

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

UGOTAVLJANJE GENETSKE STRUKTURIRANOSTI  
POPULACIJ OZKO ENDEMIČNE TOMMASINIJEVE  
POPKORESE (*Moehringia tommasinii* March.) S  
POMOČJO PRSTNIH ODTISOV DNA

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Ugotavljanje genetske strukturiranosti populacij ozko endemične  
Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii* March.) s pomočjo  
prstnih odtisov DNA**

(In search for the genetic structure of stenoendemic *Moehringia tommasinii* March.  
populations by means of DNA fingerprinting)

Ime in priimek: Nataša Fujs

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentor: doc. dr. Boštjan Surina

Koper, september 2015

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Nataša FUJS

Naslov magistrskega dela: Ugotavljanje genetske strukturiranosti populacij ozko endemične Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii* March.) s pomočjo prstnih odtisov DNA

Kraj: Koper

Leto: 2015

Število listov: 95      Število slik: 18      Število preglednic: 11

Število prilog: 3      Število strani prilog: 7

Število referenc: 113

Menotr: doc. dr. Boštjan Surina

UDK: 575.17(043.2)

Ključne besede: Tommasinijeva popkoresa / *Moehringia tommasinii* March. / populacijska struktura / prstni odtisi DNA / AFLP / razmerje P/O

Izvleček:

Tommasinijeva popkoresa (*Moehringia tommasinii* March.) je ozko endemična vrsta severne Istre in jo najdemo v skalnih razpokah previsnih apnenčastih sten Kraškega roba, kjer je zaščiten pred neposrednim dežjem in vetrom. Večina populacij je majhnih, v Sloveniji je na rdečem seznamu opredeljena kot redka. Vzorce *M. tommasinii* smo nabrali na petih nahajališčih in s pomočjo DNA prstnih odtisov določili populacijsko strukturo. Določili smo razmerje P/O, s katerim smo dobili vpogled v način njenega razmnoževanja. Za primerjavo razmerja P/O smo si izbrali ožje sorodno vrsto mahovne popkorese (*M. muscosa* L.). Znotraj vrste *M. tommasinii* je prisotna populacijska struktura z relativno nizko genetsko raznolikostjo posameznih populacij. Na podlagi razmerja števila pelodnih zrn/jajčnih celic smo opredelili vrsti *M. tommasinii* in *M. muscosa* kot fakultativno avtogamni vrsti.

## Key word documentation

Name and SURNAME: Nataša FUJS

Title of master thesis: In search for the genetic structure of stenoendemic *Moehringia tommasinii* March. populations by means of DNA fingerprinting

Place: Koper

Year: 2015

Number of pages: 95

Number of figures: 18

Number of tables: 11

Number of appendix: 3

Number of appendix pages: 7

Number of references: 113

Mentor: Assist. Prof. Boštjan Surina, PhD

UDC: 575.17(043.2)

Keywords: Tommasini's sandwort / *Moehringia tommasinii* March. / population structure / DNA fingerprinting / AFLP / P/O ratio

Abstract:

Tommasini's sandwort (*Moehringia tommasinii* March.) is a narrow endemic species of the North Istria and is found in rocky crevices and cracks on overhanging calcareous cliffs of Karst edge, where it is protected from direct rain and wind. Most of the populations are small, in Slovenia's red list of threatened species *M. tommasinii* is listed as rare. Samples of *M. tommasinii* were collected in five localities and were used in determining the population structuring based on DNA fingerprinting. We defined P/O ratio and used it for estimation of its breeding system. We compared P/O ratio to the one obtained from closely related mossy sandwort (*M. muscosa* L.). Population structure appears to be present in *M. tommasinii* with populations having relatively low genetic diversity. Based on pollen/ovule ratio we identified *M. tommasinii* and *M. muscosa* as facultatively xenogamous.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Boštjanu Surina za vso pomoč, usmerjanje in strokovne nasvete pri izdelavi magistrskega dela in navsezadnje za poučne in zanimive študijske ure v predavalnici ter na terenu.

Zahvaljujem se mag. Živi Fišer Pečnikar za vso pomoč in nasvete pri izdelavi magistrskega dela, hvala za vso pomoč pri laboratorijskem delu in izdelavi celotne magistrske naloge ter hvala za vso spodbudo tekom celega študija.

Zahvaljujem se Petru Glasnoviću za vso pomoč pri terenskemu delu, iskanju literature in izdelavi karte genetske raznolikosti populacij.

Zahvaljujem se doc. dr. Juretu Jugovicu za pomoč pri razumevanju obdelave podatkov v programu SPSS.

Zahvaljujem se prijateljici Tjaši Zagoršek za pomoč pri terenskem delu, saj si popestrila vsako terensko urico, hvala za vso spodbudo, podporo, smeh in druženje tekom celega študija. Hvala tudi Mitju Črnetu in ostalim za družbo pri terenskem delu.

Navsezadnje se zahvaljujem svoji družini in partnerju za vso spodbudo in podporo v času študija.

## Kazalo vsebine

<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Rod <i>Moehringia</i> L. ....	2
1.1.1 Družina Caryophyllaceae .....	2
1.1.2 Morfološke značilnosti rodu <i>Moehringia</i> L. ....	2
1.1.3 Habitat in razširjenost rodu .....	3
1.1.4 Sistematika in klasifikacija.....	5
1.2 Popkorese v Sloveniji .....	7
1.3 <i>Moehringia tommasinii</i> March. ....	8
1.3.1 Morfološke značilnosti.....	8
1.3.2 Razmnoževanje .....	11
1.3.3 Habitat in razširjenost.....	12
1.3.4 Ogroženost in zavarovanost .....	16
1.4 DNA prstni odtisi za uporabo v populacijski študiji.....	18
1.5 Razmerje števila pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O) v povezavi z razmnoževalnim sistemom .....	22
<b>2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE</b> .....	<b>24</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>25</b>
3.1 Vzorčenje Tommasinijeve in mahovne popkorese .....	25
3.2 Populacijska študija na podlagi polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP) .....	27
3.2.1 Izolacija DNA .....	27
3.2.2 Merjenje koncentracij DNA s pomočjo spektrofotometra .....	27
3.2.3 Genotipizacija s pomočjo metode AFLP – polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov .....	28
3.2.4 Obdelava podatkov.....	32
3.3 Razmerje števila pelodnih zrn in jajčnih celic .....	37
3.3.1 Priprava vzorcev ter štetje jajčnih celic in pelodnih zrn .....	37
3.3.2 Statistična obdelava podatkov v programu IBM SPSS Statistics 20 .....	38
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>39</b>
4.1 AFLP analiza .....	39
4.2 Število pelodnih zrn, jajčnih celic in razmerje števila pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O).....	49
<b>5 DISKUSIJA</b> .....	<b>55</b>
<b>6 ZAKLJUČEK</b> .....	<b>62</b>
<b>7 LITERATURA</b> .....	<b>64</b>

## Kazalo preglednic

<b>Preglednica 1:</b> Lokacije s pripadajočimi koordinatami, kjer smo nabirali rastlinski material. Za vsako lokacijo je pripisan tip študije, kjer smo uporabili rastlinski material: AFLP za populacijsko študijo s pomočjo metode polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov ter P/O za ugotavljanje razmerja peloda in jajčnih celic.....	25
<b>Preglednica 2:</b> Temperaturni profil PCR za preamplifikacijo in selektivno amplifikacijo.....	29
<b>Preglednica 3:</b> Seznam začetnih oligonukleotidov s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem, uporabljenih v posameznih korakih AFLP .....	31
<b>Preglednica 4:</b> Parametri opisne statistike posameznih populacij: Shannonov indeks raznolikosti, število vseh lokusov, odstotek polimorfnihih lokusov ter število lokalno pogostih in privatnih lokusov. ....	40
<b>Preglednica 5:</b> Podatki v preglednici levo spodaj predstavljajo Nei-jevo genetsko razdaljo med pari populacij Tommasinijeve popkorese. Desno zgoraj so predstavljene parne $\Phi_{PT}$ vrednosti za ugotavljanje genetske diferenciacije med populacijami, pridobljene z analizo molekularne variance (AMOVA).....	42
<b>Preglednica 6:</b> Analiza molekularne variance - df (stopinje prostosti), SS (vsota kvadratov), MS (srednji kvadrat) Est. Var. (ocena genetske variance), % (odstotek variance). Vrednosti so statistično značilne, $p = 0.001$ . ....	42
<b>Preglednica 7:</b> Filogenetska raznolikost, izračunana na podlagi nekoreninjenega drevesa.....	48
<b>Preglednica 8:</b> Povprečje ( $\bar{x}$ ) števila pelodnih zrn, jajčnih celic in mediana (Me) razmerja P/O pri posameznih populacijah in pri vrstah <i>M. tommasinii</i> in <i>M. muscosa</i> . Podana je standardna deviacija (SD) ter minimalna in maksimalna vrednost znotraj populacije. ....	49
<b>Preglednica 9:</b> Enosmerni test analize variance (ANOVA) med populacijami/vrstama glede na število pelodnih zrn, jajčnih celic in razmerja P/O. Podani so vir variabilnosti, SS (vsota kvadratov), df (stopinje prostosti), MS (srednji kvadrat/varianca), F (razmerje med varianco med skupinami in varianco znotraj skupin) in $p$ vrednost (za statistično značilne razlike). ...	52
<b>Preglednica 10:</b> Določitev statistično značilno različnih populacij vrste <i>M. tommasinii</i> glede na razmerje P/O ( $p < 0,05$ ). Izvedena POST HOC testa Scheffe in Bonferronii prikazujeta $p$ vrednosti za statistično značilno razlikovanje med populacijami vrste <i>M. tommasinii</i> . Zgoraj desno so prikazane $p$ vrednosti testa Scheffe, spodaj levo pa $p$ vrednosti testa Bonferroni. .	53

<b>Preglednica 11:</b> Enosmerni test analize variance (ANOVA) med vrstama glede na površino polprašnic. Podani so vir variabilnosti, SS (vsota kvadratov), df (stopinje prostosti), MS (srednji kvadra), F (razmerje med varianco med skupinami in varianco znotraj skupin) in $p$ vrednost (za statistično značilne razlike).....	53
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----



## Kazalo slik

<b>Slika 1:</b> Stolpec A prikazuje obliko semena, stolpec B celični vzorec semenske ovojnice in stolpec C obliko strofiola. A1 – C1: <i>Moehringia minutiflora</i> z amorfnim tipom strofiola (merilo: A1, C1 = 0,1 mm, B1 = 10 µm). A2 – C2: <i>M. jankae</i> s papilarnim tipom strofiola (merilo: A2 = 0,5 mm, B2, C2 = 0,1 mm). A3 – C3: <i>M. muscosa</i> z dežnikastim tipom strofiola (merilo: A3 = 1 mm, B3 = 0,01 mm, C3 = 0,1 mm). A4 – C4: <i>M. tommasinii</i> z meduzno-hifnim tipom strofiola (merilo: A4 = 1 mm, B4 = 0,01 mm, C4 = 0,5 mm) (prevzeto iz Minuto in sod. 2006).....	4
<b>Slika 2:</b> Primerjava listnih ploskev in mesnatosti listov pri nekaterih vrstah popkores (prevzeto iz Merxmüller in Grau 1967).....	9
<b>Slika 3:</b> Primerjava semen pri petih ožje sorodnih vrstah popkores (a) <i>M. papulosa</i> , (b) <i>M. tommasinii</i> , (c) <i>M. provincialis</i> , (d) <i>M. bavarica</i> , (e) <i>M. muscosa</i> (Merxmüller in Grau 1967). .....	10
<b>Slika 4:</b> Zemljevid Kraškega roba z nahajališči vrste <i>M. tommasinii</i> (rdeče točke), od severa proti jugu si sledijo nahajališča: dolina Glinščice (ITA), Osp, Črni kal in Podpeč (SLO) ter Istrske toplice (HRV). Označeno je tudi nahajališče (modra točka) pri Nugli, kjer Pospichal (1897-1899) navaja prisotnost Tommasinijeve popkorese, vendar nahajališča v novjšem času niso potrdili (prevzeto iz Martini 1990). .....	13
<b>Slika 5:</b> Razdelitev Osapske udornice na posamezne dele: A, B in C (privzeto po Galičič in Skok 2005).....	16
<b>Slika 6:</b> Shematski prikaz korakov tehnike AFLP: korak 1 prikazuje restrikcijo, korak 2 ligacijo, korak 3 preamplifikacijo in korak 4 selektivno amplifikacijo (Meudt in Clarke 2007). .....	20
<b>Slika 7:</b> Stene šestih lokacij, kjer smo nabrali vzorce Tommasinijeve popkorese ( <i>Moehringia tommasinii</i> ): Osp (A), Črni Kal (B), dolina Glinščice (C), Podpeč (D), nad zdraviliščnimi objekti v Istrskih toplicah (E) in Istrske toplice na levem bregu reke Mirne (F). .....	26
<b>Slika 8:</b> Mreža hemocitometra (Neubauer Improved) ter označeni kvadrati (1-8), kjer smo šteli pelodna zrna.....	37
<b>Slika 9:</b> Analiza glavnih koordinat, s katero razlagamo genetsko variabilnost med vzorci petih populacij Tommasinijeve popkorese ( <i>Moehringia tommasinii</i> ). Prva os razloži 53,68 % genetske variabilnosti, druga os 19,33 % . .....	39
<b>Slika 10:</b> Prikaz Shannonovega indeksa raznolikosti posameznih populacij Tommasinijeve popkorese ( <i>Moehringia tommasinii</i> ) .....	41

- Slika 11:** Rezultati Mantel testa kažejo na statistično značilno pozitivno korelacijo med genetsko diferenciacijo ( $\Phi_{PT}$ ) in geografsko razdaljo ( $r_{xy} = 0.919$ ,  $p = 0.05$ ) vzorčnih populacij Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii*)..... 43
- Slika 12:** Strukturiranost populacije Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii*), prikazana za vsak možen  $K = 2-5$ ; populacije so označene z GL (Glinščica), OSP (Osp), CK (Črni Kal), PP (Podpeč) in IT (Istrske toplice). Levo: strukturiranost populacij na podlagi programa BAPS 6, kjer je najbolj verjeten  $K=3$  in je z modro označena populacija IT, zeleno PP, CK in OSP ter z rdečo GL. Desno: strukturiranost populacij na podlagi rezultatov programa STRUCTURE, kjer je najbolj verjeten  $K=2$  in je z modro označena populacija IT in z rumeno GL, OSP, CK IN PP. .... 44
- Slika 13:** Voronoiev diagram, pridobljen s programom BAPS 6, ki prikazuje pripadnost vzorcev posameznim populacijam. Populaciji GL (rdeča) je genetsko najbolj podoben del populacije CK, prav tako obarvan rdeče. Slovenske populacije (zeleno) se razlikujejo od GL in IT (modra) ..... 45
- Slika 14:** Voronoiev diagram, izrisan s programom Barrier vs. 2.2., kamor sta vrisani dve potencialni barieri (a in b), pridobljeni na podlagi matrik genetskih razdalj in rezultatov AMOVA. Primarna je bariera (a), ki nakazuje potencialno izolacijo med populacijo IT ter ostalimi, medtem ko je bariera (b) sekundarna in ima nekoliko manjši pomen pri opredelitvi potencialne izolacije med populacijami GL in ostalimi. .... 46
- Slika 15:** Nekoreninjeno drevo (NeighbourNet). Prikazana je genetska podobnost med vzorci populacij Tommasinijeve popkorese: Istrske toplie (IT; rumena), Podpeč (PP; zelena), Črni Kal (CK; modra), Osp (OSP; oranžna) in Glinščica (GL; rdeča). Z rdečo so pripisane vrednosti metode vezenja (ang. *bootstrapping*), večje od 70..... 47
- Slika 16:** Razmerje P/O desetih populacij: štiri populacije vrste *M. muscosa* (modra) in šest populacij *M. tommasinii* (rdeča), znotraj okvira je s črno črto označena mediana (2. kvartil). Prisotne so tri izstopajoče vrednosti (ang. outliers) pri vzorcih GL 3 MT, CK 12 MT in PP 8 MT..... 50
- Slika 17:** Razmerje P/O pri vsaki vrsti posebej. Z rdečo je obarvan okvir (med 1. in 3. kvartilom) Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii*), z modro okvir mahovne popkorese (*M. muscosa*). Prikazana je mediana (820 in 656) in ena izstopajoča vrednost (ang. outlier) – vzorec RK 14 MM..... 51
- Slika 18:** Primerjava velikosti polprašnic ( $\text{mm}^2$ ) med Tommasinijevo (*Moehringia tommasinii*) in mahovno popkoreso (*M. muscosa*). Z rdečo je obarvan okvir (med 1. in 3. kvartilom) Tommasinijeve, z modro pa okvir mahovne popkorese..... 54

## Kazalo prilog

**Priloga A:** Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov (1/0) za kombinacijo *Pst*I-AGA-6-FAM + *Mse*I-CAG; v vrsticah so predstavljeni posamezni vzorci, v stolpcih pa prisotnost oz. odsotnost posameznega lokusa podane dolžine.

**Priloga B:** Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov (1/0) za kombinacijo *Pst*I-ACA-6-FAM + *Mse*I-CAG; v vrsticah so predstavljeni posamezni vzorci, v stolpcih pa prisotnost oz. odsotnost posameznega lokusa podane dolžine.

**Priloga C:** Cvetovi (vzorci), nabrani na posameznih lokacijah, kjer smo za vsak cvet ugotovili pripadajoče število prašnikov, število jajčnih celic in pelodnih zrn ter razmerje P/O.

