZ Slovenije in hrvaške Istre.

Na podlagi rezultatov bomo ovrednotili uspešnost pomnoževanja mikrosatelitnih lokusov pri raziskovani vrsti. Poleg tega bomo skušali oceniti primernost uporabljenih markerjev v raziskavah genske pestrosti velikega pupka, z namenom ocene varstvenega statusa vrste. Rezultate bomo primerjali s predhodnimi populacijskimi raziskavami pupkov rodu *Triturus*, ki so jih izvedli Krupa in sod. (2002), Maletzky in sod. (2008) ter Mikulíček in sod. (2012).

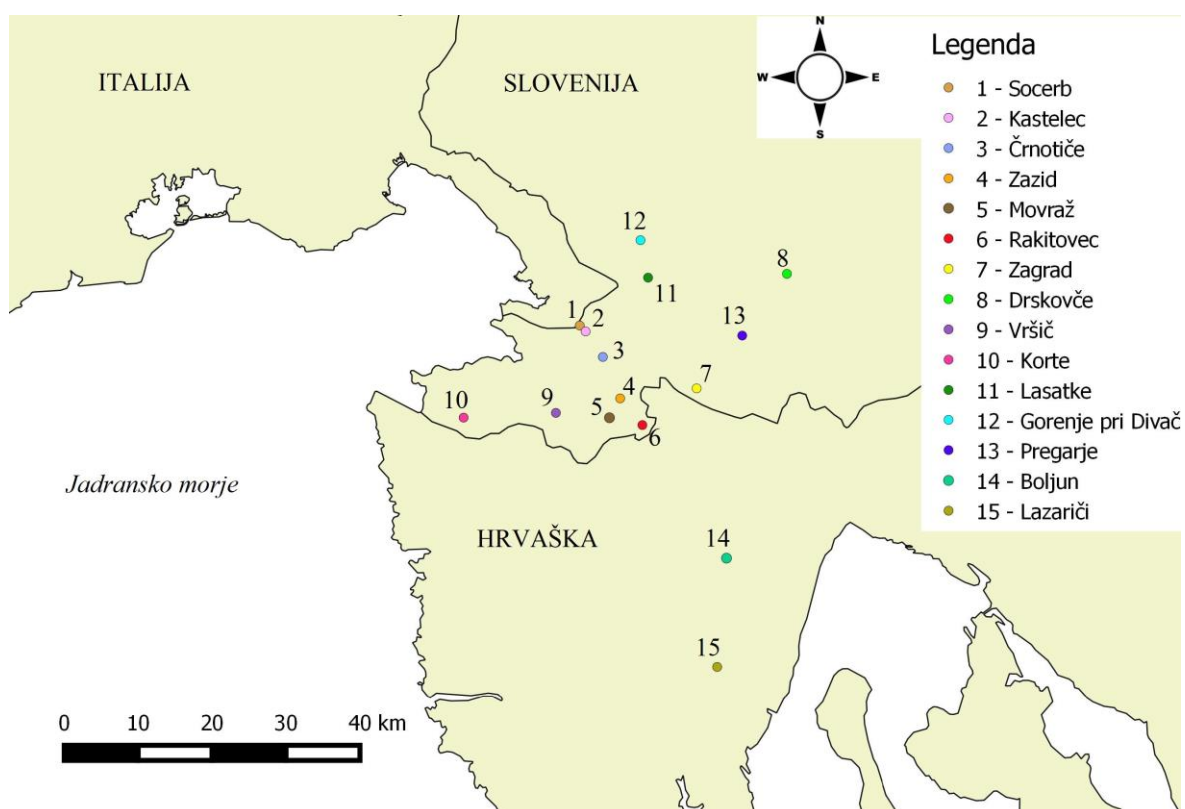
Večina laboratorijskega dela je bila opravljena v letu 2009 v Laboratoriju za molekularno ekologijo, Znanstveno-raziskovalnega središča, Univerze na Primorskem in v laboratoriju Inštituta za biologijo vretenčarjev (Institute of Vertebrate Biology), Studenec, Češka. Pred izvedbo pričujoče zaključne naloge je bila izolirana DNK (Lužnik 2013) in genotipiziranih pet mikrosatelitnih lokusov. V sklopu pričujoče zaključne naloge smo genotipizirali dodaten lokus, analizirali pridobljene elektroferograme vseh šestih lokusov in opravili statistično analizo zbranih podatkov.

2 MATERIALI IN METODE

Analizirali smo 135 vzorcev DNK velikega pupka (*T. carnifex*), ki so bili zbrani v letih od 2006 do 2009. Vzorci DNK so bili predhodno izolirani s pomočjo kompleta (angl. *kit*) QIAamp DNA Mini Kit proizvajalca QIAGEN (Lužnik 2013). Novembra 2013 smo v Laboratoriju za molekularno ekologijo, Znanstveno-raziskovalnega središča, Univerze na Primorskem pomnožili in analizirali mikrosatelitni lokus Tcri35 za vseh 135 vzorcev. Preostali lokusi so bili že predhodno pomnoženi.

2.1 Zbiranje vzorcev

Vzorci so bili pridobljeni na 15 lokacijah v jugozahodni Sloveniji, večinoma na Kraškem robu, nekateri tudi v hrvaški Istri (lokaciji Boljun in Lazarići). Porazdelitev posameznih populacij je prikazana na sliki 4.



Slika 4: Lokacije vzorčenih kalov.

Preglednica 1 prikazuje lokacije in število analiziranih vzorcev posamezne populacije. Število analiziranih vzorcev se med populacijami precej razlikuje, kar lahko vpliva na statistične analize. Vzorci iz Rakitovca (populacija 6) so bili zbrani v treh kalih, vzorci iz Socerba (populacija 1), Kastelca (populacija 2), Črnotič (populacija 3) in Kort (populacija 10) pa iz dveh kalov. Ostali vzorci posameznih populacij so bili zbrani v enem kalu.

Preglednica 1: Število populacij, njihove lokacije in število vzorčenih osebkov posamezne populacije (Lužnik 2013). * - populacije, za katere smo analizirali le en ali dva vzorca. Te populacije smo kasneje izločili iz interpretacije nekaterih rezultatov. ** - vzorčena dva ali več kalov, podane so koordinate le enega kala posamezne lokacije.

Populacija	Lokacija	Koordinate		Št. vzorcev
		x	y	
1.	Socerb**	45,588926	13,859123	16
2.	Kastelec**	45,581808	13,869433	13
3.	Črnotiče**	45,551080	13,899927	21
4.	Zazid	45,500919	13,930886	9
5.	Movraž	45,477152	13,912791	9
6.	Rakitovec**	45,468805	13,969883	26
7.	Zagrad	45,514276	14,063076	9
8.	Drskovče	45,654853	14,217464	5
9.*	Vršič	45,482195	13,820003	1
10.	Korte**	45,474654	13,660436	5
11.*	Lasatke	45,648288	13,976507	1
12.*	Gorenje pri Divači	45,693750	13,962484	2
13.	Pregarje	45,579134	14,140967	4
14.	Boljun	45,308066	14,117968	13
15.*	Lazariči	45,175518	14,103999	1
Skupaj:				135

2.2 Laboratorijsko delo

Uporabili smo šest mikrosatelitnih lokusov, ki so bili dizajnirani za *T. cristatus*. Njihove značilnosti lahko vidimo v preglednici 2, v kateri je prikazano tudi dodano barvilo (NED, FAM, HEX) posameznega lokusa, s katerim vidno razlikujemo lokuse med seboj.

Preglednica 2: Karakterizacije šestih mikrosatelitnih lokusov za *T. carnifex* in *T. cristatus*. Prikazano je ime mikrosatelitnega lokusa, njegov ponovitveni vzorec (Krupa in sod. 2002), začetno oligonukleotidno zaporedje (Krupa in sod. 2002), predvidevana dolžina posameznega lokusa in število prešteti alelov posameznega lokusa. Za vsak lokus Inter* - prekinjen vzorec (angl. *interrupted*). ** - elektroferogram izriše črno obarvan alel.

Ime lokusa	Primer (5' - 3')	Barvilo	Barva	Vzorec	Predv. dolžine	Število alelov
Tcri13	F: GTGATGGTGCCAAGC R: GATCCAAGACACAGAATATTAG	NED	Rumena**	(GT) ₃₆ Inter.*	97 - 138	11
Tcri27	F: GATCCACTATAGTGAAAATAAATAAAG R: CAAGTTAGTATATGATATGCCTTTG	FAM	Modra	(GAAA) ₂₇	173 - 189	2
Tcri29	F: CGAGTTGCCAGACAAG R: GATCACATGCCCATGGA	HEX	Zelena	(TTTC) ₂₂ (CA) ₁₁	244 - 252	2
Tcri35	F: CCAACTGGTATGGCATTG R: GATCACAGAACTCTGAATATAAGC	NED	Rumen**	(GAAA) ₃₂ Inter.*	224 - 304	5
Tcri36	F: GATCATCTGAATCCCTCTG R: ATACATTCATGACGTTTGG	HEX	Zelena	(GAAA) ₃₆ Inter.*	187 - 203	12
Tcri43	F: CTTTCACACCACTGGAGCA R: GTTTCATTAGTCTGGCATTGGCTGC	HEX	Zelena	(GAAA) ₃₀	253 - 320	15

2.2.1 PCR, denaturacija in sekvenčna analiza lokusa Tcri35

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je potekala po naslednjem protokolu, opisanem v Krupa in sod. (2002). Za eno reakcijo smo potrebovali 2,5 µL pufru KAPA 2G Fast HotStart, 1,85 µL destilirane vode (dd H₂O) in 0,15 µL posameznega začetnega oligonukleotida. To je kratka nukleotidna sekvenca, ki se parno povezuje z eno verigo DNK, na kateri encimi DNK polimeraze začnejo sintezo komplementarne verige DNK (Frankham in sod. 2009). Za eno reakcijo smo potrebovali 4,5 µL nastale mešanice, torej 675 µL za 135 vzorcev. Vsakemu vzorcu smo dodali 0,5 µL DNK, da je bil končni volumen posameznega vzorca 5 µL. Tako pripravljene vzorce smo vstavili v ciklični termostat (angl. *thermal cycler*), kjer je PCR potekal po naslednjem protokolu: 15 minut začetne denaturacije na 95 °C za en cikel, naslednjih 35 ciklov reakcije pa 30 sekund na 94 °C, 90 sekund prileganja (angl. *annealing*) na 56 °C, 60 sekund podaljševanja (angl. *elongation*) na 72 °C in končnih 30 minut na 60 °C.

Pred genotipizacijo v sekvenatorju smo naredili še denaturacijo DNK, kar omogoča razpad dvojne vijačnice (Brown 1999). 36,5 µL velikostnega standarda GS500 LIZa (Applied Biosystem) smo zmešali z 1500 µL formamida (Applied Biosystem), ki denaturira nukleinske kisline. Nastalo mešanico smo porazdelili po plošči z ločenimi 96 vdolbinami, kamor smo v vsak vzorec dodali 1 µL pomnožene DNK. Vzorce smo nato pokrili s septo in celotno ploščo postavili v ciklični termostat za 5 minut na 95 °C, kjer je potekal proces denaturacije. Po končani denaturaciji smo vzorce ohladili in kratko centrifugirali. Sledila je genotipizacija vzorcev v sekvenatorju ABI3730XL (Applied Biosystems). V tankih

cevčicah, imenovanih kapilare, poteka elektroforeza, ki omogoči ločevanje DNK fragmentov, glede na njihovo dolžino. Krajši fragmenti potujejo počasneje od daljših in se med seboj ločijo po različnih dolžinah. Ob presvetlitvi z laserjem, na koncu kapilare, oddajo fluorescentno obarvani oligonukleotidi specifično valovno dolžino, ki jo senzor zazna in preko signala sporoči podatke računalniku (Jelenčič 2008). S pomočjo dolžinskega standarda, ki se na elektroferogramu prikaže rdeče obarvan, smo določili dolžine fragmentov.

2.3 Vizualizacija alelov in priprava vhodnih podatkov

Graf, ki nam izriše multialelne lokuse, imenujemo elektroferogram in se v računalnik prenese preko posebnega senzorja, ki zazna svetlobo, oddano od fluorescentno označene DNK (Jelenčič 2008). Mikrosatelitne sekvence smo pregledali v programu GeneMapper (Applied Biosystems), tj. avtomatizirana programska oprema za genotipizacijske analize vizualizacije mikrosatelitov. S pomočjo programa smo preverili uspešnost pomnoževanja posameznega lokusa in alelom določili njihovo velikost, kot je prikazano na sliki 5 (poglavje Rezultati in diskusija). Dobljene vrednosti velikosti alelov smo zaokrožili na cela števila (primer: 288,93 smo zaokrožili na 289), pri manjkajočih podatkih pa smo v preglednico vnesli vrednosti 000. Za program Genetix (Belkhir in sod. 1996) smo morali podatke preurediti, kot je prikazano v preglednici 3. Preglednico smo shranili kot besedilni dokument s končnico *.txt*. Nekaterim vzorcem nismo uspeli pomnožiti določenega lokusa, zato smo kot vhodni podatek zapisali 000 (ali ničelni alel, angl. *null allele*).

Preglednica 3: Primer preurejene preglednice za program Genetix. Prvi stolpec prikazuje pripadnost populaciji, v drugi stolpec je vpisana šifra posameznega vzorca, v naslednjih šestih stolpcih pa so prikazane vrednosti alelov na posameznih lokusih. 000000* - ničelni alel.