## Seznam kratic

<b>AFLP</b>	polimorfizem dolžin namnoženih fragmentov (ang. <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>AMOVA</b>	analiza molekularne variance
<b>ang.</b>	angleško
<b>ANOVA</b>	analiza variance
<b>ATP</b>	adenozin trifosfat
<b>bp</b>	bazni par
<b>CTAB</b>	cetil trimetil amonijev bromid
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>dNTP</b>	deoksinukleotid trifosfat
<b>EDTA</b>	etilendiamintetraocetna kislina
<b>ISSR</b>	preproste ponovitve sekvenc (ang. <i>Inter Simple Sequence Repeats</i> )
<b>ITS</b>	del jedrne ribosomalne transkripcijske enote (ang. <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
<b>IUCN</b>	Svetovna zveza za varstvo narave (ang. <i>International Union for Conservation of Nature</i> )
<b>K</b>	skupina / klaster (ang. <i>Cluster</i> )
<b>MCMC</b>	Markova veriga Monte Carlo (ang. <i>Markov Chain Monte Carlo</i> )
<b>Me</b>	mediana
<b>PCoA</b>	analiza glavnih koordinat (ang. <i>Principal Coordinate Analysis</i> )
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>POO</b>	posebno ohranitveno območje
<b>pSCI</b>	predlagano posebno varstveno območje (ang. <i>Proposed Sites of Community Importance</i> )
<b>P/O</b>	razmerje peloda in jajčnih celic (ang. <i>Pollen/Ovule ratio</i> )
<b>RAPD</b>	naključno namnožena polimorfna DNA (ang. <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> )
<b>RFLP</b>	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (ang. <i>Random Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>rpm</b>	obratov na minuto (ang. <i>Rotations per minute</i> )
<b>r<sub>xy</sub></b>	Pearsonov koeficient korelacije
<b>SE</b>	standardna napaka (ang. <i>Standard Error</i> )
<b>SEM</b>	vrstični elektronski mikroskop (ang. <i>Scanning Electron Microscope</i> )
<b>SD</b>	standardna deviacija (ang. <i>Standard Deviation</i> )

<b>SNP</b>	polimorfizem posameznega nukleotida (ang. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>TBE</b>	Tris-borat-EDTA

## Slovarček

<b>avtogamija</b>	samopraševanje
<b>bootstrapping</b>	metoda vezanja, metoda ocenjevanja kvalitete filogenetskih dreves
<b>diaspora</b>	razmnoževalna enota rastlin; sestavlja jo seme in katerokoli dodatno tkivo, ki pripomore k razširjanju (npr. elajosom ali plod)
<b>ex situ</b>	nasprotno <i>in situ</i> - na mestu; izven mesta pojavljanja (ang. <i>off-site</i> )
<b>genotipizacija</b>	proces določanja razlik med genotipi posameznikov
<b>hazmofit</b>	rastlina, ki uspeva v skalnih razpokah
<b>hilum</b>	brazgotina na semenski ovojnici, kjer je bilo seme pritrjeno na steno plodnice ali pa na funikel (ki povezuje seme s plodnico)
<b>kleistogamija</b>	samopraševanje znotraj samega cveta, ko je le-ta še zaprt
<b>ksenogamija</b>	navzkrižno opraševanje med posameznimi osebki istega taksona
<b>polimorfizem</b>	prisotnost dveh ali več različnih fenotipov znotraj populacije; v genetiki opisuje prisotnost dveh ali več alelov enega gena na določenem lokusu znotraj genskega sklada populacije
<b>simpatrija</b>	dva taksona sta simpatrična, ko se vsaj del njunih arealov prekriva in prihaja do medsebojnih stikov znotraj skupnega areala
<b>stenoendemit</b>	endemit z zelo ozko razširjenostjo
<b>strofiol</b>	semenski privesek
<b>(sub)sesilni listi</b>	listi brez listnega peclja, ki so neposredno pritrjeni na steblo
<b>tipska vrsta</b>	vrsta, na podlagi katere je bil rod prvič opisan

## 1 UVOD

Na stičišču dveh geološko in podnebno različnih pokrajin apnenčaste Kraške planote in flišnate istrske pokrajine, kot 'stopnica' med dvema pokrajinama, izstopa Kraški rob. Kraški rob predstavlja ostro geološko, geomorfološko in podnebno mejo ter ohranja bogato in pestro floro obeh pokrajin in nudi zatočišče nekaterim vrstam, ki so svoje prebivališče našle le v stenah in previsih Kraškega roba (Kaligarič 1992).

Kraški rob gosti bogato floro z redkimi in zavarovanimi vrstami, med katerimi je verjetno najbolj znana Tommasinijeva popkoresa (*Moehringia tommasinii* March.). Magistrsko delo smo posvetili raziskovanju populacijske strukture in razmnoževalega sistema Tommasinijeve popkorese, znamenite endemične vrste Kraškega roba. Znanje o Tommasinijevi popkoresi je še vedno dokaj skromno, veliko je še nejasnega kar zadeva njene biologije in razlogov za njeno ozko razširjenost.

Najprej sem se odpravila poiskati popkoreso na vsa ostenja, kjer je znano njeno pojavljanje. Kot prvo sem obiskala stene nad vasjo Osp. Po kratkem sprehodu mimo pravega zimzelenega sredozemskega gozdička sem prispela pod vznožje Osapske udornice. Že prvi pogled nam prikaže veličasten razgled na visoke dvigajoče se stene, kjer od vznožja pa vse do vrha stene kraljujejo viseče blazinice Tommasinijeve popkorese. Ta čudovita, drobnocvetna rastlina dobro kljubuje na prvi pogled ostrim in oteženim okoljskim razmeram, kjer bi pričakovali težje življenjske razmere zaradi mrzle burje, pomanjkanje vode in hranil ter skalnate podlage z malo prsti. Vendar pa je popkoresa na take razmere dobro prilagojena kar kaže njeno bogato razraščanje in stabilnost populacije na vseh območjih pojavljanja. Na nekaterih predelih uspevajo bolj gosto, saj iz stenskih razpok visijo tudi do 0,5 m dolge viseče blazinice. Dostop do blazinic popkorese je na skoraj vseh mestih preprost – do sten so večinoma speljane poti, z izjemo stene na levem bregu reke Mirne v Istrskih toplicah na Hrvaškem. Ko sem prispela do vznožja, se je vrh ostenja lesketal v soncu, kamor me je pot vodila skozi težko prehoden gozdiček, poln navadne lobodike. Po premagani strmini se skozi rob gozdička le prikaže ostenje z rastlinami Tommasinijeve popkorese, kjer se le-te bujno in na gosto razraščajo.

## 1.1 Rod *Moehringia* L.

### 1.1.1 Družina Caryophyllaceae

Rod popkores (*Moehringia* L.) uvrščamo v družino klinčnic (Caryophyllaceae) in poddružino Alsinoideae. Družino sestavlja več kot 80 rodov in 2100 vrst, ki se najpogosteje pojavljajo v območjih z zmernim in hladnejšim podnebjem, predvsem v zmernih predelih hribovitega sveta (Bittrich 1993, Sambamurty 2005). Nekateri rodovi imajo cirkumglobalno razširjenost. Kljub številčnejšemu pojavljanju v holarktični regiji se vrste iz družine klinčnic pogosto pojavljajo tudi v območju Sredozemlja in v Iransko-Turanski regiji, kjer se nahaja kar 54 od 86 rodov (Bittrich 1993).

Družino klinčnic lahko sistematsko razdelimo v poddružine Alsinoideae, Paronychioideae in Caryophylloideae. Znotraj poddružine Alsinoideae se poleg 10 drugih rodov pojavlja tudi rod *Moehringia* (Sambamurty 2005). Poddružini Alsinoideae in Caryophylloideae sta kar nekaj časa veljali za monofiletski skupini (Bittrich 1993). Šele nedavno sta Greenberg in Donoghue (2011) ovrгла njun monofiletski status. Prepoznala sta novo, večjo kladu z imenom Plurcaryophyllaceae, ki združuje vse predstavnike poddružin Alsinoideae in Caryophylloideae in eno od štirih vej poddružine Paronychioideae.

### 1.1.2 Morfološke značilnosti rodu *Moehringia* L.

Rod popkores obsega 28 vrst enoletnih do večletnih zelišč, ki imajo pogosto blazinasto rast. Steblo je pokončno, vzpenjajoče, včasih viseče ali plazeče. Listi so celi, nasprotno nameščeni, z majhnimi in tankimi dlačicami ali brez, prilisti manjkajo. Spodnji listi so ovalni, suličasti, linearni ali eliptični ter bolj ali manj mesnati. Ostali listi so tanki, ploščati, zgornji pa lahko (sub)sesilni (Hind 1988, Merxmüller in Grau 1967). Cvetovi so lahko posamični ali združeni v ovršno ali pakobulasto socvetje. Čašnih listov je štiri ali pet, število pa lahko variira znotraj osebka ali med posameznimi rastlinami znotraj iste populacije. Venčni listi so beli, običajno isto števniki kot čašni (možne so redukcije). Nektarji se nahajajo na prašnikih, ki so nameščeni nasproti venčnim listom (antisepalni). Prašnikov je večinoma dvakrat toliko kot venčnih listov, čeprav so včasih nekateri lahko reducirani ali sterilni. Pestič ima dva ali tri vratove. Plodnica je enopredalasta. Plod je glavica, ki se z zobci odpre skoraj do baze, tako da se semena prosto raztresejo po tleh. Ovoj semena je črne ali temno rjave barve, sijoč in gladek, redko grob s celičastim vzorcem. Hilum prekriva mesnati semenski privesek, imenovan strofiol (Hind 1988). Že Merxmüller in Gutermann (1957) ter Merxmüller in Grau (1967) so pisali o pomembnosti strofiola za sistematiko popkores, saj je njegova oblika vrstno –specifična (Merxmüller in



Gutermann 1957). Barva strofiola lahko pri herbariziranem materialu variira, zato ne predstavlja zanesljiv taksonomski znak. Vendar pa Hind (1988) navaja, da značilnosti semen pri popkoresah niso vedno najboljše razlikovalni znaki med vrstami in da se je njihovi uporabi pri ločevanju vrst (ne pa rodov!) bolje izogibati. Pomembnost strofiola pri popkoresah kot razlikovalni znak so večkrat potrdili ostali raziskovalci in je v uporabi še danes (Fenzl 1833, cit. po Hind 1988; Hayek 1902, Sauer 1959, Merxmüller in Grau 1967, Hind 1988, Minuto in sod. 2006). Strofiol velja kot sinonim za elajosom - oljnat izrastek, ki pripomore k disperziji semen s pomočjo mravelj (mirmekohorija) (Bhatnagar in Johri 1972).

### 1.1.3 Habitat in razširjenost rodu

Popkorese večinoma uspevajo na apnenčasti podlagi. Veliko vrst uspeva v skalnih in zidnih razpokah ter na meliščih. Manj je vrst, ki uspevajo v okolju z večjo količino organsko bogate prsti (npr. *M. trinervia*) (Hind 1988).

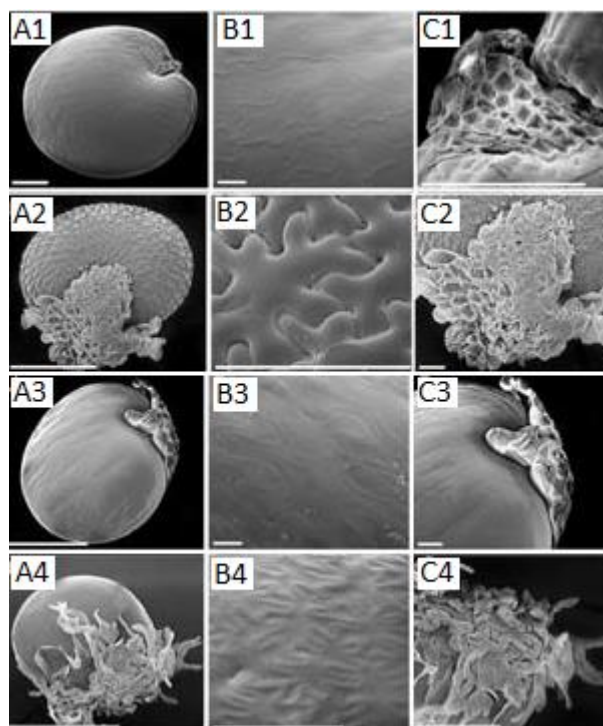
Večinoma so omejene na zmerni pas severne poloble, največ vrst se pojavlja severno od Sredozemlja na območju Alp. Vrste se pojavljajo tudi izven Evrope: *M. glochidisperma* J.M.Monts. v Maroku, v Severni Ameriki vrsti *M. lateriflora* (L.) Fenzl in *M. macrophylla* (Hook.) Fenzl ter v Aziji vrste *M. lateriflora* (L.) Fenzl, *M. trinervia* (L.) Clairv in *M. umbrosa* (Bunge) Fenzl (Jalas in Suominen 1983). Obstajajo štiri območja speciacije popkores: Iberski in Balkanski polotok, Francosko-Italijanska veriga Alp ter Severna Amerika (Hind 1988).

Znotraj rodu *Moehringia* so številne vrste ozko razširjene, včasih celo točkasto. Izrazito ozko razširjena popkoresa, ki se pojavlja v Sloveniji, je npr. kratkodlakava popkoresa (*Moehringia villosa* Wulfen), endemit Julijskih Alp (Daksobler 2004, Surina 2007). Nasprotno pa imajo nekatere popkorese velik areal, kot na primer trižilna popkoresa (*M. trinervia*), ki je razširjena skoraj po vsej Evropi, delu Azije in Severni Ameriki ter mahovna popkoresa (*M. muscosa* L.), ki uspeva po hribovitem svetu srednje in južne Evrope (Jalas in Suominen 1983, Hind 1988).

#### 1.1.3.1 Mehanizmi razširjanja

Plod popkores je glavica. Semena so črne barve s svetlečo površino, izjemo predstavljajo siva semena nekaterih vzhodnobalkanskih in iberskih vrst (Hind 1988). So polkrožne oblike s centralno nameščenim hilumom. Ovojnica semen ima tri tipe celičnih vzorcev,

velika večina vrst (22 vrst) ima vzorec kot seme vrste *M. muscosa* (Slika 1 – oznaka B3; Minuto in sod. 2006).



**Slika 1:** Stolpec A prikazuje obliko semena, stolpec B celični vzorec semenske ovojnice in stolpec C obliko strofiola. A1 – C1: *Moehringia minutiflora* z amorfnim tipom strofiola (merilo: A1, C1 = 0,1 mm, B1 = 10  $\mu$ m). A2 – C2: *M. jankae* s papilarnim tipom strofiola (merilo: A2 = 0,5 mm, B2, C2 = 0,1 mm). A3 – C3: *M. muscosa* z dežnikastim tipom strofiola (merilo: A3 = 1 mm, B3 = 0,01 mm, C3 = 0,1 mm). A4 – C4: *M. tommasinii* z meduzno-hifnim tipom strofiola (merilo: A4 = 1 mm, B4 = 0,01 mm, C4 = 0,5 mm) (prevzeto iz Minuto in sod. 2006).

Strofiol je produkt modificiranih celic, ki izraščajo okoli hiluma semena. Poznamo štiri oblike strofiolov: amorfne, papilarne, dežnikaste in meduzasto-hifne (Minuto in sod. 2006, Slika 1 – oznaka C1-C4).

Ker nekatere rastline rastejo na rastiščih z velikim naklonom, širjenje vrste v višje ležeče predele ne bi bilo mogoče, če bi semena padla na tla le s pomočjo gravitacije. Zato Hind (1988) navaja aktiven prenos semen (mirmekohorija) kot najverjetnejšo razlago razširjanja semen. Vektor prenosa semen pri popkoresah so mravlje. Mravlje so prisotne v skoraj vseh habitatih, kjer se pojavljajo popkorese (Hind 1988, Casazza in sod. 2008). Na nekaterih rastiščih vrste *M. trinervia*, Casazza in sod. 2008 v *in-situ* opazovanjih sicer niso zabeležili prisotnosti mravelj, medtem ko Heinken in Raudnitschka (2002) navajata, da so eni izmed prenašalcev semen pri vrsti *M. trinervia* divji prašiči, ki semena raznašajo z endozoohorijo (seme zaužijejo in ga drugje izločijo).

Strofiol oz. elajosom igra vlogo pri disperziji semen. Splošno elajosomi vsebujejo lipide (maščobno kislino, 1,2-diolein in triolein) z nekaj škroba, beljakovin, vitaminov in ogljikovih hidratov (Sheridan in sod. 1996). S hranili bogat elajosom predstavlja vir hrane za mravlje (Hind 1988, Sheridan in sod. 1996, Casazza in sod. 2008). Manjši elajosomi (kot na primer pri vrsti *M. muscosa* L.) imajo manjšo vsebnost maščob kakor večji elajosomi, s katerimi se mravlje intenzivneje prehranjujejo (npr. pri vrstah, ki živijo na kamniti podlagi ali v skalnih razpokah: *M. tommasinii* March., *M. sedoides* (Pers.) Loisel., *M. lebrunii* Merxm.). Mravlje pojedjo elajosom, seme pa zavržejo izven mravljišča ali pa v galerije v gnezdu (Gómez in Espadler 1988). Obseg disperzije oz. razdalja prenosa semena je odvisen predvsem od gostote in razporeditve mravljišč v prostoru (Casazza in sod. 2008). Celotno diasporo (seme in elajosom) odnesejo v gnezdo ali njegovo bližino, kjer je zaradi večje vsebnosti hranil v tleh, teme in lociranosti pod zemljo verjetnost vzklitja večja. Prav tako je opažena večja kalitev semena, ko je elajosom že odstranjen (Casazza in sod. 2008).

Hind (1988) omenja tudi možnost prenosa z drugimi vektorji, na primer s pajki. Ko se semena iztrosijo iz glavice, naj bi se ujela v pajkove mreže med rastlinami. Ko pajki očistijo mrežo in odstranijo odvečni detrit, naj bi med drugim v razpoke v stenah odstranili tudi semena iz mreže.

#### 1.1.4 Sistematika in klasifikacija

Rod *Moehringia* je taksonomsko težaven že desetletja. Zaradi visokega deleža endemičnih vrst, ki so si med seboj pogosto morfološko zelo podobne, in precejšnje znotrajvrstne variabilnosti, sta bili taksonomska identifikacija in razširjenost posameznih vrst dolgo nejasni in neenotni. K nejasni identifikaciji vrst so pripomogli napačno določen herbarijski material, križanje med posameznimi vrstami in variacije med cvetnimi deli (Hind 1988).