Populacija	Šifra vzorca	Velikost lokusov					
		Tcri13	Tcri27	Tcri29	Tcri35	Tcri36	Tcri43
1	1_1_08	097107	189189	244244	000000*	199199	304316
1	1_2_08	097097	173189	252252	280284	195199	269304
1	2_1_08	097107	189189	244244	284288	195199	000000*
2	3_19_06	097097	173173	244244	280280	199199	273284
2	3_20_06	116126	173173	244244	288288	191199	273273
3	4_4_09	099107	189189	244244	288288	199199	000000*

Program Genetix nam je preglednico pretvoril še v druge oblike, ki so ustrezale programu Genepop in FSTAT (npr. v datoteki s končnico *.pop* in končnico *.dat*).

2.4 Statistična obdelava

Za Hardy-Weinbergov test ravnotežja (HWE) smo uporabili Genepop (Rousset 2008), prosto dostopno programska opremo, ki izračuna natančne teste verjetnosti za odklon od H-W ravnotežja (Hered 1995), nastavili smo 1000 ponovitev na serijo. Pretvorjeno preglednico z velikostjo alelov smo vstavili v programsko opremo Genepop, ki nam je rezultate prenesel v HTML obliki.

Fis in heterozigotnost alelov smo izračunali s pomočjo programske opreme Genetix, ki izračuna več osnovnih parametrov populacijske genetike, med njimi tudi Wrightovo F-statistiko, ki smo jo uporabili tudi mi. Omogoča izračun niza parametrov, ki se običajno uporabljajo v študijah populacijske genetike. Pri tem opravi analizo njihove statistične značilnosti (signifikantnosti) z uporabo testov tipa zamenjave (permutacije). Algoritem faktorialne analize korespondence AFC (angl. *factorial correspondence analysis*) v programski opremi Genetix izriše graf oddaljenosti populacijami na podlagi genske variabilnosti (Belkhir in sod. 1996). Izračuna odstotek variacij preko prve, druge, tretje in četrte osi.

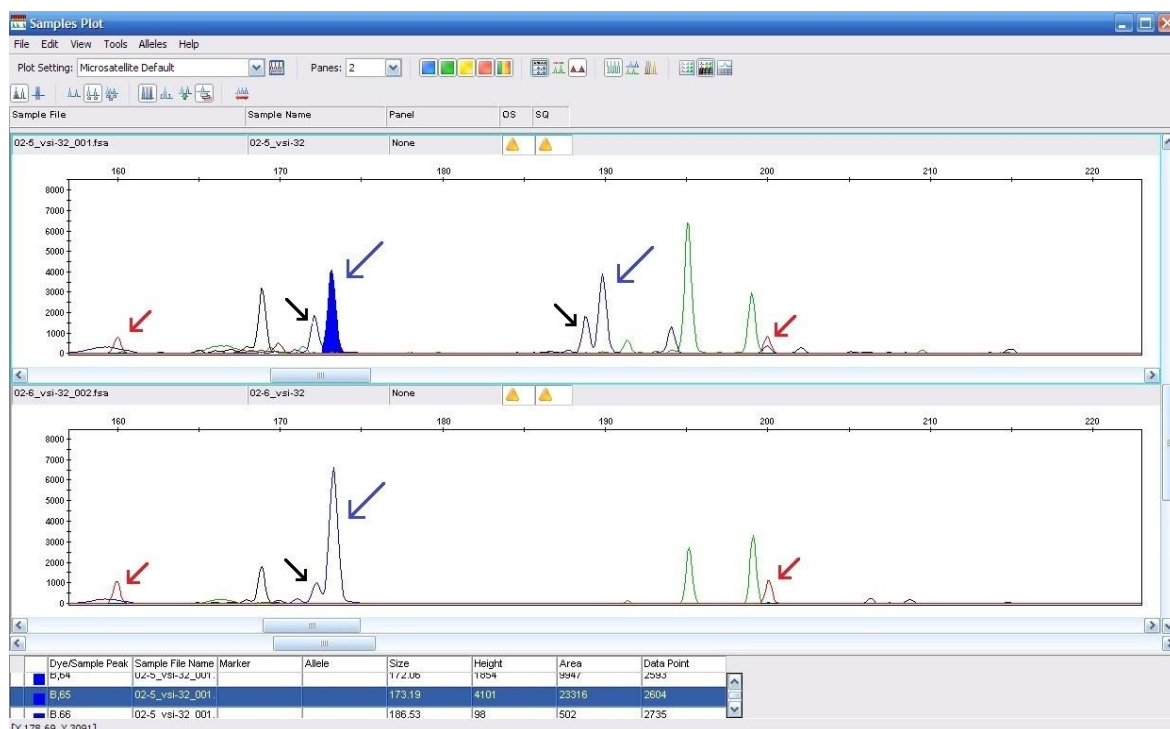
Za število alelov (NA) in bogastvo alelov (AR) smo uporabili programsko opremo FSTAT, ki oceni gensko diverzitetu in diferenciacije kodominantnih genetskih markerjev (Goudet 2001). Tako število kot bogastvo alelov nam povesta raznolikost lokusov, ki je standardizirana za določeno velikost vzorca (Frankham 2009).

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

V populacijah 9 (Vršič), 11 (Lasatke), 12 (Gorenje pri Divači) in 15 (Lazariči) smo analizirali samo en ali dva osebka, zaradi česar smo te populacije iz interpretacije nadaljnjih rezultatov izločili. V preglednicah so te populacije označene z *, prav tako tudi nekateri lokusi, ki so, zaradi neznanim genotipov, izločeni iz interpretacije rezultatov.

3.1 Vizualizacija alelov

V programu GeneMapper smo uspešno vizualizirali alele šestih lokusov pri 135 vzorcih. S pomočjo elektroferograma smo ugotavljali dolžino ter homozigotnost ali heterozigotnost alelov posameznih lokusov. Na zgornjem primeru na sliki 5 vidimo heterozigotni alel na lokusu Tcri27 (modri puščici) z dvema glavnima vrhovoma pri velikosti okoli vrednosti 173 in 189. Spodnji primer na sliki 5 prikazuje homozigotni alel na istem lokusu (modra puščica), saj je le en glavni vrh okoli vrednosti 173.



Slika 5: Primer izrisa elektroferograma dveh osebkov za lokus Tcri27 (moder) in Tcri36 (zelen). Črno obarvan vrh ni bil prepoznan kot alel, saj s svojo obliko in razponom velikosti ni ustrezal nobeni znani vrednosti analiziranih lokusov. Ostali, manjši vrhovi, ne prikazujejo alelov temveč so to aleli zdrsa polimeraze (angl. *stutter peaks*) in so na grafu označeni s črno puščico. Rdeče puščice označujejo velikostni standard (angl. *size standard*). Velikost alelov smo prebrali iz preglednice na dnu slike.