Carl Linnaeus (1753) je v knjigi *Species plantarum* opredelil rod *Moehringia* in opisal prvo izmed vrst popkores - mahovno popkoreso (*Moehringia muscosa* L.). Neyman (1878) je v *Conspectus Florae Europae* opredelil popkorese kot samostojen rod in navedel že do takrat opisanih 15 vrst ter je predstavil klasifikacijo rodu na tri sekcije: *Latifoliae*, *Diversifoliae* in *Angustifoliae*. McNeill (1962) je dodal novo, četrto sekcijo *Pseudomoehringia*, ki vključuje vrste Iberskega polotoka, katerih elajosomi in oblika semen odstopajo od ostalih in so bolj podobni tistim iz rodu *Arenaria* (McNeill 1962, cit. po Hind 1988). Fior in Karis (2007) sta raziskala filogenetske odnose znotraj rodu *Moehringia*. Ločitev med posameznimi linijami je dokaj težka, saj so si vrste genetsko dokaj sorodne kljub precejšnjim morfološkim razlikam. Iberske taksone popkores - sekcija *Pseudomoehringia* sta združila skupaj s peščenkami (rod *Arenaria*) v posebno klado (Fior in Karis 2007). Že McNeill navaja morfološko razlikovanje sekcije *Pseudomoehringia* od

rodu popkores in jih pripisuje bližje peščenkam. Struktura elajosomov (kot ključna značilnost razlikovanja popkores) je pri *Moehringia* sect. *Pseudomoehringia* drugačna kot pri ostalih vrstah popkores (McNeill 1962, cit. po Hind 1988; Fior in Karis 2007). Ostale vrste rodu (izjema je sekcija *Pseudomoehringia*) tvorijo monofiletsko skupino. Od nekoč prepoznanih 32 vrst popkores jih danes v rod *Moehringia* uvrščamo le 28, saj so Fior in Karis (2007) ter Greenberg in Donoghue (2011) štirim iberskim vrstam iz sekcije *Pseudomoehringia* pripisali pripadnost rodu *Arenaria*.

## 1.2 Popkorese v Sloveniji

Balkanski polotok, podobno kakor drugi refugiji v Evropi, gosti veliko število endemičnih vrst, ocena števila endemičnih taksonov pa naj bi se gibala okoli 2600-2700 (Stevanović in sod. 2007). Balkanski polotok je poleg Iberskega polotoka in Alp eden izmed treh centrov speciacije popkores v Evropi. Rod popkores je šel po zadnji ledeni dobi skozi obsežno in nenadno post-glacialno speciacijo z nastankom večjega števila endemičnih vrst v vseh treh centrih speciacije popkores (Hind 1988). Štiri vrste popkores so endemiti Balkanskega polotoka (Hind 1988): *Moehringia minutiflora* Bornmüller (Akeroyd in Preston 1981), *M. pichleri* Huter (Tutin in sod. 1993), kratkodlakava popkoresa (*M. villosa* (Wulfen) Fenzl) (Dakskobler 2004, Surina 2007) ter Tommasinijeva popkoresa (*M. tommasinii* March.) (Kaligarič 2004).

V Sloveniji uspeva šest vrst popkores: trižilna (*Moehringia trinervia* (L.) Clairville), resasta (*M. ciliata* (Scopoli) Dalla Torr), bavarska (*M. bavarica* (L.) Grenier) – za katero Wraber (1984) z zadržkom navaja le nahajališče okoli Bizeljskega, vendar tudi sam podvomi o pristnosti taksonomske uvrstitve primerkov in je ne pripisuje ne bavarski in ne mahovni popkoresi kakor tudi njenemu križancu; kratkodlakava (*M. villosa* (Wulfen) Fenzl) - ozko endemična vrsta skalnih razpok južnih Julijskih Alp (Dakskobler 2004, Surina 2007); Tommasinijeva (*M. tommasinii* March.) - endemit severne Istre (Kraškega roba med Glinščico v Italiji in Istrskimi toplicami na Hrvaškem) (Kaligarič 2004, Surina 2007, Fišer Pečnikar in sod. 2014) in mahovna popkoresa (*M. muscosa* L.). Mahovna popkoresa je široko razširjena vrsta, uspeva na vlažni apnenčasti ali silikatni podlagi južne, srednje in vzhodne Evrope. Pogosta je v alpskem in subalpskem pasu na senčnih rastiščih, vlažnih skalah prekritih z mahom, pečinah sotesk, meliščih in zidovih kakor tudi na gozdnih tleh (Hind 1988). Vrsta *M. muscosa* je simpatrična z več taksoni, večinoma iz skupine *M. sect. Moehringia*, vendar so križanja zabeležili le z dvema drugima vrstama: *M. x coronensis* (med vrstama *M. muscosa* in *M. bavarica*) ter *M. x hybrida* (med vrstama *M. muscosa* in *M. ciliata* (Behrendsen 1904, Merxmüller in Grau 1967, Hind 1988)).

Poleg teh se na Balkanskem polotoku pojavljajo še nekatere druge vrste popkores: *Moehringia grisebachii* Janka (Stoyanov 2011, Tutin in sod. 1993), *M. jankae* Grisebach ex Janka (Stoeva 2011), *M. pendula* (Waldstein & Kitaibel) Fenzl, *M. pentandra* Gay in trižilna popkoresa (*M. trinervia*) (Jalas in Suominen 1983).

### 1.3 *Moehringia tommasinii* March.

Leta 1843 je Muzio Tommasini, takratni tržaški župan in botanik, v ostenjah nad Črnim Kalom nabral primerek popkorese in ga določil za formo vrste *M. muscosa* L. v. *firma*. Pozneje je primerek poimenoval drugače, saj nabrana rastlina nikakor ni ustrezala nobenemu opisu do tedaj znanih vrst; najprej kot vrsto *M. glaucovirens* Tomm., kasneje kot vrsto *M. ponae* Fenzl ter nazadnje kot vrsto *M. sedifolia* Freyn. Leta 1876 je primerek poslal Freynu in se z njim posvetoval. Tudi Freyn se je strinjal o edinstvenosti primerka, ki naj ne bi pripadal nobeni do tedaj opisani vrsti in jo najbližje opredelil vrsti *M. sedifolia* (Marchesetti 1879, Martini 1990, Kaligarič 2004).

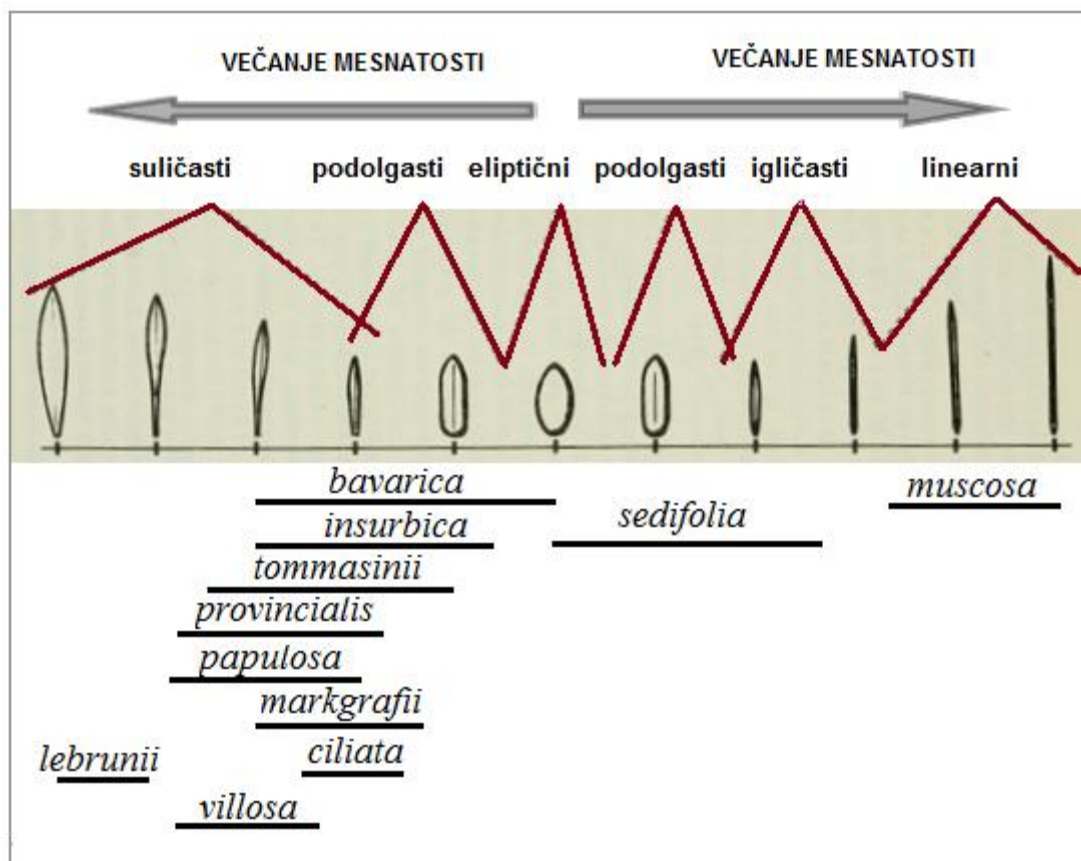
Šele leta 1879 jo je kot posebno (novo) vrsto opisal Carlo Marchesetti. Poimenoval jo je Tommasinijeva popkoresa (*Moehringia tommasinii* March.), v čast prvemu najditelju in svojemu botaničnemu mentorju in, kot ga je Marchesetti imenoval, očetu njihove flore (Marchesetti 1879).

#### 1.3.1 Morfološke značilnosti

Tommasinijeva popkoresa pripada skupini ozko sorodnih vrst, ki vključuje vrste *M. bavarica*, apeninsko vrsto *M. papulosa* in vrsto *M. intermedia* (prej *M. provincialis*) (Martini 1990). Merxmüller in Gutermann (1957) uvrščata Tommasinijevo popkoreso v skupino ozko sorodnih vrst "*bavarica-dasyphylla*", ki jo sestavljajo vrste s petštevničnim cvetom: *M. bavarica*, *M. insurbica* ter vrste s štirištevničnim cvetom: *M. tommasinii*, *M. sedoides* (prej: *M. dasyphylla*) in *M. markgrafii* Merxm.&Gutermann. Vrsta *M. tommasinii* se znotraj tega kompleksa razlikuje po relativno manjšem socvetju, cvetovi so večinoma nameščeni posamič, po reduciranih braktejah in širšem semenskem priveseku (Merxmüller in Gutermann 1957). Merxmüller in Grau (1967) kot ozko sorodne vrste dodajata še vrsto *M. muscosa*. Fior in Karis (2007) sta na podlagi filogenetskih in morfoloških podatkov vse vrste, ki so jih avtorji Merxmüller in Gutermann (1957), Merxmüller in Grau (1967) ter Martini (1990) povezovali v ožje sorodno skupino, uvrstila v isto klado skupaj z nekaterimi drugimi vrstami in tako potrdila njihovo ozko sorodnost.

Tommasinijeva popkoresa ima tanko, razvejano in gosto razraslo korenino. Korenina ima glavno os, ki se skozi razpoke apnenca ukorenini približno 150 mm globoko (Pospichal 1897-1899, Hind 1988). Steblo je zelo krhko, členasto deljeno in pogosto viličasto razraslo (Pospichal 1897-1899). Ima koničaste, črtalasto-suličaste in nekoliko mesnate liste. Listi so sedeči in nasprotno nameščeni, brez dlačic, spodnji so nekoliko manjši (Pospichal 1897-

1899, Merxmüller in Grau 1967). Slika 2 prikazuje spekter oblik listnih ploskev in spreminjanje mesnatosti listov pri enajstih vrstah popkores. Listi Tommasinijeve popkorese so po mesnatosti in obliki podobni listom vrst *M. bavarica* ter *M. insurbica*, razlikujejo pa se od listov vrste *M. muscosa*; ta ima daljše liste z linearno do igličasto obliko (Merxmüller in Grau 1967). Barva listov je sivozelena, Merxmüller in Guterman (1957) celo pišeta o barvi listov kot možnem razlikovalnem znaku, ki ločuje vrsti *M. tommasinii* in *M. sedoides* od ostalih vrst. Vendar tudi razpravljata, da lahko barva nekoliko variira, zato je ni uporabna kot zanesljiv taksonomski znak, in je le kot podpora drugim znakom.



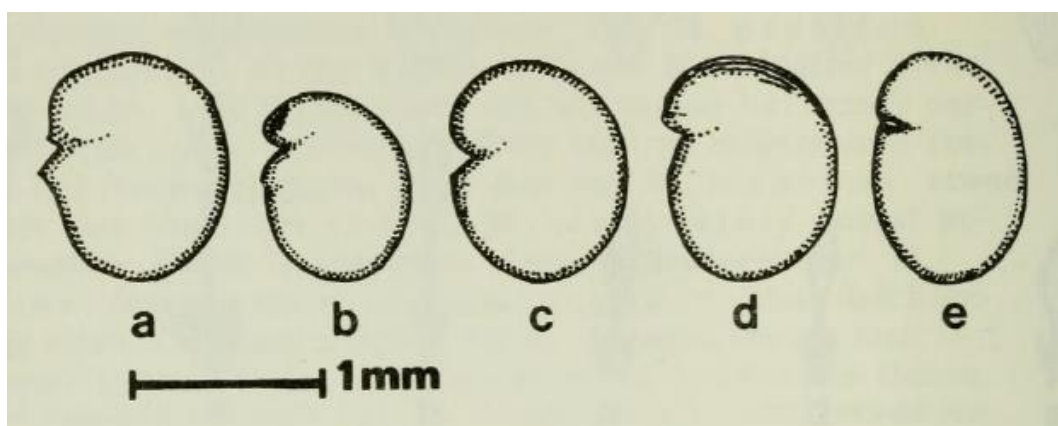
**Slika 2:** Primerjava listnih ploskev in mesnatosti listov pri nekaterih vrstah popkores (prevzeto iz Merxmüller in Grau 1967).

Cvet je tetrameren z belimi venčnimi listi, dolgimi približno 7 mm. Tetramernost cveta je med popkoresami dokaj redka (pri nas npr. še pri mahovni popkoresi). Čašni listi so štirje, dolžine 5 mm in so nekoliko bolj koničasti kot venčni (ti so bolj zaobljeni; Merxmüller in Grau 1967, Pospichal 1897-1899). Mayer (1960) navaja tudi primere, ko se v posameznih

populacijah, sicer le redko, pojavljajo primerki pentamernih cvetov. Cveti od aprila do junija (Marchesetti 1878).

Semena Tommasinijeve popkorese so kot pri veliki večini popkores črna in svetleča, kar je rezultat reducirane oblikovanosti semenske ovojnice (Merxmüller in Grau 1967, Minuto in sod. 2006). Seme je ledvičaste oblike z belim semenskim priveskom (strofiolom) meduzasto-hifalne oblike. Gre za prevladujočo obliko pri popkoresah, ki se pojavlja pri vseh iz kompleksa ozko sorodnih vrst. Vrsta *M. muscosa* pa ima dežnikasto oblikovan strofiol, ki je manjši kot pri vrsti *M. tommasinii* (Minuto in sod. 2006). Hind (1988) navaja omejitve pri kaljenju semen. Obstajale naj bi bariere za kaljenje semen, pogosto naj bi bila potrebna obdobja mrazu in zmrzali, ki dodatno spodbudijo k kaljenju.

Čeprav Minuto in sod. (2006) trdijo, da velikost semen med vrstami ne variira, Merxmüller in Grau (1967) prikazujeta nekoliko manjše seme Tommasinijeve popkorese v primerjavi z ostalimi ožje sorodnimi vrstami *M. papulosa*, *M. provincialis*, *M. bavarica* in *M. muscosa* (Slika 3).



**Slika 3:** Primerjava semen pri petih ožje sorodnih vrstah popkores (a) *M. papulosa*, (b) *M. tommasinii*, (c) *M. provincialis*, (d) *M. bavarica*, (e) *M. muscosa* (Merxmüller in Grau 1967).

Minuto in sod. (2006) so z vrstičnim elektronskim mikroskopom (ang. *Scanning Electron Microscope*; SEM) preučili semena vseh vrst popkores. Po natančnejših meritvah so ocenili, da večjih razlik v velikosti semen ni. Seme vrste *M. tommasinii* je dolgo 1,30 mm in široko 0,90 mm in je le malenkost manjše od semen vrst *M. markgrafii* (1,50 mm x 1,10 mm) in *M. bavarica* (1,40 mm x 1,00 mm).



### 1.3.1.1 Fenotipska plastičnost

Tommasinijeva popkoresa tako kot večina popkores kaže fenotipsko plastičnost (Hind 1988), ki se izraža v večjem številu fenotipov, nastalih iz istega genotipa kot odgovor na spremenjene oziroma različne razmere v okolju. Okoljski dejavniki, ki vplivajo na fenotipsko plastičnost, so tako biotski kot abiotski (Fordyce 2006). Pri popkoresah tako pogosto prepoznamo specifične ekotipe (Hind 1988). Populacije se lahko med seboj razlikujejo v morfoloških ali fizioloških značilnostih (Turrill 1946). Večinoma se razlikujejo v velikosti rastlin ter velikosti in mesnatosti listov. Okoljski dejavniki, ki najbolj vplivajo na variiranje v morfoloških znakih popkores niso popolnoma znani, med najbolj verjetne pa štejejo svetlobne in vodne razmere (Hind 1988).

### 1.3.2 Razmnoževanje

Raziskave o razmnoževalnem sistemu popkores so dokaj pomanjkljive. Hind (1988) je preizkušal možnost avtogamije pri treh vrstah *M. trinervia*, *M. pentandra* in *M. minutiflora*. Cvetove je posamič zaprl v vrečke za šest tednov ter tako testiral produkcijo semen kljub nezmožnosti navzkrižnega oprraševanja. Vrsti *M. pentandra* in *M. minutiflora* sta kljub odsotnosti oprasovalcev producirali semena; v primerjavi z navzkrižno oprasanimi cvetovi so avtogamni producirali nekoliko manjše število semen. Vrsti *M. pentandra* in *M. minutiflora* se lahko ob spremenjenih okoljskih razmerah, predvsem v začetku rastne sezone, razmnožujeta (fakultativno) kleistogamno. Vrste *M. markgrafii*, *M. provincialis* in *M. ciliata* s kleistogamijo producirajo manjše število semen (le dva ali tri na glavico); pri vrstah *M. bavarica*, *M. tommasinii* in *M. insubrica* avtogamno opráševanje ne producira semen. Način razmnoževanja oziroma opráševanja (kleistogamno, avtogamno, ksenogamno) pri mahovni popkoresi (*M. muscosa*) ne vpliva na število semen.