V preglednici 4 so zbrani podatki o številu alelov, ki smo jih zasledili na posameznem lokusu, pri vseh populacijah velikega pupka v naši študiji. Poleg tega je v preglednici predstavljen tudi razpon dolžine zabeleženih alelov, kot je razviden iz naše in drugih raziskav. Prikazani so rezultati za *T. cristatus* (Krupa in sod. (2002)) in *T. carnifex* (Mikulíček in sod. 2012).

Preglednica 4: Primerjava števila opaženih alelov med našimi rezultati, raziskavo Krupa in sod. (2002) ter Mikulíček in sod. (2012). Z odebeljeno pisavo je označeno število prešteti alelov pri posamezni raziskavi, v oklepajih navajamo razpon dolžin v baznih parih. / - ni podatkov za ta lokus.

LOKUS	Tcri13	Tcri27	Tcri29	Tcri35	Tcri36	Tcri43
RAZISKAVA						
Naša raziskava	11 (97–138)	2 (173–189)	2 (244–252)	15 (224–304)	5 (187–203)	12 (253–320)
Krupa in sod. (2002)	4 (114–130)	6 (246–295)	5 (298–330)	5 (185–229)	3 (266–282)	9 (262–298)
Mikulíček in sod. (2012)	9 (80–128)	/	3 (224–348)	11 (184–332)	7 (176–472)	13 (216–508)

Iz preglednice 4 je razvidno, da polimorfnost lokusov precej variira (od 2 do 15), tako v naši, kot v drugih raziskavah. Mikrosatelitna zaporedja, ki smo jih v raziskavi uporabili v *T. carnifex*, so bili razviti in prvotno uporabljeni v *T. cristatus* (Krupa in sod. 2002). Mikulíček in sod. (2012) so v raziskavi uporabili ista mikrosatelitna zaporedja v obeh vrstah, v preglednici 4 pa je število opaženih alelov podano le za *T. carnifex*. Razpon dolžin posameznih lokusov je v njihovi raziskavi podan za vse tri vrste pupkov (*T. carnifex*, *T. cristatus* in *T. dobrogicus*) skupaj. Maletzky in sod. (2008) v svoji raziskavi niso podali rezultatov genotipizacije sedmih mikrosatelitnih lokusov (Krupa in sod., 2002).

3.2 Med-populacijska genska struktura

V preglednici 5 so prikazani rezultati H_e in H_o s standardnimi deviacijami (SD), F_{is} , $H-W$ ravnotežje (HW), NA in AR.

Preglednica 5: Rezultati pričakovane (H_e) in opažene (H_o) heterozigotnosti, Hardy-Weinbergovo ravnotežje (HW), koeficient inbridinga (Fis), število alelov (NA) in bogastvo alelov (AR) posamezne populacije. Visoko značilni (signifikantni) rezultati – odebeljeno; marginalno značilni – poševno; (-) ni rezultatov; * h.sign. – visoko značilen rezultat ($HW < 0.01$).

POPULACIJA	$H_e \pm SD$	$H_o \pm SD$	Fis	HW	NA	AR
1	0,6039 \pm 0,1755	0,6236 \pm 0,2109	0.00302	0,1095	4,67	1,625
2	0,5654 \pm 0,2894	0,4346 \pm 0,3129	0.27374	h.sign.*	4,83	1,590
3	0,5557 \pm 0,2394	0,4649 \pm 0,3129	0.18911	<i>0.0416</i>	5,50	1,571
4	0,5391 \pm 0,2725	0,4444 \pm 0,3063	0.23200	0.1630	4,50	1,571
5	0,5237 \pm 0,2444	0,5185 \pm 0,2598	0.06861	0.3330	4,17	1,555
6	0,6507 \pm 0,1669	0,5128 \pm 0,1986	0.23081	h.sign.*	7,33	1,664
7	0,6746 \pm 0,2038	0,5688 \pm 0,2847	0.22523	0.0042	5,33	1,723
8	0,6300 \pm 0,1763	0,7667 \pm 0,2338	-0.10843	0,8386	3,83	1,703
9*	0,3333 \pm 0,5164	0,6667 \pm 0,5164	-	-	1,67	1,667
10	0,5069 \pm 0,3441	0,4500 \pm 0,2345	0.23040	0,3713	4,00	1,567
11*	0,3333 \pm 0,5164	0,6667 \pm 0,5164	-	-	1,67	1,667
12*	0,4583 \pm 0,3600	0,5833 \pm 0,3764	0.06667	0,9032	2,50	1,661
13	0,5446 \pm 0,2688	0,5694 \pm 0,2495	0.10870	0,5864	3,33	1,633
14	0,7470 \pm 0,1424	0,5456 \pm 0,2660	0.31080	0,4974	7,50	1,781
15*	0,1667 \pm 0,2582	0,3333 \pm 0,5164	-	-	1,33	1,333

Statistično značilne (signifikantne) populacije so populacija 2, 6 in 7, marginalno značilna pa je še populacija 3. Njihove vrednosti HW so manjše od 0,05, kar bi lahko nakazovalo na inbriding. V raziskavi Maletzky in sod. (2008) so bile 3 populacije statistično značilne (bile so v H-W ravnotežju). Fis prikazuje odstopanja od H-W ravnotežja, pozitivne vrednosti predstavljajo primanjkljaj heterozigotnosti, negativne vrednosti pa njeno porast. Iz preglednice je razvidno, da je porast heterozigotnosti značilna le za populacijo 8 (Fis = -0,10843), največji primanjkljaj pa je značilen za populacijo 14 (Fis = 0,31080). Mikulíček in sod. (2012) so izračunali signifikantni primanjkljaj heterozigotov v dveh populacij, v raziskavi Maletzky in sod. (2008) pa je bil primanjkljaj heterozigotov značilen za 10 populacij (signifikantna je tudi alohtona populacija *T. carnifex*).

H_e je v vseh populacij, razen ene (populacij 8), višja od H_o . Vrednosti H_e se gibljejo med 0,51 in 0,75, s povprečjem 0,59. Vrednosti H_o posameznih populacij se gibljejo med 0,44 in 0,77, s povprečjem 0,54. Povprečne vrednosti heterozigotnosti so najnižje v populaciji 10 ($H_o = 0,45$; $H_e = 0,51$), najvišje pa v populaciji 8 ($H_o = 0,77$; $H_e = 0,63$), kot je prikazano na sliki 6. Vrednosti H_e v raziskavi Maletzky in sod. (2008) so znašale med 0,28 in 0,75, z povprečjem 0,56. Vrednosti H_o so znašale med 0,17 in 0,77, s povprečjem 0,48. Mikulíček in sod. (2012) so v svoji raziskavi izračunali vrednosti povprečne pričakovane in opažene heterozigotnosti ($H_e = 0,65$, $H_o = 0,61$). Nekoliko nižje povprečne vrednosti so izračunali Krupa in sod. (2002) ($H_e = 0,51$, $H_o = 0,47$).

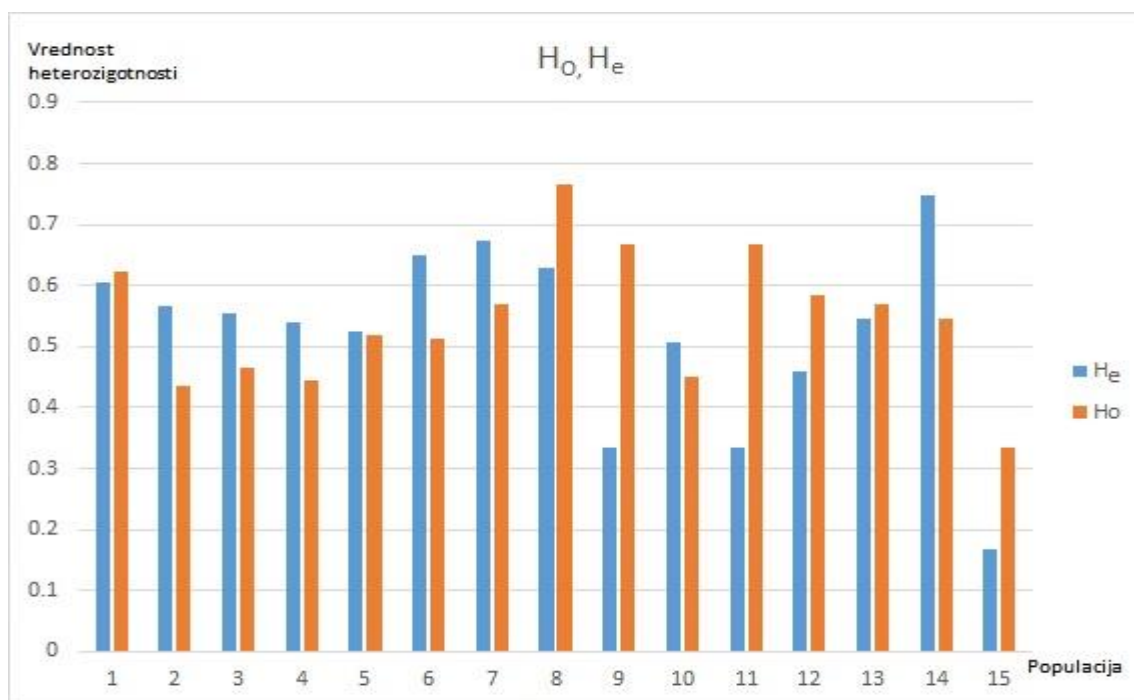
V preglednici 6 so prikazani rezultati točne ocene H-W testa po metodi Markove verige (angl. *Exact values by the Markov chain method*) za posamezni lokus vsake populacije. Trije lokusi so statistično značilni (Tcri13, Tcri35 in Tcri36), njihova vrednost je manjša od vrednosti 0,05, eden izmed razlogov za to je lahko tudi inbriding, vendar gre v našem primeru za primanjkljaj vhodnih podatkov. Lokusa Tcri27 in Tcri29 sta zaradi manjkajočih vrednosti iz interpretacije izločena.

Preglednica 6: Hardy-Weinbergov test ravnotežja za posamezen lokus in populacijo. Statistično značilni (signifikantni) rezultati so odebeljeni, ** h.sign. – visoka statistična značilnost ($HW < 0.01$), * - izločeni rezultati.

Lokusi Populacija	Tcri13	Tcri27*	Tcri29*	Tcri35	Tcri36	Tcri43
1	0,2238	0,3131	0,0553	0,0656	0,4415	0,9907
2	0,4630	0,1201	0,0907	0,0000	1,0000	0,1252
3	0,9101	0,5778	0,0059	0,1483	1,0000	0,0431
4	1,0000	-	0,5365	0,0674	0,0306	0,7369
5	0,9298	1,0000	0,1777	0,0131	1,0000	0,5394
6	0,1596	0,0013	0,0024	0,0171	0,0000	0,2736
7	0,0048	0,4416	0,0045	0,0587	1,0000	1,0000
8	0,4496	1,0000	0,3142	1,0000	0,2413	0,6950
9*	-	-	-	-	-	-
10	0,7948	-	-	0,1253	1,0000	0,1560
11*	-	-	-	-	-	-
12*	1,0000	-	-	0,3330	-	1,0000
13	0,1224	-	1,0000	0,1388	1,0000	1,0000
14	0,0002	0,0014	0,0047	0,2927	0,1076	0,1209
15*	-	-	-	-	-	-
Skupaj	0,0104	0,0032	0,0000	H.Sign.**	H. Sign.**	0,4864

Preglednica 7: Primerjava He in Ho med našo in raziskavo Krupa in sod. (2002) za *T. cristatus*, Maletzky in sod. (2008) za *T. cristatus* in *T. carnifex*, in Mikuliček in sod. (2012) za *T. cristatus*. Primerjava AR med našo in Maletzky in sod. (2008) ter Fis med raziskavami. + - rezultati znani; / - analiza ni bila opravljena.

Raziskava	Parametri	Povprečna He	Povprečna Ho	AR	Fis	H-W
Naša raziskava		0,59	0,54	1,62	+	+
Krupa in sod. (2002)		0,51	0,47	/	/	/
Maletzky in sod. (2008)		0,56	0,48	2,39	+	+
Mikuliček in sod. (2012)		0,68	0,57	/	+	



Slika 6: Pričakovana (H_e) in opažena (H_o) heterozigotnost po populacijah. Spodnja koordinata – populacije; zgornja koordinata – vrednosti heterozigotnosti.

V preglednici 8 je prikazan NA posameznega lokusa vsake populacije, ki jih je prepoznala programska oprema FSTAT. Najmanj alelov je bilo registriranih na lokusu Tcri27 (4) in Tcri29 (6), največ pa na lokusu Tcri36 (25).

Do razlike v celokupnem številu alelov med rezultati v preglednici 4 in 7 pride zaradi drugačne obravnave alelov v programu FSTAT. Ta zaznava kombinacije alelov in zato poda v resnici število opazovanih genotipov, ki je večje kot samo število alelov (Goudet 2001). Poleg resničnih alelov, so bili v vhodnih podatkih zabeleženi tudi ničelni aleli, ki jih program FSTAT obravnava kot prave alele. Ničelni aleli vplivajo na izračun primanjkljaja ali viška heterozigotnosti, zaradi česar bi morali lokuse z velikim številom ničelnih alelov iz analize odstraniti (Jehle in sod. 2005a).