Na podlagi razmerja števila pelodnih zrn in jajčnih celic (preučevanega le na gojenih rastlinah) je Hind (1988) prišel do zaključka, da so vrste *M. ciliata*, *M. muscosa* in *M. glaucovirens* fakultativno avtogamne, vrste *M. insurbica*, *M. sedoides*, *M. markgrafii* in *M. provincialis* pa fakultativno ksenogamne.

Prednost fakultativne avtogamije se kaže predvsem pri vrstah, ki živijo v okoljih z manjšim številom učinkovitih oprasovalcev, saj si lahko rastlina z zmožnostjo samoopraševanja zagotovi produkcije vsaj nekaj semen (Hind 1988). Skratka, razmnoževalni sistemi pri popkoresah so raznoliki. Kleistogamija je dokaj redka (pojavlja se le med enoletnicami), vendar pa sta obvezni avtogamija in ksenogamija redki. Več večletnic, sicer zmožnih avtogamije, kaže tendenco k fakultativni ksenogamiji (Hind 1988).

Hind (1988) je na podlagi terenskih opazovanj vrste *M. tommasinii* zaključil, da producira relativno majhno število semen, prav tako je ugotovil, da je število mladih rastlin manjše, večinoma prevladujejo starejše. Možni razlogi za to naj bi bili slabši mehanizmi razširjanja, slaba kalitev in predacija semen oziroma slab uspeh mladih rastlin, možen obstoj mikoriznih povezav ter možna odsotnost vegetativnega razmnoževanja. Eden izmed razlogov bi lahko bil tudi spremembe v habitatu od vzpostavitve populacij. Vendar pa Hind (1988) razlogov ne navaja kot trditve, ampak kot še nepotrjena, okvirna predvidevanja njegovih opazovanj. Closa in Goicoechea (2011) sta potrdila prisotnost in mikorizno simbiozo arbuskularnih mikoriznih gliv z vrsto *M. trinervia*. Hind (1988) je opazovanja izvajal s pomočjo gojenih rastlin. Pri *ex situ* opazovanjih primerki vrste *M. tommasinii* (kot tudi druge vrste) razvijejo rizome (preobražena stebela, ki pod zemljo poženejo nadomestne korenine, se ukoreninijo in iz mesta lahko požene nova rastlina). Rizome je v naravi opazil le pri vrsti *M. muscosa*. Sedaj poznamo poleg vrste *M. muscosa* več vrst popkores, ki se v naravi razmnožujejo tako spolno kot vegetativno: *M. macrophylla* (Ruesink 2003), *M. grisebachii* (Stoyanov 2015) in *M. lateriflora* (Iverson 2015).

### 1.3.3 Habitat in razširjenost

#### 1.3.3.1 Habitat

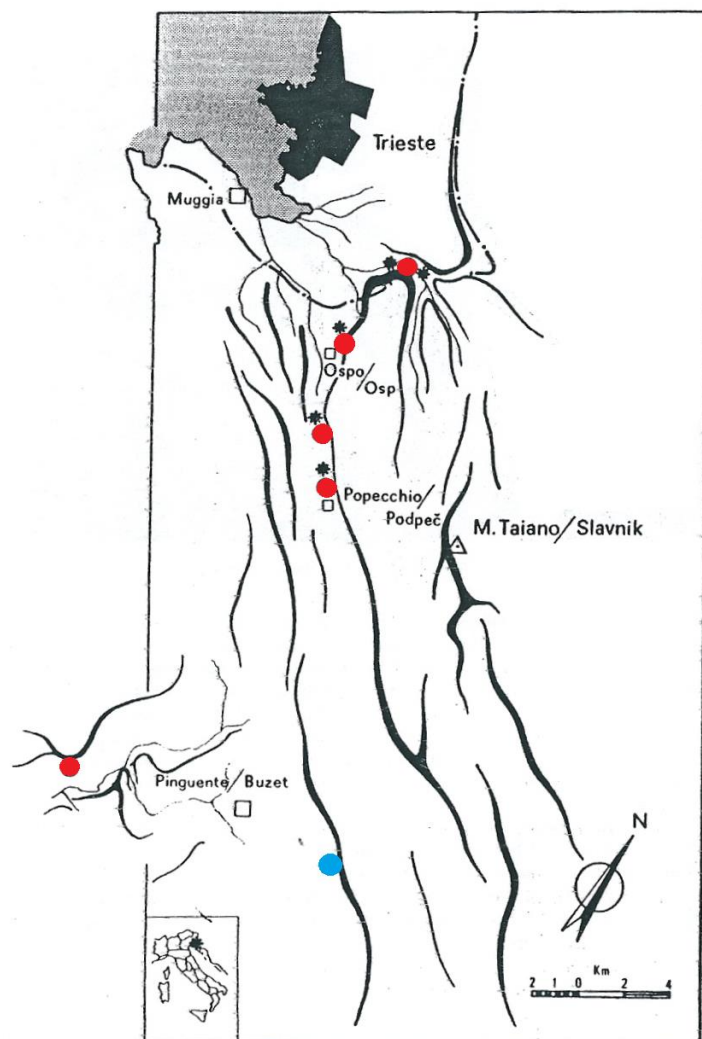
Martini (1990) je preučil ekologijo in vrstno sestavo rastišč vrste *M. tommasinii*, ki si točkasto sledijo vzdolž Kraškega roba. Tommasinijeva popkoresa je hazmofit, saj uspeva v skalnih razpokah prisojnih (južnih in jugovzhodnih ekspozicij) apnenčastih sten med 100 in 350 m nadmorske višine. Najraje uspeva pod skalnimi previsi ali pod skalami, kjer je neposredno zaščiten pred dežjem. Na teh rastiščih so rastline bolj na gosto zrasle v obliki visečih blazinic, ki so lahko velike tudi do 0,5 m (Martini 1990). Voda z raztopljenimi nutrienti pronica in mezi skozi skalne razpoke, tako rastline lahko dobijo dovolj vode s potrebnimi hranili. Taka rastišča pod previsnimi stenami so pogosto zaščiten pred direktno sončno svetlobo in vsaj deloma zasenčena ter tako bolj vlažna (Kaligarič 2004), ponekod pa sicer bolj suha, čemur botruje južna ekspozicija sten (Wraber 1992).

Po habitatni topologiji (HTS 2004) Kaligarič (2004) opredeljuje habitat Tommasinijeve popkorese kot križanca med dvema habitatnima tipoma: »sredozemske apnenčaste stene in skalovja« ter »vlažne, mokre in povirne skalne tvorbe«

#### 1.3.3.2 Razširjenost

Tommasinijeva popkoresa je stenoendemit, njena nahajališča so točkasto razporejena vzdolž Kraškega roba. Razširjenost je omejena vzdolž Kraškega roba, pojavlja se na

skupno šestih lokacijah v Italiji, Sloveniji in na Hrvaškem (Pospichal 1897-1899, Mayer 1960, Martini 1990, Wraber 1992, Kaligarič 2004; Slika 4).



**Slika 4:** Zemljevid Kraškega roba z nahajališči vrste *M. tommasinii* (rdeče točke), od severa proti jugu si sledijo nahajališča: dolina Glinščice (ITA), Osp, Črni kal in Podpeč (SLO) ter Istrske toplice (HRV). Označeno je tudi nahajališče (modra točka) pri Nugli, kjer Pospichal (1897-1899) navaja prisotnost Tommasinijeve popkorese, vendar nahajališča v novejšem času niso potrdili (prevzeto iz Martini 1990).

Najbolj severno se pojavlja v Italiji v dolini reke Glinščice (Val Rosandra) blizu Trsta. Dolina Glinščice je naravni deželni rezervat, ustanovljen leta 1996 (Gasparo in Polli 2015) in predstavlja edino nahajališče Tommasinijeve popkorese v Italiji.

V Sloveniji vrsta *M. tommasinii* uspeva na treh lokacijah. Najbližje italijanskem nahajališču je nahajališče na vertikalni apnenčasti Osapski steni nad vasjo Osp (Marchesetti 1878, Pospichal 1897-1899, Mayer 1960). Osapska udornica nudi zaščito pred hladno burjo, stene so obrnjene proti jugu in se tekom dneva precej ogrejejo,

apnenčasta podlaga zadržuje več toplote kot flišna okolica, zato je celotno osapsko območje izpostavljeno bolj mili lokalni klimi. Zaradi toplejših klimatskih razmer nad Ospom uspeva eno redkih naravnih rastišč pravih sredozemskih rastlin. Na tem rastišču najdemo sredozemski zimzeleni gozdiček z lovorom (*Laurus nobilis* L.), zimzelenim hrastom (*Quercus ilex* L.), širokolistno zeleniko (*Phillyrea latifolia* L.), trokrpim javorom (*Acer monspessulanum* L.), terebintom (*Pistacia terebinthus* L.) in drugimi (Wraber 1977, Zorec 1983). Stene nad Ospom so ena izmed priljubljenih in množično obiskanih plezališč, imajo približno 240 plezalnih smeri preko celotnih sten nad Ospom (Glasnović 2013).

Drugo slovensko nahajališče je na steni nad vasjo Črni Kal (Marchesetti 1878, Pospichal 1897-1899, Mayer 1960) in se razprostira le na odseku, dolgem manj kot 100 m. Stena pri Črnem Kalu je prav tako privlačna za plezalce, na delu sten, kjer uspeva Tommasinijeva popkoresa, je vzpostavljenih približno 50 plezalnih smeri (Glasnović 2013).

Zadnje nahajališče vrste *M. tommasinii* v Sloveniji je pri Podpeči (Marchesetti 1878, Pospichal 1897-1899, Mayer 1960). Rastišče je lahko dostopno, nahaja se na apnenčastih stenah ob večnamenski cesti. Na podlagi Pravilnika o prepovedi vznemirjanja živali... (2006) so stene pri Podpeči edino nahajališče Tommasinijeve popkorese, kjer je plezanje v celoti prepovedano.

Najbolj južno nahajališče vrste *M. tommasinii* se nahaja na Hrvaškem v okolici Istrskih toplic. Znani sta dve manjši lokaciji v neposredni bližini Istrskih toplic. Ena je v steni nad kompleksom toplic, druga pa predstavlja steno na levem bregu reke Mirne približno 1 km zračne razdalje od stene nad toplicami (Brana 2005).

Pospichal (1897-1899) navaja še nahajališče pri Nugli (Hrvaška), vendar ga po objavi Pospichala niso več potrdili (Brana 2005; Surina, ustno sporočilo).

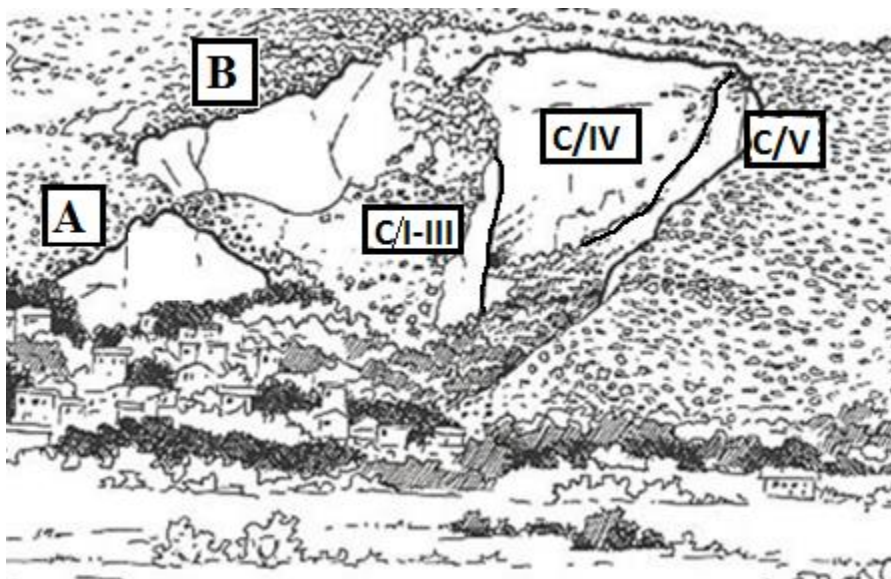
#### 1.3.3.3. Združba *Asplenio-Moehringietum tommasinii* Martini 1990

Wraber (1992) je leta 1967 popisal takrat še neopisano združbo, v kateri se na stenah pri Podpeči pojavlja Tommasinijeva popkoresa. Na nadmorski višini 360 m in na površini 16 m<sup>2</sup> je prepoznal 19 vrst, rezultatov takrat še ni objavil. Martini (1990) je dve desetletji kasneje preučeval sestoje iste združbe, ki jo je podrobno opisal, poimenoval in rezultate objavil. Opisal je novo združbo *Asplenio-Moehringietum tommasinii* Martini 1990, ki pripada zvezi *Centaureo-Campanulion*. Združbo označuje stalna prisotnost vrste *M. tommasinii*, ki jo pogosto spremljata tankolistna vilovina (*Sesleria juncifolia* Wulf. ex Suffr.) in piramidasta zvončica (*Campanula pyramidalis* L.). Tem vrstam se v združbi najpogosteje pridružuje žlezavi sršaj (*Asplenium lepidum* J.C. Presl. Presl.). Kot pogosti

spremljevalni vrsti pa Martini (1990) navaja razraslo kršino (*Parietaria judaica* L.) in kraški šetraj (*Satureja montana* L. subsp. *variegata* (Host) P.W. Ball). Ponekod se pojavljajo tudi lišaji (*Fulgensia fulgida* (Nyl.) Szatala, *Gonohymenia nigritella* (Lettau) Henssen idr.), značilno kserotermni elementi suhih in toplih pobočjih. Druge vrste, ki se pojavljajo v združbi so jagodasti mleček (*Euphorbia fragifera* Jan), grmičasta šmarna detelja (*Coronilla emerus* L. subsp. *emeroides* Boiss.&Spruner), navadna haljica (*Petrorhagia saxifraga* (L.) Link), navadna trdulja (*Catapodium rigidum* (L.) C.E. Hubb.), Gouanova konjska kumina (*Seseli gouanii* Koch), bela homulica (*Sedum album* L.) ter alpski volčin (*Daphne alpina* L.) (Martini 1990).

Hazmofitska združba je vrstno relativno revna, na vsaki popisni ploskvi uspeva povprečno deset rastlinskih vrst (Martini 1990). Prevladujoči življenjski obliki sta hemikriptofiti (45 % delež vseh oblik) ter hamefiti (40 %), ki sicer drugače prevladujeta v hazmofitskih združbah. Skupaj 15 % pa predstavljajo terofiti in fanerofiti. V združbi prevladujejo predvsem sredozemski elementi (35 %), katerim s 25 % deležem sledijo južno-ilirski ter oromediteranski elementi (10 %). Združba je kljub prisotnosti ilirskih elementov sredozemska, vendar je prav zaradi deleža severno ilirskih elementov značilna za severno jadransko kraško območje (Martini 1990).

Glasnović (2013) je popisal Tommasinijevo popkoreso na vseh treh območjih pojavljanja v Sloveniji in podal približno oceno številčnosti populacij na podlagi štetja s prostim očesom. Ocena je podana na podlagi med seboj ločljivih enot, saj lahko včasih rastline rastejo tesno ena ob drugi in je določitev posameznih primerkov težja. Na Črnem Kalu je zabeležil skupno 352 rastlin (posameznih enot), ki se pojavljajo predvsem v manjših blazinicah, večje so prisotne v vlažnih in nedostopnih razpokah. Številčnost populacije pri Podpeči ocenjuje na 255 rastlin, ki uspevajo kot blazinice različnih velikosti. Ocena številčnosti Tommasinijeve popkorese je bila podana po posameznih delih Osapske udornice, razdelitev udornice na posamezne dele je prikazana na Sliki 5.



**Slika 5:** Razdelitev Osapske udornice na posamezne dele: A, B in C (privzeto po Galičič in Skok 2005).

Skupno je zabeležil 570 – 646 rastlin (posameznih enot). Na odseku A je zabeležil le eno, na odseku B pa 75 – 90 rastlin. Največje število posameznih rastlin uspeva na odseku C (570 – 646 rastlin). Predel IV odseka C je edini predel Osapske stene, kjer je na podlagi Pravilnika o prepovedi vznemirjanja živali... (2006) plezanje prepovedano in kjer v primerjavi s celotnim odsekom C uspeva največje število rastlin (200 – 220).

### 1.3.4 Ogroženost in zavarovanost

Na celotnem območju Kraškega roba se močno razvija športno plezanje. Škornik (1992) piše o začetku plezanja po ostenjih Kraškega roba po letu 1945, v večji meri v osemdesetih letih, ko so začeli številčneje vzpostavljati nove plezalne smeri ter o negativnem vplivu športnega plezanja na živali in rastline, ki živijo na ali pri ostenju: netopirji, v steni so gnezdišča ogroženih in redkih ptic, redke Tommasinijeve popkorese ter v bližini ostenja nad Ospom nahajališče samoniklega lovora. Tako Wraber (1992) kot Škornik (1992) navajata uničevanje primerkov vrste *M. tommasinii*. Plezalci, lahko tudi nehote, trgajo in ruvajo posamezne rastline ob plezanju, prav tako jih lahko potencialno ogroža odpiranje novih smeri z namestitvijo svedrov in drugih plezalnih pripomočkov (markacije, napisi, klini). Wraber (1992) in Montagnani in sod. (2013) omenjajo tudi možnost trganja rastlin s strani zbiralcev, vendar so to največkrat le dosegljivi primerki. Glasnović (2013) navaja prisotnost nekaterih tujerodnih vrst pri stenah nad Ospom. Izpostavlja predvsem navadno

viniko (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch ), katera se kot vzpenjalka lahko širi po steni in tako preraste in senči ne samo vrste *M. tommasinii*, temveč tudi ostale vrste.