Preglednica 8: Število alelov (NA), vzorčenih na posameznem lokusu v vsaki populaciji.

Lokus	Tcri 13	Tcri 27	Tcri29	Tcri 35	Tcri 36	Tcri 43
Populacija						
1	3	2	2	10	3	10
2	6	2	2	8	3	9
3	10	2	2	9	3	12
4	6	2	3	7	2	9
5	5	2	2	8	2	7
6	7	2	2	9	3	11
7	5	2	2	7	3	11
8	7	2	2	4	3	4
9*	2	2	2	2	1	1
10	6	2	2	6	3	5
11*	2	2	1	2	1	2
12*	3	2	2	4	1	3
13	5	2	2	4	2	5
14	5	2	2	9	5	10
15*	2	1	2	1	1	1
Vsi aleli	16	4	6	19	25	12

AR posameznega lokusa v vsaki populaciji je prikazano v preglednici 9. Vrednosti AR so med 1,111 in 1,950, z najnižjo povprečno vrednostjo 1,432 na lokusu Tcri27 in največjo povprečno vrednostjo 1,892 na lokusu Tcri43.

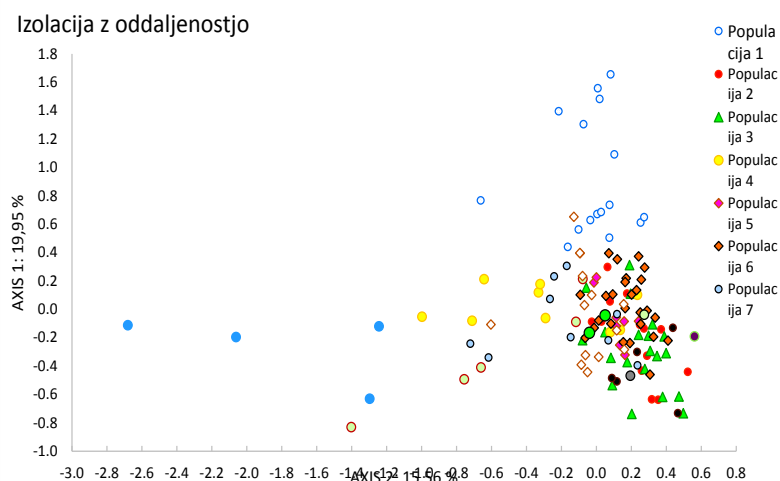
Leberg (2002) je v raziskavi »*Bogastvo alelov v različno velikih populacijah*« ugotovil, da se vrednosti AR manj polimorfni lokusov gibljejo med 1,50 (pri majhnem vzorcu) in 2,10 (pri velikem vzorcu), kadar populacija ni doživela učinka ozkega grla. V primeru ozkega grla se vrednosti AR gibljejo med 1,50 (majhen vzorec) in 1,75 (velik vzorec). Pri bolj polimorfni lokusih se vrednosti AR gibljejo med 3,3 (majhen vzorec) in 7,0 (velik vzorec), če populacija ni doživela učinka ozkega grla oz. med 2,5 (majhen vzorec) in 3,0 (velik vzorec), če je populacija že doživela učinek ozkega grla enkrat ali večkrat. Tako nivo polimorfizma vpliva na razmerje med številom osebkov in AR, učinek ozkega grla povzroči manjše razlike v AR, ko je polimorfizem lokusa nizek.

Kaže, da gre pri naši raziskavi za manj polimorfne lokuse, vendar zaradi prekrivanja vrednosti AR, ne moremo sklepati o morebitnem preteklem ozkem grlu. Rezultati so lahko pristranski, saj iz analize nismo izločili manjkajočih genotipov (ničelnih alelov). Vrednosti AR v raziskavi Maletzky in sod. (2008) so bile med 1,69 in 2,95, eden izmed razlogov za takšno razliko med rezultati je, da so v raziskavi poleg *T. carnifex* vzorčili še *T. cristatus*.

Preglednica 9: Bogastvo alelov (AR) lokusov v posamezni populaciji.

Lokus	Tcri 13	Tcri 27	Tcri29	Tcri 35	Tcri 36	Tcri 43
Populacija						
1	1,542	1,514	1,508	1,880	1,486	1,846
2	1,837	1,212	1,391	1,879	1,397	1,837
3	1,768	1,396	1,316	1,830	1,354	1,846
4	1,758	1,111	1,451	1,895	1,503	1,810
5	1,752	1,294	1,294	1,745	1,425	1,830
6	1,804	1,419	1,483	1,758	1,377	1,842
7	1,739	1,366	1,440	1,950	1,569	1,924
8	1,911	1,467	1,571	1,800	1,622	1,778
9*	2,000	2,000	2,000	1,000	1,000	2,000
10	1,844	1,200	1,200	1,893	1,378	1,889
11*	2,000	2,000	1,000	2,000	1,000	2,000
12*	1,833	1,500	1,500	1,833	1,000	2,000
13	1,893	1,250	1,533	1,893	1,429	1,800
14	1,766	1,148	1,443	1,884	1,683	1,822
15*	2,000	1,000	2,000	1,000	1,000	1,000
Skupaj	1,850	1,432	1,500	1,839	1,495	1,892

Slika 7 prikazuje faktorialno analizo korespondence AFC, to je faktorski prikaz razporeditve vzorcev glede na genetsko variabilnost. Razporeditev prikazuje preko prve osi, ki nam pojasni 19,95 % variacije in druge osi, ki pojasni 15,56 % variacije. Skupno tako pojasnita 35,5 % variacije med vzorci. Iz slike je razvidno, da večina vzorcev velikega pupka, ki smo jih prvotno razdelili glede na raziskane kale, pripada eni sami večji populaciji velikega pupka. Nekatere populacije izstopajo, med njimi najbolj populacija 13 (kal v Pregarjah), nekoliko manj pa še populacija 1 (Socerb), 4 (Zazid) in populacija 8 (Drskovče). Prva os ločuje populacijo 1 od celotne populacije, druga os pa populacijo 13, nekoliko manj pa še populacijo 4 in 8. Za populaciji v Pregarjah in Drskovčah bi lahko predpostavili, da se od ostalih razlikujeta zaradi večje oddaljenosti. Kljub temu pa ne moremo zanemariti dejstva, da je lahko ta razlika tudi rezultat pomanjkljivih vhodnih podatkov.



Slika 7: Faktorski prikaz distribucije populacij preko prve in druge osi..

Preliminarno analizo šestih mikrosatelitnih lokusov nam je razkrila izjemno polimorfnost nekaterih lokusov velikega pupka, njihova uporabnost je primerna za populacijske in genetske študije, kot so pretok genov med populacijami. Pristranske ocene nam v največji meri podajajo ničelni aleli, saj jih programi prepoznajo kot posamezne alele, s katerimi tvorijo kombinacije s pravimi aleli. Takšne alele je potrebno iz analize odstraniti. Velikost populacij je pomemben parameter genetskih analiz, večje število vzorčenih osebkov populacije nam omogoča širši vpogled v celoten genetski bazen. V nadaljnjih analizah je potrebno populacije s premajhnim številom vzorčenih osebkov (populacija 9, 11, 12 in 15) izločiti ali pa narediti ponovno vzorčenje izbranih kalov.

Predhodne analize, omenjene v pričujoči raziskavi, niso analizirali vseh enakih parametrov, zaradi česar podatki niso direktno primerljivi. Poudariti moramo, da so bile v drugih raziskavah analizirane poleg *T. carnifex* še druge vrste (*T. cristatus*, *T. dobrogicus*).

4 ZAKLJUČEK

Obravnavali smo vzorce petnajstih populacij velikega pupka (*T. carnifex*), na območju Kraškega roba, slovenske in hrvaške Istre. Naredili smo preliminarno analizo in statistično obdelavo šestih mikrosatelitnih lokusov, vendar smo zaradi premajhnega števila vzorčenih osebkov populacije 9 (Vršič), 11 (Lasatke), 12 (Gorenje pri Divači) in 15 (Lazariči) izključili iz obravnave končnih rezultatov.

Potrdili smo, da so uporabljeni mikrosatelitni lokusi primerni za raziskave genske pestrosti populacij velikega pupka na izbranem območju. Število vseh prebranih alelov šestih lokusov je bilo 47, kar znaša 7,83 alelov na lokus, z najvišjim številom alelov (15) na lokusu Tcri43 in najnižjim številom alelov (2) na lokusu Tcri27 in Tcri29.

Odstopanje od H-W ravnotežja je bilo statistično značilno (signifikantno) v štirih populacijah: populacija 2 (Kastelec), 3 (Črnotiče), 6 (Rakitovec) in 7 (Zagrad). Koeficient inbridinga (F_{is}) prikazuje bodisi višek heterozigotnosti (negativne vrednosti), bodisi primanjkljaj heterozigotnosti (pozitivne vrednosti). Višek heterozigotnosti smo ugotovili le v populaciji 8 ($F_{is} = -0,10843$), izrazito pomanjkanje heterozigotnosti pa v populaciji 14 ($0,31080$). Povprečna vrednost H_e znaša 0,59, povprečna H_o pa znaša 0,54. Vrednosti H_e so večinoma višje od vrednosti H_o . NA med posameznimi lokusi je bilo precej različno, z največjim številom alelov na lokusu Tcri36 (25) in najmanjšim številom alelov na lokusu Tcri27 (4) in Tcri29 (6).

Krupa in sod. (2002) so v raziskavi razvili osem polimorfnih lokusov, uporabnost so ugotavljali tudi za druge sorodne vrste. Uporabni lokusi v *T. carnifex* so Tcri35, Tcri36, Tcri43 in Tcri46, pogojno uporabni pa še Tcri13, Tcri27, Tcri29 in Tcri32 (sekvence so pomnožene, vendar je polimorfizem teh lokusov neznan). V primerjavo smo vključili le tiste lokuse, ki so jih uporabili tudi v naši raziskavi. Polimorfnost lokusov je visoka, vendar so vrednosti njihovih rezultatov nekoliko nižje od naših in od vrednosti Mikulička in sod. (2012). Povprečno število alelov je 5,33 alelov na lokus, z najvišjim številom alelov na lokusu Tcri43 (9) in najnižjim številom alelov (3) na lokusu Tcri36. Tudi povprečni H_e in H_o sta nekoliko nižji od naših rezultatov ($H_e = 0,51$, $H_o = 0,47$).

Mikuliček in sod. (2012) so v raziskavi potrdili uporabnost šestih polimorfnih mikrosatelitnih lokusih (Krupa in sod. 2002) v *T. carnifex*. Ugotovili so povprečno 8,2 alelov na posamezen lokus, z najvišjim številom alelov na lokusu Tcri43 (13) in najnižjim številom alelov na lokusu Tcri29 (3). Le dva lokusa (Tcri13 in Tcri36) sta pokazala presežek heterozigotov, kar je posledica prisotnosti ničelnih alelov. Povprečna H_e in povprečna H_o sta precej višji kot v naši raziskavi in v raziskavi Krupe in sod. (2002) ($H_e =$

0,65, $H_o = 0,61$). Primanjkljaj heterozigotov je bil značilen v treh populacijah v hibridnih conah med *T. cristatus* in *T. carnifex*.

Maletzky in sod. (2008) so v raziskavi ugotovili, da je primanjkljaj heterozigotov značilen za tri lokuse (Tcri32, Tcri35 in Tcri46). Vrednosti povprečne H_e in H_o za 35 populacij (eno so izločili) so bile podobne našim vrednosti ($H_e = 0,56$, $H_o = 0,48$), nekoliko bolj pa odstopajo od rezultatov raziskave Mikuliček in sod. (2012) in rezultatov raziskave Krupa in sod. (2002). Fis vrednosti so razkrile primanjkljaj heterozigotov v desetih populacijah, 3 populacije so bile H-W ravnotežju, za štiri populacije pa je bil značilen višek heterozigotov.

Bogastvo alelov (AR) je bilo v vseh populacijah zelo nizko, z najmanjšo vrednostjo (1,432) na lokusu Tcri27 in največjo vrednostjo (1,892) na lokusu Tcri43. Vrednosti AR v raziskavi Maletzkyja in sod. (2008) so bile med 1,69 in 2,95, eden izmed razlogov za takšno razliko med našimi in njihovimi rezultati je, da so v Maletzky in sod. (2008) v raziskavi poleg *T. carnifex* vzorčili še *T. cristatus*.

Faktorski prikaz razporeditve vzorcev glede na genetsko variabilnost nam je razkril, da populacije, ki smo jih ločili glede na raziskovani kal, večinoma pripadajo eni sami večji populaciji velikega pupka. Iz grafa je razvidno, da le populacija 13 (Pregarje, 4 osebki) izstopa iz skupne populacije preko druge osi. Nekoliko manj izstopajo še populacije 4 (Zazid, 9 osebkov), 8 (Drskovče, 5 osebkov) in 1 (Socerb, 16 osebkov).

Razlogi za nekatere pristranske rezultate, kot je bogastvo alelov, so v največji meri posledica neznanih genotipov in posledično primanjkljaja vnosnih podatkov. Programi statistične analize zaznajo ničelne alele kot prave alele in z njimi ustvarjajo kombinacije z ostalimi pravimi aleli. Vpliv ima tudi neenakomerna velikost populacij, še posebej takrat, ko sta v populaciji vzorčena le eden ali dva osebka. Na podlagi naših rezultatov je težko direktno napovedovati usodo vrste, saj so za opredelitev varstvenega statusa potrebna, številčnejša vzorčenja populacij velikega pupka na Kraškem robu.