Vendar je potrebno poudariti, da so to le opažanja, gotovo plezalci izruvajo verjetno kar precej primerkov Tommasinijeve popkorese, vendar pa ni raziskano, do kolikšne mere take aktivnosti kakor tudi potencialna prisotnost tujerodnih vrst, če sploh, ogrožajo populacijo endemične popkorese. Kaligarič (2004) navaja, da slovenski del predstavlja največji del svetovne populacije (ocenjeno več kot polovico populacije se nahaja na območju Slovenije), kjer je tudi jedro celotne populacije vrste *M. tommasinii*. Ta je stabilna, v zadnjih 150 letih ostaja njen areal nespremenjen.

Tommasinijeva popkoresa je Natura 2000 vrsta, uvrščena je na Prilogo II habitatne direktive (Direktiva 92/43/EEC... 1992). Je tudi ena izmed vrst, za katero so opredelili posebno ohranitveno območje (POO) na Krasu (Uredba o posebnih varstvenih območjih... 2004). S Pravilnikom o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam (2002) je Tommasinijeva popkoresa uvrščena je na Rdeči seznam ogroženih praprotnic in semenk Slovenije kot redka vrsta. Na državni ravni je zavarovana z Uredbo o zavarovanih prosto živečih rastlinskih vrstah (2004). IUCN - Montagnani in sod. (2013) obravnavajo Tommasinijevo popkoreso kot ogroženo (EN- *Endangered*). Montagnani in sod. (2013) navajajo omejeno razširjenost z obsegom pojavljanja ocenjenim na skupno manj kot 100 km<sup>2</sup>, v Italiji le 1 km<sup>2</sup>, v Sloveniji pa ocenjeno 80 km<sup>2</sup>. Uvrščena je tako na Seznam redkih, ogroženih in endemičnih rastlin Evrope (Threatened Plants Unit 1983), kakor tudi na Prilogo I strogo zavarovanih vrst Bernske konvencije (Bernska konvencija 1979). Na Hrvaškem je uvrščena v Rdečo knjigo vaskularne flore Hrvaške (Brana 2005). Ker je na Hrvaškem ocenjena številčnost populacije 1200 osebkov (200 na desnem bregu Mirne nad kompleksom Istrskih toplic in 1000 osebkov na levem bregu Mirne), jo Brana (2005) opredeljuje kot kritično ogroženo (CR – *Critically Endangered*). Prepoznane grožnje, ki jih navaja, so spremembe v življenjskem prostoru, ki jih lahko povzroča v bližini prisotna rudarska dejavnost in plezanje, navaja tudi turizem kot možen vzrok ogroženosti. Vrsta *M. tommasinii* je na Rdečem seznamu flore Italije navedena kot potencialno ogrožena vrsta (NT – *Nearly threatened*) (Rossi in sod. 2013).

## 1.4 DNA prstni odtisi za uporabo v populacijski študiji

AFLP – polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) je tehnika pridobivanja DNA prstnih odtisov, ki temelji na selektivnem PCR pomnoževanju restrikcijskih fragmentov razrezane genomske DNA (Vos in sod. 1995). AFLP je uporaben na več področjih: gensko kartiranje, raziskave starševstva, merjenje genetske raznolikosti in prepoznavanje hibridov (Meudt in Clarke 2007). Uporaben je tudi na področju populacijske genetike, ki preučuje genetsko variabilnost znotraj in med populacijami in se kaže v razlikah med frekvencami alelov. Razlike znotraj in med populacijami ter genska strukturiranost posameznih populacij so odraz večjega števila dejavnikov, med drugim so najpomembnejši naravna selekcija, genetski zdrs, mutacije in pretok genov (Okasha 2012). Hamrick in Godt (1996) ter Loveless in Hamrick (1984) navajajo tudi vpliv načina razmnoževanja na genetsko raznolikost in genetsko diferenciacijo med populacijami. Ksenogamne vrste imajo večjo genetsko variabilnost znotraj populacij in s tem manjšo populacijski strukturo. Avtogamne vrste pa imajo nekoliko manjšo genetsko variabilnost znotraj populacij, prisotna je večja genetska populacijska strukturiranost, saj so si populacije genetsko bolj oddaljene. Največja genetska raznolikost se pojavlja pri širše razširjenih vrstah z zmožnostjo disperzije semen na večje razdalje.

Ohranjanje genetske variabilnosti je pomembno za preživetje populacije, predvsem v spreminjajočih se okoljskih razmerah. Cilj varstvene genetike je predvsem varovati redke vrste, saj na podlagi genetskih analiz ocenjuje verjetnost izumrtja populacije, razjasnjuje taksonomske nejasnosti in opredeljuje populacije, pomembne za varovanje (Frankham in sod. 2002, Soltis in Gitzendanner 1999). Dolgoročni cilj je ohranjati vrsto dinamično in zmožno se prilagajati okoljskim spremembam. Zmožnost prilagajanja spremenljivim okoljskim razmeram pa je predvsem odvisna od stopnje genetske raznolikosti. Večja kot je genetska raznolikost, večja je verjetnost, da se danim okoljskim razmeram določen genotip lahko prilagodi (Frankham in sod. 2002). Pri populacijah endemičnih vrst je ohranjanje genetske raznolikosti dokaj pomembno, saj imajo vrste omejeno distribucijo in v veliko primerih majhno efektivno velikost populacije ter večjo dovzetnost genskem zdrsu. Nenazadnje so študije genetske raznolikosti pomembne za določanje upravljalških načrtov (Ávila-Díaz in Oyama 2007, Escaravage in sod. 2011, Vandepitte in sod. 2012).

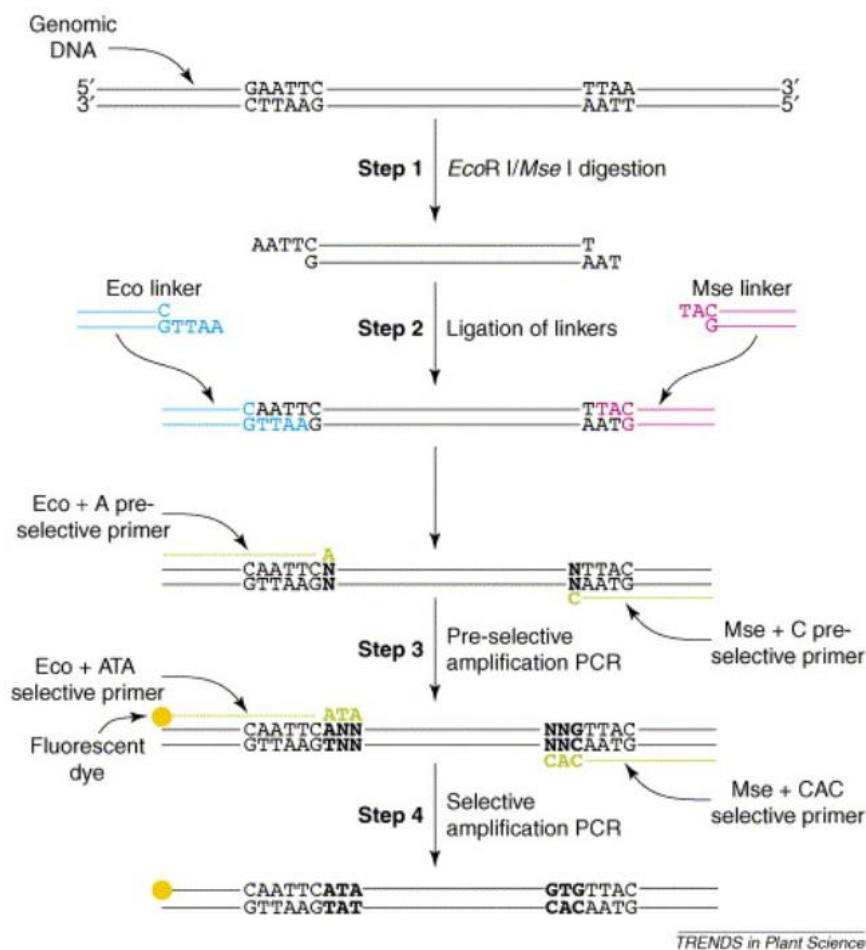
S pomočjo analize AFLP smo določili genetsko strukturiranost vrste *M. tommasinii*. Redke vrste naj bi bile namreč karakterizirane z nizko genetsko raznolikostjo in visoko populacijsko diferenciacijo. Visoka populacijska diferenciacija se pogosto pojavlja zaradi ozkega grla, genetskega zdrsa, lokalnih adaptacij (Binks in sod. 2015) ter načina



razmnoževanja in razširjanja (Hamrick in Godt 1966, Loveless in Hamrick 1984, Escaravage in sod. 2011). Na genetsko raznolikost lahko vpliva več dejavnikov, kot so ekološki in biogeografski dejavniki ter razmnoževalni sistem, velik vpliv ima pri redkih vrstah majhna efektivna velikost populacije ter geografska in/ali ekološka izoliranost (Jiménez-Mejías in sod. 2015). Vendar nizka genetska raznolikost ni vedno prisotna pri redkih in endemičnih vrstah, le-te imajo lahko višjo genetsko raznolikost kljub redkosti in majhni efektivni velikosti populacije (Gevaert in sod. 2013, Lopes in sod. 2014, Binks in sod. 2015, Jiménez-Mejías in sod. 2015).

AFLP analiza nam je služila kot metoda določanja strukturiranosti vrste *M. tommasinii* ter določanje genetske raznolikosti in diferenciacije. Veliko genov je polimorfnih – imajo dve ali več oblik, odvisno od oblike posameznega alela. AFLP je učinkovit pri odkrivanju polimorfizmov na večjem številu lokusov in je zato zelo informativen in uporaben v študijah znotraj vrst in populacij. AFLP ima več prednosti, saj ni potrebno predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja DNA in je uporaben, kadar razlike v nukleotidnih sekvencah ne pridobijo informativne variabilnosti (Vos in sod. 1995). Obstajajo podobne metode genotipiziranja, ki se poleg AFLP uporabljajo v populacijskih študijah: RAPD (naključno pomnožena polimorfna DNA – ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*) in ISSR (ang. *Inter Simple Sequence Repeats*) - obe metodi temeljita na PCR tehniki, ter RFLP (ang. *Random Fragment Length Polymorphism*) in SNPs (ang. *Single Nucleotide Polymorphisms*). Poleg naštetih se za genotipizacijo uporablja še analiza mikrosatelitov (Meudt in Clarke 2007).

AFLP postopek je opisan na podlagi Vos in sod. (1995). AFLP sestavlja več korakov (Slika 6): restrikcija z ligacijo, dvostopenjska amplifikacija restrikcijskih fragmentov in analiza fragmentov s kapilarno elektroforezo (tudi poliakrilamidno gelsko elektroforezo).



**Slika 6:** Shematski prikaz korakov tehnike AFLP: korak 1 prikazuje restrikcijo, korak 2 ligacijo, korak 3 preamplifikacijo in korak 4 selektivno amplifikacijo (Meudt in Clarke 2007).

V prvem koraku restrikcije pride do razreza genomske DNA s parom encimov restrikcijskih endonukleaz. Večinoma sta v uporabi dva restrikcijska encima: *MseI* in *EcoRI*, ki na specifičnem prepoznavnem mestu razrežeta fragmente različnih dolžin. Predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja ni potrebno, saj imata restrikcijska encima večje število prepoznavnim mest na DNA, kjer naključno režeta restrikcijske fragmente. Restrikcijska encima sta dva: prvi encim, *EcoRI* (lahko tudi *PstI*, *HindIII*, *BglIII*) prepozna manjše število mest na DNA, kjer reže. Prepoznavno mesto je sestavljeno iz večjega števila nukleotidov (5'- G ↓ A A T T C - 3') kot pri restrikcijskem encimu *MseI* (5' - T ↓ T A A - 3'). *MseI* pogosteje reže DNA, saj ima prepoznavno mesto sestavljeno le iz štirih nukleotidov, zaradi česa prepozna več komplementarnih mest na DNA. Večino evkariotskega genoma je bogato s TA bazami, kar se dodatno odraža v pogostem rezanju *MseI* encima. Inkubacija restrikcijske mešanice poteka najprej na 37 °C, optimalni temperaturi za delovanje encima *PstI* in nato na 65 °C za delovanje *MseI*.

Drugi korak je ligacija, kjer se dvoverižni *MseI* in *EcoRI* (ali *PstI*) DNA adapterji s komplementarnimi lepljivimi konci vežejo na restrikcijske fragmente. Adapter služi kot prepoznavno mesto, kamor se v naslednjem koraku veže začetni oligonukleotid.

Restrikciji z ligacijo sledi pomnoževanje restrikcijskih fragmentov. Pomnoževanje temelji na PCR (verižni reakciji s polimerazo). Najprej se restrikcijske fragmente pomnoži z neselektivnimi začetnimi oligonukleotidi, ki imajo nukleotidno zaporedje komplementarno adapterju, a imajo dodan še en nukleotid, kar dodatno doprinese k selekciji fragmentov in njihovo število štirikrat zmanjša. PCR temperaturni profil za preamplifikacijo je sestavljen iz več temperaturnih stopenj. Pri 94 °C pride do denaturacije DNA in nastanka enojnih DNA verig. Nato temperatura pade na 56 °C - optimalno temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov. Nato se temperatura dvigne na 72 °C, kjer so pogoji optimalni za delovanje *Taq* polimeraze in sinteze nove dvojne verige, komplementarne stari enoverižni DNA. Cikel se večkrat ponovi (20 do 30-krat) in število pomnoženih fragmentov se vsak cikel eksponentno pomnoži.

Drugi del PCR pomnoževanja je selektivna amplifikacija. Tu uporabljamo začetne oligonukleotide, ki imajo poleg nukleotidov, komplementarnih preamplifikacijskim oligonukleotidom še dodatne tri (lahko tudi dva ali štiri) nukleotide. Z uporabo selektivnih začetnih oligonukleotidov zmanjšamo število pomnoženih fragmentov, saj je tako vizualizacija s pomočjo elektroforeze bolj jasna. *EcoRI* (tudi *PstI*) začetni oligonukleotidi imajo fluorescentno označene zadnje tri selektivne nukleotide in se tako fragmenti med kapilarno elektroforezo vidno ločijo med seboj. PCR temperaturni protokol selektivne amplifikacije je podoben preamplifikaciji, edina razlika je v tem, da temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov vsak cikel pade za 0,7 °C iz 65 °C na 56 °C.

Prstne odtise DNA pridobimo s pomočjo kapilarne elektroforeze. Deluje na principu potovanja molekul proti nasprotno nabiti elektrodi. Vzorec potuje po kapilari, predhodno napolnjeni s pufrom. Fragmenti se v kapilari ločijo po dolžini (približno 50 – 500 bp); krajši potujejo hitreje. Ko vzorec potuje mimo optičnega detektorja, le-ta zazna oddano svetlobo in računalnik glede na florescenco označenega selektivnega nukleotida prisotnost fragmentov zapisuje v ločene elektroferograme. Vrhovi elektroferograma ustrezajo posamezni lisi na poliakrilamidnem gelu in predstavljajo prstne odtise DNA.

## 1.5 Razmerje števila pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O) v povezavi z razmnoževalnim sistemom

Cruden (1976) je opisal uporabnost razmerja med številom pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O) na cvet. P/O ima razpon od 2,7 pri kleistogamnih vrstah do več 100.000 pri vetrocvetkah in nam omogoča vpogled v razmnoževalni sistem vrste. Cruden (1976) in Jürgens in sod. (2002) navajajo, da imajo kleistogamne vrste najmanjše razmerje P/O, nekoliko večje razmerje imajo avtogamne vrste, največje pa ksenogamne. Obvezno ksenogamne imajo največji P/O, a že premik k fakultativni ksenogamiji opazimo v zmanjšanju P/O razmerja. Vsak evolucijski premik od ksenogamije v smeri avtogamije na vsaki stopnji pospremi upad razmerja P/O. Tako lahko na podlagi razmerja P/O opredelimo razmnoževalne sisteme vrst (Cruden 1977).

Cruden (1977) je srednje logaritemske vrednosti P/O razdelil v pet skupin, ki jim je na podlagi vrednosti razmerja P/O opredelil način razmnoževanja:

Kleistogamija	$\log (P/O) = 0,65$
Obvezna avtogamija	$\log (P/O) = 1,43$
Fakultativna avtogamija	$\log (P/O) = 2,15$
Fakultativna ksenogamija	$\log (P/O) = 2,81$

Vendar temu ni vedno tako in si P/O ter način razmnoževanja lahko nasprotujeta. Tak primer so zabeležili pri vrstah *Silene dioica* in *S. latifolia*, ki imata kot obvezno ksenogamni vrsti precej nizko P/O razmerje, verjetno kot posledica učinkovitega mehanizma oprasha (Jürgens in sod. 2002). Razmerje P/O naj bi se prav tako razlikovalo med vrstami zgodnje-sukcesijske faze v motenih habitatih in pozno-sukcesijskimi vrstami. Opažen je trend upada P/O v smeri proti vrstam pozno-sukcesijske faze (Cruden 1977). Cruden in Miller-Ward (1981) navajata povezanost P/O z velikostjo pelodnih zrn. Lastnosti imata negativno korelacijo – rastline z manjšim P/O imajo večinoma večja pelodna zrna. Cruden je ugotovil, da sta učinkovitost oprasha (da pelodno zrno doseže receptilno brazdo) in velikost peloda povezana z razmerjem števila pelodnih zrn in jajčnih celic. Večja kot je učinkovitost oprasha, manjši je P/O (Cruden 1977, Cruden in Miller-Ward 1981).

Razmerje P/O naj bi bilo enotno za celotno vrsto. Vendar pa se lahko kljub temu pojavijo variacije v številu pelodnih zrn med posameznimi populacijami. Cruden (2000) kot razloge za variacije navaja napake pri vzorčenju ter uspešnost oprasha. Variacije se lahko

pojavnajo tako na ravni posameznih primerkov kakor tudi znotraj ali med populacijami. Brunet in Charlesworth (1995) delno razlagata variacije v razmerju P/O na ravni posameznih rastlin v teku rastne sezone. Rastline naj ne bi vlagale enako energije v moške reprodukativne organe pri cvetovih, ki se odprejo prvi v zgodnji sezoni cvetenja. S tem naj bi zmanjšali reprodukativno izgubo, saj je proizvodnja peloda manjša, kajti v tem času ni odprtih veliko cvetov.

Jürgens in sod. (2002) so preučili število pelodnih zrn in jajčnih celic ter P/O pri vrstah iz poddružine Caryophylloideae (rodovi *Agrostemma*, *Dianthus*, *Saponaria*, *Silene* in *Vaccaria*). Potrdili so rezultate Cruden-a (1977) o večanju razmerja P/O od avtogamnih k ksenogamnim vrstam. Našli so tudi povezavo P/O z življenjskim oblikama, in sicer večletne rastline imajo približno dvakrat večji P/O kot enoletnice.

S pomočjo študije razmerja P/O smo poskusili ugotoviti razlike med ozko razširjeno Tommasinijevo in širše razširjeno mahovno popkoreso in ugotoviti razmnoževalni sistem obeh vrst. Prav tako smo izmerili površino polprašnic, saj smo želeli preveriti, ali so potencialne razlike med razmerjem P/O v povezavi z razlikami v velikosti polprašnic.

## 2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen dela je oceniti genetsko strukturiranost in variabilnost ter ugotoviti reprodukcijski sistem posameznih populacij Tommasinijeve popkorese. Sklepamo, da vrsta kljub točkastemu arealu ni genetsko strukturirana, saj oddaljenost med rastišči ni velika (med Glinščico in Istrskimi toplicami je manj kot 30 km zračne linije). Določili bomo genetsko diferenciacijo med populacijami ter ocenili genetsko raznolikost in določili, katere populacije imajo največjo oziroma najmanjšo raznolikost, kar predstavlja pomemben podatek za varovanje vrste. Poskusili bomo oceniti intenzivnost pretoka genov oziroma morebitno genetsko izolacijo med populacijami.

Pregledali bomo, ali se način razmnoževanja odraža v genetski variabilnosti. Po Cruden-u (1977) je način razmnoževanja vrste povezan z razmerjem števila pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O). Da bi ocenili način razmnoževanja, smo si za primerjavo izbrali še eno, ožje sorodno, a široko razširjeno mahovno popkoreso (*Moehringia muscosa* L.).

V okviru študije smo zastavili naslednje hipoteze:

- (1) Vrsta *Moehringia tommasinii* je vzdolž svojega areala genetsko strukturirana
- (2) Populacije vrste *M. tommasinii* se med seboj razlikujejo tako v številu privatnih in lokalno pogostih lokusih kakor tudi v stopnji genetske raznolikosti
- (3) Relativna genetska izoliranost populacij vrste *M. tommasinii* je povezana s prostorsko izoliranostjo.

Na podlagi razmerja P/O bomo potrdili ali ovrgli naslednjo hipotezo:

- (4) *Moehringia tommasinii* je fakultativno avtogamna vrsta in vsled ozke razširjenosti ima v primerjavi s širše razširjeno vrsto *M. muscosa* manjše razmerje P/O.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Vzorčenje Tommasinijeve in mahovne popkorese

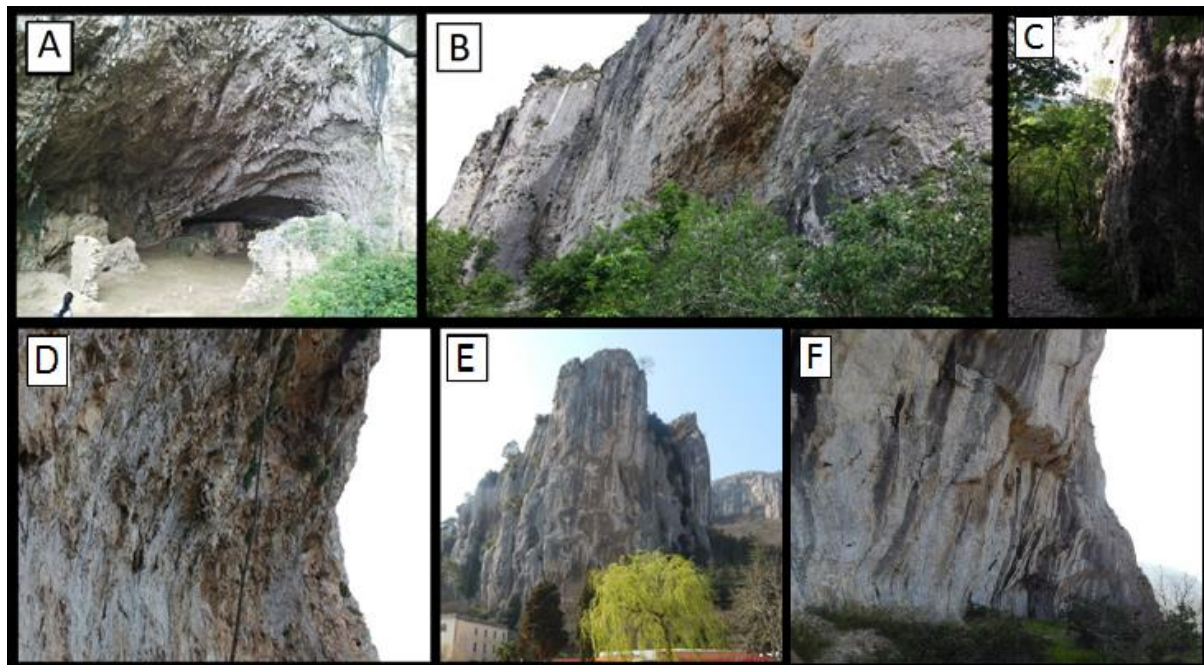
Rastlinski material smo nabrali na petih lokacijah v treh državah (Preglednica 1) v letih 2012 in 2013. Na vsaki lokaciji smo nabrali več listov približno desetih posameznih rastlin, liste smo shranili v papirnate vrečke, napolnjene s silikagelom (Kraemenr & Martin GmbH).

Študijo razmerja peloda in jajčnih celic (P/O) smo opravili na dveh vrstah: poleg vrste *M. tommasinii*, katerih cvetne popke smo nabrali na eni lokaciji v Italiji, treh v Sloveniji in dveh na Hrvaškem, smo si izbrali še ozko sorodno mahovno popkoreso (*M. muscosa* L.), katere cvetne popke smo nabrali na štirih lokacijah v Sloveniji. Lokacije terenskega dela so predstavljene v Preglednici 1. Nabrali smo 66 cvetnih popkov mahovne popkorese in 78 popkov Tommasinijeve popkorese (10 – 15 cvetnih popkov na populacijo). Popke, tik pred odprtjem, smo nabrali na različnih rastlinah in jih shranili v posodice z 70% etilnim alkoholom, vse smo nabrali leta 2014 v času cvetenja.

**Preglednica 1:** Lokacije s pripadajočimi koordinatami, kjer smo nabirali rastlinski material. Za vsako lokacijo je pripisan tip študije, kjer smo uporabili rastlinski material: AFLP za populacijsko študijo s pomočjo metode polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov ter P/O za ugotavljanje razmerja peloda in jajčnih celic.

Vrsta	Vzorčno mesto	Oznaka populacije	Koordinate		Uporaba rastlinskega materiala
<i>M. tommasinii</i>	dolina Glinščice (ITA)	GL	45°37'5.84"	13°52'30.98"	AFLP, P/O
	Osp (SLO)	OSP	45°34'20.16"	13°51'45.77"	AFLP, P/O
	Črni Kal (SLO)	CK	45°32'57.37"	13°53'3.76"	AFLP, P/O
	Podpeč (SLO)	PP	45°31'43.25"	13°54'12.04"	AFLP, P/O
	Istrske toplice 1 (HRV)	IST1	45°22'41.39"	13°52'56.02"	AFLP, P/O
	Istrske toplice 2- levi breg Mirne (HRV)	IST2	45°22'42.98"	13°53'42.42"	P/O
<i>M. muscosa</i>	Rakitovec (SLO)	RK	45°28'5.30"	13°58'23.39"	P/O
	Črni Kal (SLO)	CK	45°32'58.26"	13°52'58.73"	P/O
	Snežnik (SLO)	SNŽ	45°33'7.12"	14°25'8.70"	P/O
	Srednja Vas v Bohinju (SLO)	SVB	46°17'59.55"	13°55'26.04"	P/O

Rastlinski material vrste *M. tommasinii* smo na vseh lokacijah nabrali na apnenčastih, večinoma previsnih stenah, kjer so rastline zaščitene pred dežjem (Slika 7).



**Slika 7:** Stene šestih lokacij, kjer smo nabrali vzorce Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii*): Osp (A), Črni Kal (B), dolina Glinščice (C), Podpeč (D), nad zdravilišnimi objekti v Istrskih toplicah (E) in Istrske toplice na levem bregu reke Mirne (F).



## **3.2 Populacijska študija na podlagi polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP)**

### **3.2.1 Izolacija DNA**

Za izolacijo DNA smo uporabili nekaj manjših listov, ki smo jih v mikrocentrifugirki skupaj z 2 – 3 steklenimi kroglicami razdrobili v homogenizatorju TissueLyser (Quiagen) in na frekvenci 30 Hz drobili 2-3 minute. Mikrocentrifugirko smo 30 sekund centrifugirali v Eppendorf centrifugi 5415R, da se je homogenizirano tkivo usedlo na dno.

DNA smo izolirali po CTAB in fenol kloroform protokolu. Homogeniziranemu tkivu smo dodali 1 mL na 68 °C segret CTAB pufer in inkubirali v vodni kopeli 1,5 ure na 68 °C. Dodali smo 500 µL topila (fenol : kloroform : izoamil alkohol = 25:24:1). Suspenzijo smo centrifugirali v Eppendorf centrifugi 5415R 15 minut pri 1100 rpm, po končanem centrifugiranju smo zgornjo fazo (supernatant) odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, postopek z dodajanjem 500 µL topila smo dvakrat ponovili. Nato smo supernatant odpipetirali v novo mikrocentrifugirko in dodali 50 µL 3M natrijevega acetata (CH<sub>3</sub>COONa) in 50 µL hladnega izopropanola (propan-2-ol) in dobro pretresli. Raztopino smo v zamrzovalniku hladili 30 minut, nato ponovno pretresli in centrifugirali 15 minut pri 1100 rpm. Supernatant smo odlili in spodnji fazi dodali 500 µL 70% etanola. DNA je kot pelet prilepljena na dno, zato smo rahlo pretresli, da se DNA odlepi od dna mikrocentrifugirke. Ponovno smo centrifugirali 5 minut pri 1100 rpm. Etanol smo odlili in pustili mikrocentrifugirke z DNA vzorci odprte, dokler celoten etanol ni izhlapel. DNA smo raztopili v 30 – 50 µL Tris-EDTA pufru, volumen je variiral glede na količino DNA. Pustili smo stati čez noč, da se DNA popolnoma raztopi v pufru in nato izmerili koncentracijo DNA.

### **3.2.2 Merjenje koncentracij DNA s pomočjo spektrofotometra**

Za merjenje koncentracije DNA smo uporabil spektrofotometer Epoch (BioTek). Najprej smo umerili spektrofotometer in naravnali vrednost koncentracije 0 ng/mL z uporabo destilirane vode. Na ploščo za merjenje koncentracij DNA smo nanegli dva slepa vzorca, kjer smo uporabili 3 µL destilirane vode. Po umerjanju spektrofotometra smo na ploščo nanegli vsakič po 16 vzorcev, kjer je bila količina posameznega vzorca 3 µL. Izmerili smo koncentracijo, rezultati so bili prikazani s pomočjo programa GEN5 (BioTek).

Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 260 nm, kjer se nahaja absorpcijski maksimum nukleinskih kislin. Absorbanco smo merili tudi pri valovni dolžini 280 nm in si tako pridobili vrednosti razmerja med absorbancami  $A_{260}/A_{280}$ . Razmerje nam pove čistost vzorca. Če se vrednosti nahajajo znotraj intervala 1.8 – 2.0, potem v DNA ni prisotnih proteinov in je le-ta dovolj čista za nadaljnjo uporabo. Vos in sod. (1995) sicer ne navajajo potrebe po redčenju na enotno koncentracijo DNA za uspešnost analize, vendar beležijo nekoliko drugačno zaznavo lis pri različnih koncentracijah. V izogib temu smo vse vzorce DNA z deionizirano vodo redčili na enotno koncentracijo 250 ng/ $\mu$ L v volumnu 30  $\mu$ L.

### 3.2.3 Genotipizacija s pomočjo metode AFLP – polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov

AFLP (DNA prstni odtisi) sestavlja več korakov: restrikcija in ligacija, preamplifikacija in selektivna amplifikacija. Protokol je bil izdelan na podlagi Vos in sod. (1995) z nekaterimi modifikacijami. Uporabljene restriksijske encime, začetne oligonukleotide in linkerje je izdelal proizvajalec Thermo Scientific.

250 ng DNA, raztopljene v 1  $\mu$ L Tris-EDTA pufra, smo razrezali s pomočjo izbranih restriksijskih encimov. 1  $\mu$ L raztopljene DNA smo dodali 0,15  $\mu$ L encima *PstI* (10 U/ $\mu$ L) ter 0,15  $\mu$ L encima *MseI* (*Tru1I*) (10 U/ $\mu$ L). Reakciji smo dodali 2  $\mu$ L pufra R (10 mM Tris-HCl – pH 8.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl in 0,1 mg/mL BSA) in 16,7  $\mu$ L deionizirane vode (dH<sub>2</sub>O). Restriksijsko mešanico smo temeljito premešali in inkubirali v termociklerju (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) 120 min na 37 °C in 120 min na 65 °C.

Pred pripravo ligacijske mešanice smo najprej izdelali adapterje. Ligacijski adapterji služijo vezavi začetnih oligonukleotidov in jih izdelamo iz dveh linkerjev (nukleotidno zaporedje je prikazano v Preglednici 3). Za pripravo 180  $\mu$ L 50  $\mu$ M adapterja *MseI*(*Tru1I*) smo uporabili 18  $\mu$ L 500  $\mu$ M *MseI*(*Tru1I*) linkerja 1 in 18  $\mu$ L 500  $\mu$ M *MseI*(*Tru1I*) linkerja 2 ter 144  $\mu$ L TE pufra. Za izdelavo 180  $\mu$ L 5  $\mu$ M *PstI* adapterja smo uporabili 1,8  $\mu$ L 500  $\mu$ M *PstI* linkerja 1 in 1,8  $\mu$ L 500  $\mu$ M *PstI* linkerja 2 ter 176,4  $\mu$ L TE pufra. Mešanico za pripravo adapterjev smo inkubirali na termociklerju s sledečim temperaturnim profilom: 5 min na 95 °C, 2 min na 70 °C (ta korak ima 25 cikličnih ponovitev, za vsako ponovitev se temperatura zmanjša za 2 °C), 60 min na 20 °C ter 3,5 min na 20 °C (ta korak ima 8 cikličnih ponovitev, vsak cikel temperatura pade za 1 °C). Termocikler po končanem inkubiranju pripravljene adapterje ohladi in obdrži na 4 °C do uporabe.

20  $\mu\text{L}$  restrikcijske mešanice smo dodali 5  $\mu\text{L}$  ligacijske mešanice. Ligacijska mešanica vsebuje 0,1  $\mu\text{L}$  T4 DNA ligaze (5 U/ $\mu\text{L}$ , Thermo Scientific), 1  $\mu\text{L}$  ATP (100 mM, Thermo Scientific), 0,5  $\mu\text{L}$  *MseI(Tru1I)* (50  $\mu\text{M}$ ) adapterja in 0,5  $\mu\text{L}$  *PstI* (5  $\mu\text{M}$ ) adapterja, 0,5  $\mu\text{L}$  10x T4 pufra (Thermo Scientific) ter 2,4  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ . Ligacijski mešanico smo na termociklerju inkubirali 60 min na 22  $^\circ\text{C}$  in 10 min na 65  $^\circ\text{C}$ . Ligacijska mešanica je bila shranjena na -20  $^\circ\text{C}$ .

Pripravili smo 25  $\mu\text{L}$  preamplifikacijske mešanice, ki je vsebovala 2,5  $\mu\text{L}$  restrikcijsko-ligacijske mešanice, 0,125  $\mu\text{L}$  encima *Taq* (5U/ $\mu\text{L}$ , GoTaq Promega), 0,5  $\mu\text{L}$  začetnega oligonukleotida *MseI(Tru1I)* (10  $\mu\text{M}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  začetnega oligonukleotida *PstI* (10  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  dNTP (10 mM, Fermentas), 5  $\mu\text{L}$  5x PCR pufra (Promega) in 12,375  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .

Preamplifikacija je korak, ki temelji na reakciji PCR. Uporabljen PCR temperaturni profil je prikazan v Preglednici 2.

**Preglednica 2:** Temperaturni profil PCR za preamplifikacijo in selektivno amplifikacijo.

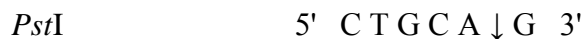
Preamplifikacija			Selektivna amplifikacija		
Temperatura	Čas	Število ciklov	Temperatura	Čas	Število ciklov
72 $^\circ\text{C}$	2 min	20 x	94 $^\circ\text{C}$	30 sek	13 x
94 $^\circ\text{C}$	30 sek		65 $^\circ\text{C}$ - 56 $^\circ\text{C}$ *	30 sek	
56 $^\circ\text{C}$	1 min		72 $^\circ\text{C}$	1 min	
72 $^\circ\text{C}$	1 min		94 $^\circ\text{C}$	30 sek	23 x
72 $^\circ\text{C}$	8 min		56 $^\circ\text{C}$	30 sek	
4 $^\circ\text{C}$	$\infty$		72 $^\circ\text{C}$	1 min	
			4 $^\circ\text{C}$	$\infty$	

\* Temperatura upade za 0,7  $^\circ\text{C}$  v vsakem ciklu.

Selektivna amplifikacija tako kot preamplifikacija temelji na reakciji PCR. Vendar pa se razlikuje v tem, da uporabljamo florescentno označene *PstI* začetne oligonukleotide in selektivne *MseI(Tru1I)* začetne oligonukleotide, ki imajo na 3' koncu selektivne nukleotide, ki omogočajo pomnožitev le dela fragmentov, pomnoženih v koraku preamplifikacije.