Za nadaljnje študije priporočamo ponovno vzorčenje nekaterih izbranih kalov Kraškega roba (populacija 9 (Vršič), 11 (Lasatke), 12 (Gorenje pri Divači) in 15 (Lazariči)) ter ponovna genotipizacija nekaterih mikrosatelitnih lokusov (Tcri27 in Tcri29), kjer so rezultati nekoliko pristranski zaradi pomanjkanja vhodnih podatkov.

5 VIRI IN LITERATURA

AGTR, Animal genetics training resource. agtr.ilri.cgiar.org. (datum dostopa: 30.6.2014).

Antonio Romano, Jan Willem Arntzen, Mathieu Denoël, Robert Jehle, Franco Andreone, Brandon Anthony, Benedikt Schmidt, Wiesiek Babik, Robert Schabetsberger, Milan Vogrin, Miklós Puky, Petros Lymberakis, Jelka Crnobrnja Isailovic, Rastko Ajtic, Claudia Corti 2009. *Triturus carnifex*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. www.iucnredlist.org (datum dostopa: 20 junij 2013).

Applied Biosystem 2008. Quick Reference Guide. GeneMapper® ID-X Software Mixture Analysis Tool. Version 1.1.

Arntzen J.W., Wallis G.P. 1999. Geographic variation and taxonomy of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies): morphological and mitochondrial DNA data. *Contributions to Zoology* 68: 181–203.

Arntzen J.W. 2007. The phylogeny of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies): nuclear and mitochondrial genetic characters suggest a hard polytomy, in line with the paleogeography of the centre of origin. *Contributions to Zoology* 76 (4): 261–278.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2004 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Benny Trapp Fotografie. www.fototrapp.de (datum dostopa: 14 julij 2014).

Brown T.A. 1999. *Genomes*. Oxford, Bios scientific publishers Ltd.

Cipot M., Govedič M., Lešnik A., Pobiljšaj K., Skaberne B., Sopotnik M., Stanković D. 2011. Vzpostavitev monitoringa velikega pupka (*Triturus carnifex*), 56 str., pril. Ministrstvo za okolje in prostor, Ljubljana.

Cochran M.D. 1969. Repati krkoni ali repatci, pupki in močeradi – družina *Salamandridae*. V: dr. Polenec A. (Ed.) *Mladinska knjiga Dvoživke – ilustrirana enciklopedija živali*. Doubleday and Company, Inc. New York: 16–31.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature* 5: 435–446.

Frankham R., Ballou J.D., Brisco D.A. 2009. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge, Cambridge University Press.

Goudet J. 2001. Fstat (version 2.9.3.2.): A program to estimate and test the gene diversities and fixation indices. Lausanne University, Lausanne, Switzerland.

Hardy-Weinberg Equilibrium Model. anthro.palomar.edu/synthetic/ (datum dostopa: 2. junij 2014).

Hered J. 2013. Computer notes. The journal of heredity: 248–249

Jehle R., Wilson G. A., Arntzen J. W., Burke T. 2005a. Contemporary gene flow and the spatio-temporal genetic structure of subdivided newt populations (*Triturus cristatus*, *T. marmoratus*). Evolutionary Biology 18: 619–628.

Jehle R., Arntzen J.W., Burke T. 2005b. Delineating fine-scale genetic units in amphibians: Probing the primacy of ponds. Conservation Genetics: 6:227–234.

Jehle R., Thiesmeier B., Foster J. 2011. The crested newt – a dwindling pond-dweller. Bielefeld, Laurenti.

Jelenčič M. 2008. Genetska pestrost rjavega medveda (*Ursus arctos*) v Sloveniji. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani.

Krupa A.P., Jehle R., Dawson D.A., Gentle L.K., Gibbs M., Arntzen J.W., Burke T. 2002. Geographic variation and taxonomy of crested newts (*Triturus cristatus superspecies*): morphological and mitochondrial DNA data. Conservation Genetics 3: 87–89.

Leberg P.L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. Molecular Ecology 11: 2445–2449.

Lužnik M. 2013. Ohranitveni status velikega (*Triturus carnifex*) in navadnega pupka (*Lissotriton vulgaris*) v sistemu izoliranih kraških vodnih teles. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani.

Maletzky A., Mikulíček P., Franzen M., Goldschmid A., Gruber H.J., Horák A., Kyek M. 2008. Hybridization and introgression between two species of crested newts (*Triturus cristatus* and *T. carnifex*) along contact zones in Germany and Austria: morphological and molecular data. Herpetological journal 18: 1–15.

Mikulíček P., Horák A., Zavadil V., Kautman J., Piálek J. 2012. Hybridization between three Crested Newt species (*Triturus cristatus superspecies*) in the Czech Republic and

Slovakia: comparison of nuclear markers and mitochondrial DNA. *Folia Zoologica* – 61 (3–4): 202–218.

Neal D. 2004. *Introduction to Population Biology*. Cambridge, University Press.

Poboljšaj K., Lešnik A. 2003. Strokovna izhodišča za vzpostavljanje omrežja Natura 2000: Dvoživke (Amphibia) (končno poročilo). Naročnik: MOPE, ARSO, Ljubljana. Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju. 144 str., digitalne priloge.

Poboljšaj K., Šalamun A., Trčak B., Cipot M. 2007. Življenje v kalu (ekologija in biologija kalov). V: Maher I. *Okrogla voda, priročnik o kalih*. Zavod RS za varstvo narave, Ljubljana: 45–100.

Poboljšaj K., Lešnik A. 2011. Strokovna izhodišča za vzpostavljanje omrežja Natura 2000: Dvoživke (Amphibia) (končno poročilo). Naročnik: MOPE, ARSO, Ljubljana. Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju. 144 str., digitalne priloge.

Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst na rdeči seznam. 2002. Ur.l. RS 12(82) 8994-8975

Prirodoslovni muzej Slovenij. www.pms-lj.si (datum dostopa: 20. junij 2014)

Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.

Stanković D., Delić T. 2012. Morphological evidence for the presence of the Danube Crested Newt, *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu, 1903), in Slovenia. *Natura Sloveniae* 14(1): 23-29

Uredba o zavarovanju ogroženih živalskih vrst. 1993. (Ur. l. RS 3(57): 2851-2854.

Wiens J.J., sparreboom M. in Arntzen J.W. 2011. Crest evolution in newts: implications for reconstruction methods, sexual selection, phenotypic plasticity and the origin of novelties. *Journal of Evolutionary Biology* 24 (2007): 2073–2086