*Izbira selektivnih začetnih oligonukleotidov*

Najprej smo testirali smo dve kombinaciji restriksijskih encimov: *MseI* (*Tru1I*) in *EcoRI* ter *MseI* (*TruI*) in *PstI*. Restrikcija je bila uspešna s kombinacijo *MseI* (*Tru1I*) in *PstI*, katero smo uporabili z raziskavo.



Poskusili smo uspešnost selektivne amplifikacije z uporabo več kombinacij začetnih oligonukleotidov: *MseI*(*Tru1I*) in florescentno označenih *PstI*.

Testirali smo vse možne kombinacije med začetnimi oligonukleotidi:

<i>PstI</i> -AGA-6-FAM	<i>MseI</i> -CAA
<i>PstI</i> -ACA-6-FAM	<i>MseI</i> -CAG
<i>PstI</i> -ATA-PET	<i>MseI</i> -CAT
<i>PstI</i> -ACT-VIC	<i>MseI</i> -CTA
	<i>MseI</i> -CTC

Kot uspešni sta se izkazali le dve kombinaciji začetnih oligonukleotidov: *PstI*-AGA-6-FAM + *MseI*-CAG in *PstI*-ACA-6-FAM + *MseI*-CAG, katerih nukleotidno zaporedje je prikazano v Preglednici 3.

V selektivni amplifikaciji smo uporabili 2  $\mu\text{L}$  10x redčene preamplifikacijske mešanice (redčene z  $\text{dH}_2\text{O}$ ). Mešanici selektivne amplifikacije smo dodali še 0,05  $\mu\text{L}$  encima *Taq* (5U/  $\mu\text{L}$ , Fermentas), 0,2  $\mu\text{L}$  selektivnega začetnega oligonukleotida *MseI*(*Tru1I*) (10  $\mu\text{M}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$  selektivnega začetnega oligonukleotida *PstI* (10  $\mu\text{M}$ ), 0,8  $\mu\text{L}$  dNTP (10 mM, Fermentas), 0,8  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (Fermentas), 1  $\mu\text{L}$  10x PCR pufer (Fermentas) in 4,95  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ . PCR temperaturni profil termociklerja je prikazan v Preglednici 2.

**Preglednica 3:** Seznam začetnih oligonukleotidov s pripadajočim nukleotidnim zaporedjem, uporabljenih v posameznih korakih AFLP

	<b>Začetni oligonukleotid</b>	<b>Nukleotidno zaporedje (5' - 3')</b>
<b>ligacija</b>	<i>MseI</i> linker1	GAC GAT GAG TCC TGA G
	<i>MseI</i> linker2	TA CTC AGG ACT CAT
	<i>MseI</i> adapter	5'- GAC GAT GAG TCC TGA G -3' 3'- TA CTC AGG ACT CAT -5'
	<i>PstI</i> linker1	CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA
	<i>PstI</i> linker2	TGT ACG CAG TCT AC
	<i>PstI</i> adapter	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA -3' 3'- CAT CTG ACG CAT GT -5'
<b>preamplifikacija</b>	<i>MseI</i>	GAT GAG TCC TGA GTA A
	<i>PstI</i>	GAC TGC GTA CAT GCA G
<b>selektivna amplifikacija</b>	<i>PstI</i> -AGA-6-FAM	GAC TGC GTA CAT GCA G AGA - 6-FAM
	<i>MseI</i> -CAG	GAT GAG TCC TGA GTA A CAG
	<i>PstI</i> -ACA-6-FAM	GAC TGC GTA CAT GCA G ACA - 6-FAM
	<i>MseI</i> -CAG	GAT GAG TCC TGA GTA A CAG

#### Agarozna gelska elektroforeza

Gelsko elektroforezo uporabljamo za razporejanje različnih dolžin fragmentov DNA. Rahlo negativno nabita molekula DNA (zaradi negativnih fosfatnih skupin) potuje skozi pore agaroznega gela proti anodi. Ker krajši fragmenti DNA hitreje potujejo skozi pore agaroze, se fragmenti razporedijo po agaroznem gelu, kjer manjši fragmenti potujejo dlje in so bližje anodi, daljši fragmenti pa počasneje in so bližje katodi. Gelska elektroforeza lahko razporedi DNA fragmente v velikostnem razponu od 100 do 50000 bp (Brown 2002).

Z agarozno gelsko elektroforezo smo testirali uspešnost selektivne amplifikacije. Uspešnost selektivne amplifikacije se na agaroznem gelu vidi po prisotnosti različno dolgih fragmentov DNA, ki se kažejo kot lise na različnih dolžinah. Uporabili smo 1% agarozni gel, ki smo ga pripravili z 1,25 g agaroze in 125 mL 5x TBE pufru, zmešali v erlenmajerici in v mikrovalovni pečici segrevali 2-3 minute. Zmes smo ohladili na približno 60 °C in vlili v kalup elektroforeze, vstavili glavničke za izdelavo luknjic, kamor nanese mešanico z DNA in ohladili. Gel smo preložili v kad elektroforeze, napolnjeno z 0,5x TBE pufrom. V luknjice smo nanese predhodno pripravljeno mešanico 2 µL selektivne amplifikacijske mešanice in 2 µL nanašalnega barvila (6X Loading Dye,

Fermentas). Elektroforezo smo priklopili na vmesnik (BioRad) za 15 minut na napetost 60 V ter 50 min na napetost 90 V. Po končani elektroforezi smo agarozni gel potopili za 15 – 20 minut v TBE pufer z dodanim etidijevim bromidom (EtBr). EtBr se veže med dušikove baze DNA in je pod UV svetlobo dobro viden. Po 20 minutah smo gel spirali z vodo in slikali z UV- transiluminatorjem Uvitec, MiniBis in programsko opremo GelCapture.

Vzorci selektivne amplifikacije, ki so se na sliki gela izkazali kot uspešni, smo pripravili za genotipizacijo na kapilarnem sekvenatorju

#### *Kapilarna elektroforeza*

1  $\mu\text{L}$  vzorca (z uspešno selektivno amplifikacijo) smo dodali 10,7  $\mu\text{L}$  formamida (ki denaturira dvoverižno DNA) in 0,3  $\mu\text{L}$  dolžinskega standarda GeneScan-LIZ 500 (Applied Biosystems). Mešanico smo segrevali 5 min na 95 °C, da je potekla denaturacija in nastala enoverižna DNA ter 5 min ohlajali na ledu.

Vzorci smo genotipizirali s 4-kapilarnim sekvenatorjem ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Pridobljeni rezultati so elektroferogrami, ki prikazujejo prisotnost ali odsotnost določenega lokusa. Matriki odsotnosti in prisotnosti AFLP vrhov (1/0) sta podani v Prilogi A (kombinacija *PstI*-AGA-6-FAM + *MseI*-CAG ) in Prilogi B (kombinacija *PstI*-ACA-6-FAM + *MseI*-CAG).

### **3.2.4 Obdelava podatkov**

Pridobljene rezultate – elektroferograme smo analizirali v programu Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems). V analizo smo vključili lokuse z minimalno amplitudo 70 relativnih fluorescenčnih enot – RFU. Lokusi imajo razpon dolžin od 60 – 469 bp pri prvi kombinaciji *PstI*-AGA-6-FAM + *MseI*-CAG in 58 – 312 bp pri drugi kombinaciji *PstI*-ACA-6-FAM + *MseI*-CAG. Prisotnost lokusa smo označili z 1, odsotnost z 0.

*"Error rate"* - stopnja napake

Izračunali smo stopnjo napake po Bonin in sod. (2004). Za izračun stopnje napake smo uporabili osem ponovljenih vzorcev prve kombinacije in šest ponovljenih vzorcev druge kombinacije. Stopnjo napake smo izračunali kot količnik števila razlik med ponovljenimi vzorci (1/0 ali 0/1) in številom ujemanj (1/1 ali 0/0).

*Analiza glavnih koordinat*

Na začetku smo uporabili metodo analize glavnih koordinat (PCoA) ter preverili, kako se prodobljeni podatki razporejajo v dvodimenzionalnem prostoru. PCoA je multivariatna tehnika, kjer v dvo- ali večdimenzijskem izboru podatkov (kot na primer lokusi) izpostavimo nekaj glavnih osi, ki v največji meri razlagajo variabilnost podatkov. Prvi dve ali tri osi razlagajo največji odstotek variabilnosti, vsaka naslednja os razlaga proporcionalno manjši delež variacije. Rezultat je graf, kjer prikazuje razporeditev podatkov glede na dve ali tri osi z največjim deležem razlage variabilnosti (Peakall in Smouse 2012b). Analizo glavnih koordinat smo opravili na podlagi parnih vrednosti genetskih razdalj.

## 3.2.4.1 Statistična obdelava podatkov s programom GenAlEx 6.5

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli s programom GenAlEx 6.5 (Peakall in Smouse 2012a), kjer smo določili število polimorfnih lokusov, odstotek polimorfnih lokusov, Nei-jevo genetsko razdaljo, Shannonov indeks raznolikosti, stopnjo genetskih razlik ter izvedli Mantelov test in analizo molekularne variance (AMOVA).

*Nei-jeva genetska razdalja*

Je mera genetske razdalje ( $D$ ), opisana v enačbi (1) in temelji na genetski diferenciaciji v frekvenci alelov med dvema populacijama (Nei 1972). Kadar je genetska razdalja med dvema populacijama 0, sta si ti popolnoma enaki, kadar je vrednost 1, sta populaciji popolnoma različni.

$$D = -\ln \frac{\sum_{j=1}^n x_i y_i}{\sqrt{(\sum_{j=1}^n x_i^2)(\sum_{j=1}^n y_i^2)}}, \quad (1)$$

kjer sta  $x_i$  in  $y_i$  frekvenci  $j$ -tega alela v populaciji  $x$  in  $y$  in  $n$  je število alelov lokusa.

*Mantelov test*

Mantelov test je neparametrični test, s katerim v populacijski genetiki ocenjujemo razmerje med geografsko in genetsko oddaljenostjo vzorcev. Korelacijo med dvema različnima matrikama (geografska in genetska) s preprosto enačbo (2) podajamo kot:

$$Z_m = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_{ij} \times y_{ij} \quad , \quad (2)$$

kjer  $x_{ij}$  in  $y_{ij}$  opredeljujemo kot genetsko in geografsko razdaljo med populacijama  $i$  in  $j$ .

$Z_m$  podaja seštevek vseh produktov razdalj glede na število populacij, izbranih v študiji (Diniz-Filho in sod. 2013). Mantelov test poda vrednost  $r_{xy}$  (Pearsonov koeficient korelacije), ki ima vrednosti med  $-1 \leq r_{xy} \leq 1$ . Če je vrednost  $r_{xy}$  bližje -1, imata vrednosti genetske in geografske razdalje negativno korelacijo, vrednost bližje 1 nakazuje na pozitivno korelacijo – z večanjem geografske oddaljenosti se večja tudi genetska razdalja med populacijami. Če se vrednost  $r_{xy}$  približuje 0, ni značilne povezave med podatki (Peakall in Smouse 2012b). Z Mantelovim testom smo ugotavljali korelacijo med genetsko diferenciacijo ( $\Phi_{PT}$ ) in geografsko razdaljo.

*AMOVA – analiza molekularne variance*

Je analiza, ki nam pove komponente variance med populacijami. Varianca in genetska diferenciacija med populacijami je predstavljena v enačbi (3) in je podana kot  $\Phi_{PT}$  - Phi<sub>PT</sub> (analogen  $F_{ST}$ ).

$$\Phi_{PT} = \frac{V_{AP}}{(V_{AP} + V_{WP})} \quad , \quad (3)$$

kjer je  $V_{AP}$  varianca med populacijami in  $V_{WP}$  varianca znotraj populacij.

Uporabljamo jo na različnih hierarhičnih stopnjah (populacije, regije). Kadar je  $\Phi_{PT} = 0$ , med populacijami ni genetske diferenciacije. Če genetska diferenciacija med populacijami obstaja, je  $\Phi_{PT} > 0$  (Excoffier in sod. 1992, Peakall in Smouse 2012b). Z analizo AMOVA smo v programu GenAlEx 6.5 na podlagi 9999 permutacij izračunali  $\Phi_{PT}$  med posameznimi populacijami ter variacijo med in znotraj populacij.



### 3.2.4.2 STRUCTURE, CLUMPP 1.1.2., DISTRICT 1.1.

Število populacij (oz. subpopulacij) smo določili s programom STRUCTURE (Pritchard in sod. 2000). STRUCTURE uporablja metodo grupiranja, kjer vsak posamezni osebek dodeli najbolj verjetni populaciji. Na podlagi posebnega modela mešanja (ang. *admixture model*) lahko en vzorec dodeli tudi dvema ali več populacijam, saj lahko prepozna pripadnost genotipa večjim številu populacij (Pritchard in sod. 2000). Prilagodili smo nastavitve analize programa STRUCTURE. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) metodo smo nastavili na 10.000.000 generacij. MCMC metoda vsebuje algoritme, ki sestavljajo verigo verjetnosti distribucij posameznih vzorcev. Kvaliteta verjetnih distribucij se večja z večanjem generacij po verigi, zato smo prvih 100 000 generacij zavrgli. Uporabili smo model mešanja in korelacijo alelnih frekvenc (ang. *allele frequency correlation*). Določili smo najmanjše in največje število potencialnih skupin - klastrov (K) in tako izbrali  $K = 1-5$ .

Najbolj verjeten K smo določil s pomočjo programa STRUCTURE HARVESTER Web v0.6.94 (Earl in von Holdt 2012). STRUCTURE HARVESTER najverjetnejše število skupin posameznikov ( $\Delta K$ ) določi po metodi Evanno in sod. (2005).

V programu CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson in Rosenberg 2007) smo določili najbolj primerno strukturiranost populacij z naključnim zaporedjem vnosa, uporabo algoritma Greedy (uporabimo ga, ko pričakujemo  $K \geq 3$ ) in 1000 ponovitvami algoritma. Program DISTRICT 1.1 (Rosenberg 2004) smo uporabili za grafični prikaz rezultatov programa STRUCTURE.

### 3.2.4.3 BAPS 6.0

BAPS 6.0 (Corander in sod. 2008) je program za Bayesovo analizo genetske populacijske strukture. Program predvideva genetsko strukturiranost tarčnih populacij in temelji na dodelitvi molekularne variance vsaki (sub)populaciji na podlagi ločenih verjetnosti distribucij posameznih lokusov – določi verjetnost, da je nek alel določenega lokusa prisoten pri posamezniku, ki prihaja iz neke (sub)populacije. BAPS ustvari K skupin s posamezniki, ki so si med seboj genetsko najbolj podobni in jih geografsko prikaže z Voronoievim diagramom. To je diagram, izrisan iz celic, ki predstavljajo posamezne (sub)populacije in imajo v središču točko (koordinate). Meja med sosednjima celicama je izrisana tako, da je enako oddaljena od točk obeh celic. Analiza je izvedena na ravni skupine ali posameznika (Corander in sod. 2008). V programu BAPS smo določili število klastrov ter z Voronoievim diagramom geografsko predstavili strukturiranost populacij.

#### 3.2.4.4 Barrier vs. 2.2

Barrier vs. 2.2 (Manni in sod. 2004) je program, ki povezuje genetske in geografske razdalje in jih testira s prostorsko korelacijo in regresijskimi metodami. Program izriše poligon - geografsko predstavitev vzorčnih lokacij s pomočjo Voronoievega diagrama in nanj izriše možne genetske bariere. Genetske bariere določi s pomočjo Monmonierjevega algoritma največjih razlik tako, da določi meje med celicami diagrama (populacijami), kjer so razlike med pari populacij največje (Manni in sod. 2004). S programom Barrier vs. 2.2 smo izrisali Voronoiev diagram z geografsko predstavitvijo petih populacij vrste *M. tommasinii* in med njimi umestili možne bariere. Kot vhodne podatke smo uporabili AMOVA in genetske razdalje, pridobljene s programom GenAlEx 6.5. Število barrier določimo sami, izbrali smo izris ene in dveh barrier.

#### 3.2.4.5 SplitsTree4 V4.1.3.1

SplitsTree4 (Hudson in Bryant 2006) izriše NeighborNet drevo na podlagi razcepitev med posamezniki znotraj taksona. Na podlagi matrike prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov (matrika z aleli 1/0) odcepi posameznike, ki so si od ostalih najbolj različni in postopek ponavlja, dokler ne razdeli vseh posameznikov. Rezultat je nekoreninjeno filogenetsko drevo, ki pa ne prikazuje zadnjega skupnega prednika, temveč odraža le sorodnost med posameznimi razvejišči (Hudson in Bryant 2006). Potrebna oblika vhodne datoteke je .nex (Nexus), katero smo iz matrike 1/0 ročno izdelali. S programom SplitsTree4 smo izračunali filogenetsko raznolikost treh podskupin, ki jih vizualno razdeli nekoreninjeno drevo: prva skupina je Glinščica (GL), druga Črni Kal (CK), Osp OSP) in Podpeč (PP) in tretja skupina Istrske toplice (IT).

Filogenetska raznolikost (PD) je mera biodiverzitete, ki vključuje filogenetske razlike med skupinami in je izračunana kot seštevek razvejišč poti minimalnega razvejanja vseh vej (ang. *minimum spanning path*) z vzorci, ki pripadajo posamezni skupini. Podamo jo z enačbo (4):

$$PD = (N - 1) * n \quad , \quad (4)$$

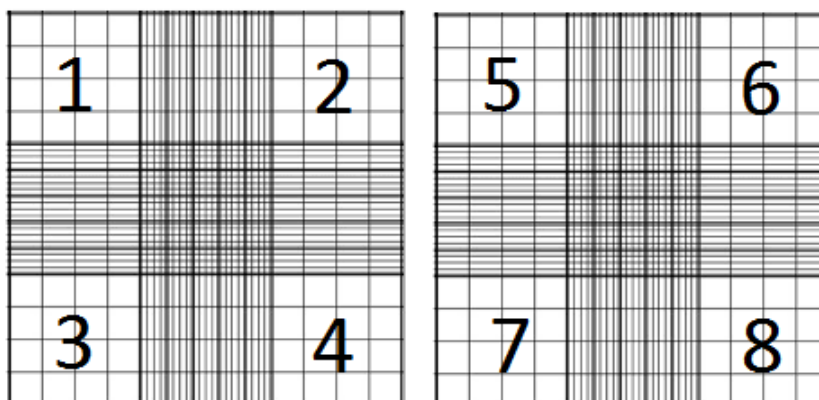
kjer je  $N$  število taksonov (vzorcev) v izbrani skupini in  $n$  je število vseh razvejišč poti minimalnega razvejanja (Faith 1992). V primeru nekoreninjenega drevesa je  $n$  seštevek verjetnosti, ki jih imajo posamezna razvejišča med dvema taksonoma (Hudson in Bryant 2006).

### 3.3 Razmerje števila pelodnih zrn in jajčnih celic

#### 3.3.1 Priprava vzorcev ter štetje jajčnih celic in pelodnih zrn

Pod lupo smo razdrli cvet in odprli plodnico ter prešteli število jajčnih celic za vsak posamezen cvet. Vsakemu cvetu smo pod lupo prešteli prašnike, jih odstranili in jih skupaj prenesli v mikrocentrifugirko. Dodali smo 1 mL očetne kisline ter pustili stati nekaj dni, da kislina razžre stene prašnic, a peloda ne poškoduje. Po nekaj dneh smo mikrocentrifugirke s prašnicami temeljito premešali (vorteksirali) in centrifugirali 3 minute na 10000 rpm. Odvečno kislino smo odlili, prašnike in pelod v mikrocentrifugirki smo spirali z 1,5 mL 95% etilnega alkohola, temeljito premešali in centrifugirali na 10000 rpm. Po centrifugiranju smo odlili alkohol in postopek še dvakrat ponovili. Po končanem spiranju smo pustili mikrocentrifugirke s pelodom odprte, da ves alkohol izhlapi. Pelodu smo dodali 50  $\mu$ L destilirane vode.

Pelodna zrna smo šteli s pomočjo hemocitometra (Neubauer Improved). Neubauer hemocitometer ima dve mreži (Slika 8) in vsaka ima po devet kvadratov. Pelod smo šteli v označenih osmih kvadratih na dveh mrežah. Pelodna zrna, ki so se nahajala na zgornji in levi meji kvadrata nismo šteli, zrna na spodnji in desni meji pa smo pri štetju upoštevali. Volumen v vsakem kvadratu je znan (0,10  $\mu$ L). Količino peloda v osmih kvadratih in skupnem volumnu 0,80  $\mu$ L smo preračunali na volumen celotne raztopine 50  $\mu$ L.



**Slika 8:** Mreža hemocitometra (Neubauer Improved) ter označeni kvadrati (1-8), kjer smo šteli pelodna zrna.

Razmerje med pelodnimi zrn in jajčnimi celicami (P/O) smo izračunali po Cruden (1977):

$$P/O = \frac{\text{Število peloda/cvet}}{\text{Število jajčnih celic/cvet}} \quad (5)$$

Izmerili smo 20 polprašnic iz dveh populacij (Črni Kal, Istrske toplice 1) Tommasinijeve popkorese in 35 polprašnic iz štirih populacij mahovne popkorese (Rakitovec, Snežnik, Črni Kal in Srednja Vas v Bohinju). Polprašnice smo izmerili z okularnim mikrometrom na mikroskopu pod 40x povečavo. Potrebno je poudariti, da meritve polprašnic niso bile izvedene na prašnikih, pri katerih smo šteli vsebnost pelodnih zrn, ampak smo meritev izvedli na drugem izboru cvetov obeh vrst.

### 3.3.2 Statistična obdelava podatkov v programu IBM SPSS Statistics 20

Rezultate smo obdelali v statističnem programu IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp. 2011).

Določili smo povprečno število pelodnih zrn, jajčnih celic in P/O razmerja po populacijah in povprečje pri obeh vrstah *M. tommasinii* in *M. muscosa* ter vrednosti grafično prikazali z okviri z očali (ang. *boxplot*).

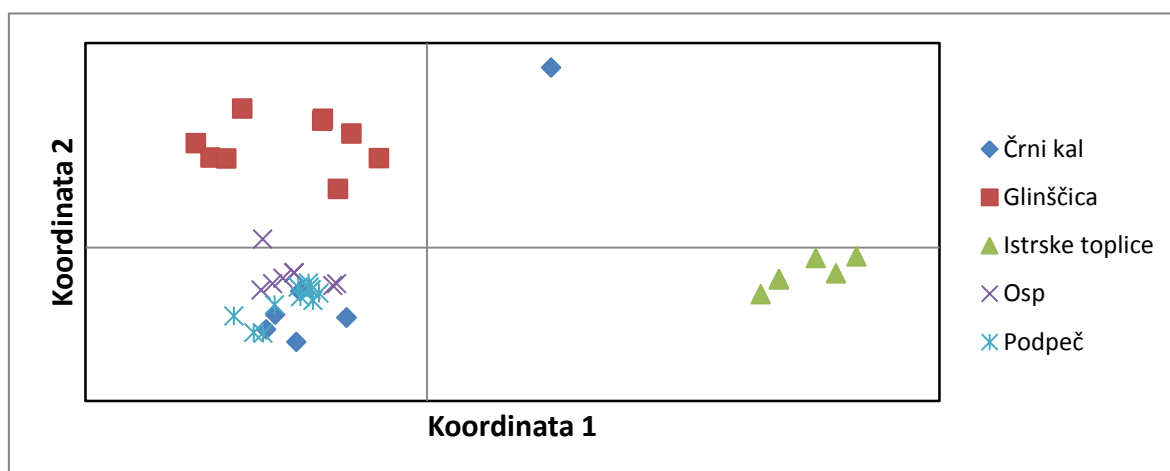
Nato smo testirali, ali so podatki normalno porazdeljeni. Uporabili smo 1-sample Kolmogorov-Smirnov test. Ker so se podatki izkazali kot normalno porazdeljeni (Asymp. Sig. (2-tailed) > 0,05), smo naredili enosmeren ANOVA test. ANOVA primerja povprečne vrednosti dveh ali več skupin in nam pove, ali se povprečja posameznih skupin (lahko tudi le ene skupine) med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p$ ). Poda tudi vrednosti  $F$ , ki nam povedo razmerje med varianco med skupinami in varianco znotraj skupin. Naredili smo POST HOC test (Scheffé in Bonferroni) in določili, katere populacije se med seboj statistično razlikujejo ( $p < 0,05$ ). Test primerja paroma vsako populacijo in določi statistično značilno razlikovanje med dvema populacijama ob znatno ostrejših kriterijih tveganja.

## 4 REZULTATI

### 4.1 AFLP analiza

V analizi smo uporabili 44 vzorcev iz 5 lokacij. Uporabili smo dve kombinaciji začetnih oligonukleotidov in pridobili 82 vrhov AFLP (lokusov): 55 lokusov (od tega 30 polimorfnih) s kombinacijo *Pst*I-ACA-6-FAM + *Mse*I-CAG in 27 lokusov (od tega 10 polimorfnih) s kombinacijo *Pst*I-AGA-6-FAM + *Mse*I-CAG. Izračunali smo stopnjo napake po Bonin in sod. (2004). Določili smo 3,8 % stopnjo napake, kar ustreza priporočenemu intervalu stopnje napake, ki naj bi bila manjša od 5 %.

Analiza glavnih koordinat (PCoA; Slika 9) razdeli populacije v dve skupini: na prvi osi populacijo Istrske toplice loči od ostalih. Druga os razlikuje populacijo Glinščica od ostalih. Prva os razlaga 53,68 % variabilnosti podatkov, druga os 19,33 %.



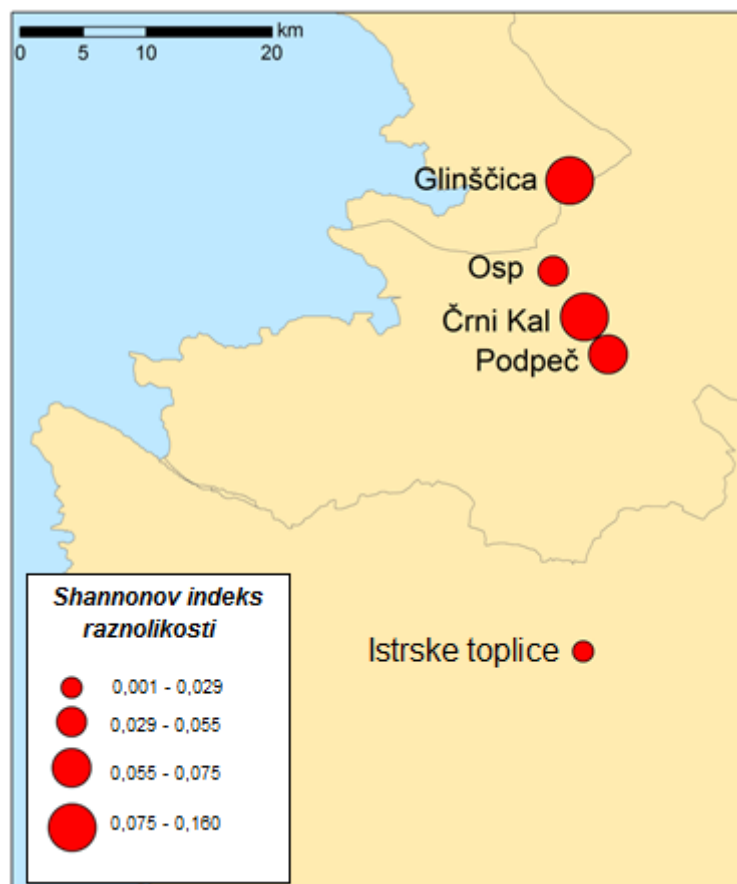
**Slika 9:** Analiza glavnih koordinat, s katero razlagamo genetsko variabilnost med vzorci petih populacij Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii*). Prva os razloži 53,68 % genetske variabilnosti, druga os 19,33 %.

Preglednica 4 vsebuje predstavljene parametre opisne statistike. Izračunali smo Shannonov indeks raznolikosti, ki največjo raznolikost pripisuje populaciji Glinščica ( $0,155 \pm 0,027$  SE), najmanjšo pa v populaciji Istrske toplice ( $0,029 \pm 0,014$  SE). Povprečen indeks raznolikosti je  $0,087 \pm 0,01$  SE. Genetska raznolikost posameznih populacij je grafično prikazana na Sliki 10. Določili smo odstotek polimorfnih lokusov, ki se giblje med 32 % in 4%, s povprečno vrednostjo 17,56 %. Največji odstotek polimorfnih lokusov ima

populacija Glinščica (31,71 %), najmanjšega pa populacija Istrske toplice (4,88 %). Določili smo število lokalno pogostih lokusov (ki se pojavljajo pri manj kot 50 % vzorcev). Istrske toplice - populacija z najmanjšo raznolikostjo in najmanjšim številom polimorfnihih lokusov ima prav tako najmanjše število lokalno pogostih lokusov (2), največ jih ima populacija Črni Kal (8). Črni Kal je populacija, ki ima poleg populacije Glinščica visok indeks raznolikosti ( $0,128 \pm 0,024$  SE). Samo dve populaciji imata privatne lokuse, ki se pojavljajo le znotraj lastne populacije in ne drugod. To sta Glinščica (z enim privatnim lokusom) in Podpeč (z dvema privatnima lokusoma).

**Preglednica 4:** Parametri opisne statistike posameznih populacij: Shannonov indeks raznolikosti, število vseh lokusov, odstotek polimorfnihih lokusov ter število lokalno pogostih in privatnih lokusov.

Populacija	Št. lokusov	% polimorfnihih lokusov	Št. lokalno pogostih lokusov ( $\leq 50\%$ )	Št. privatnih lokusov	Shanonov indeks raznolikosti $\pm$ SE
Glinščica	74	31,71	5	1	$0,155 \pm 0,027$
Osp	69	10,98	3	0	$0,052 \pm 0,017$
Črni Kal	75	26,83	8	0	$0,128 \pm 0,024$
Podpeč	71	13,41	4	2	$0,073 \pm 0,021$
Istrske toplice	57	4,88	2	0	$0,029 \pm 0,014$
<b>Povprečno:</b>	69	$17,56 \pm 5,04$ SE	4,4	0,6	$0,087 \pm 0,01$



**Slika 10:** Prikaz Shannonovega indeksa raznolikosti posameznih populacij Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii*).

Pri nekaterih vzorcih smo ugotovili identičen genotip. Znotraj populacije Istrske toplice so opazni trije identični genotipi vzorcev IT1, IT6, IT2; znotraj populacije Osp OSP8 in OSP2 in znotraj populacije Črni Kal CK7 in CK3. Trije vzorci z identičnim genotipom OSP10, PP58 in PP13 pripadajo dvema različnima populacijama (Osp in Podpeč).

S programom GenA1Ex 6.5 smo določili Nei-jevo genetsko razdaljo med pari populacij, predstavljena je v Preglednici 5. Bolj kot se vrednost približuje 1, bolj sta si populaciji različni. Največja genetska razdalja je prisotna med populacijo Istrske toplice in vsemi ostalimi populacijami (med 0,196 in 0,248). Od vseh sta si najbolj različni populaciji Istrske toplice in Glinščica, ki sta prav tako najbolj geografsko oddaljeni. Najbolj genetsko podobne populacije so si populacije Črni Kal, Podpeč in Osp (genetska razdalja med njimi od 0,028 do 0,034).

**Preglednica 5:** Podatki v preglednici levo spodaj predstavljajo Nei-jevo genetsko razdaljo med pari populacij Tommasinijeve popkorese. Desno zgoraj so predstavljene parne  $\Phi_{PT}$  vrednosti za ugotavljanje genetske diferenciacije med populacijami, pridobljene z analizo molekularne variance (AMOVA).

Populacije	Glinščica	Osp	Črni Kal	Podpeč	Istrske toplice
<b>Glinščica</b>	-	0,392	0,332	0,445	0,726
<b>Osp</b>	0,062	-	0,283	0,341	0,861
<b>Črni Kal</b>	0,075	0,034	-	0,215	0,731
<b>Podpeč</b>	0,079	0,030	0,028	-	0,814
<b>Istrske toplice</b>	0,248	0,224	0,196	0,222	-

Genetsko strukturiranost vrste smo ugotavljali s pomočjo vrednosti  $\Phi_{PT}$ , pridobljene z analizo molekularne variance (Preglednica 5). Največja genetska diferenciacija oz. stopnja genetskih razlik se pojavlja med populacijo Istrske toplice in vsemi ostalimi populacijami ( $0,726 < \Phi_{PT} < 0,861$ ). Povprečna  $\Phi_{PT} = 0,581$  ( $p = 0,001$ ). Verjetnost parnih  $\Phi_{PT}$  je  $p = 0,001$ , razen med populacijama Glinščica in Črni Kal, kjer  $p = 0,004$ .

Oceno genetske diferenciacije znotraj in med populacijami smo podali na podlagi analize molekularne variance, rezultati so prikazani v Preglednici 6. Več kot polovica genetske variabilnosti se pojavlja med populacijami (58 %), malo manj kot pol pa znotraj populacij (42 %).

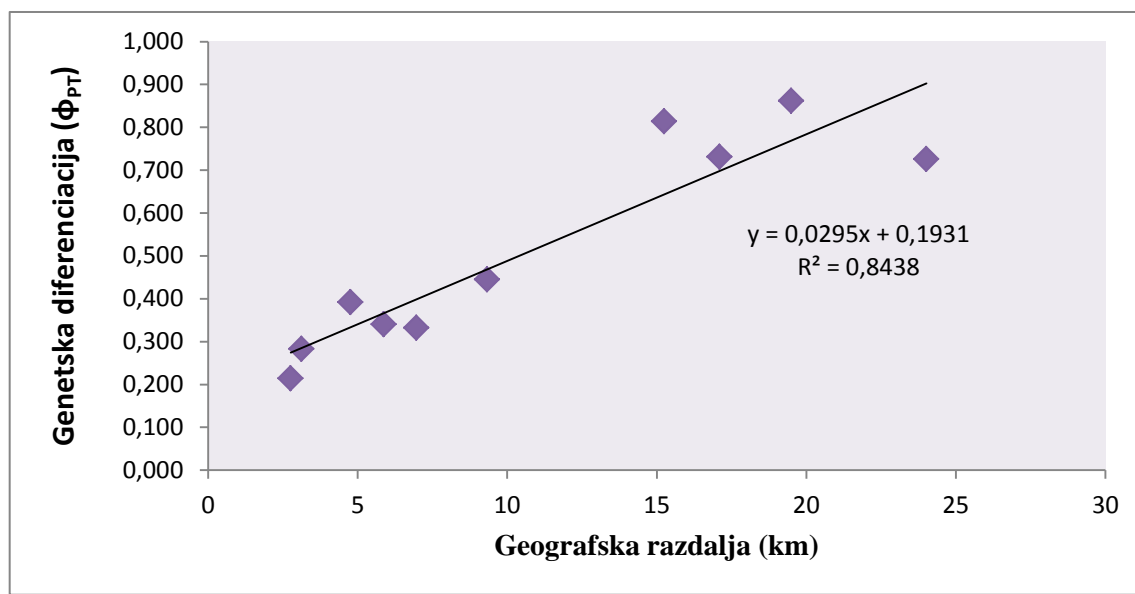
**Preglednica 6:** Analiza molekularne variance - df (stopinje prostosti), SS (vsota kvadratov), MS (srednji kvadrat) Est. Var. (ocena genetske variance), % (odstotek variance). Vrednosti so statistično značilne,  $p = 0,001$ .

Vir variabilnosti	df	SS	MS	Est. Var.	%
<b>Med populacijami</b>	4	137,079	34,270	3,635	58
<b>Znotraj populacij</b>	39	102,421	2,626	2,626	42
<b>Skupaj</b>	43	239,500		6,261	100

Korelacijo genetske diferenciacije in geografske razdalje smo ugotavljali z Mantelovim testom. Parametra imata statistično značilno pozitivno korelacijo ( $r_{xy} = 0,919$ ,  $p = 0,05$ ,  $R^2 = 0,84$ ), kar pomeni, da se z geografsko razdaljo večja genetska diferenciacija med populacijami, pozitivna korelacija je grafično prikazana na Sliki 11. Bolj kot so si populacije med seboj oddaljene, večje so genetske razlike med njimi. Manjše genetske

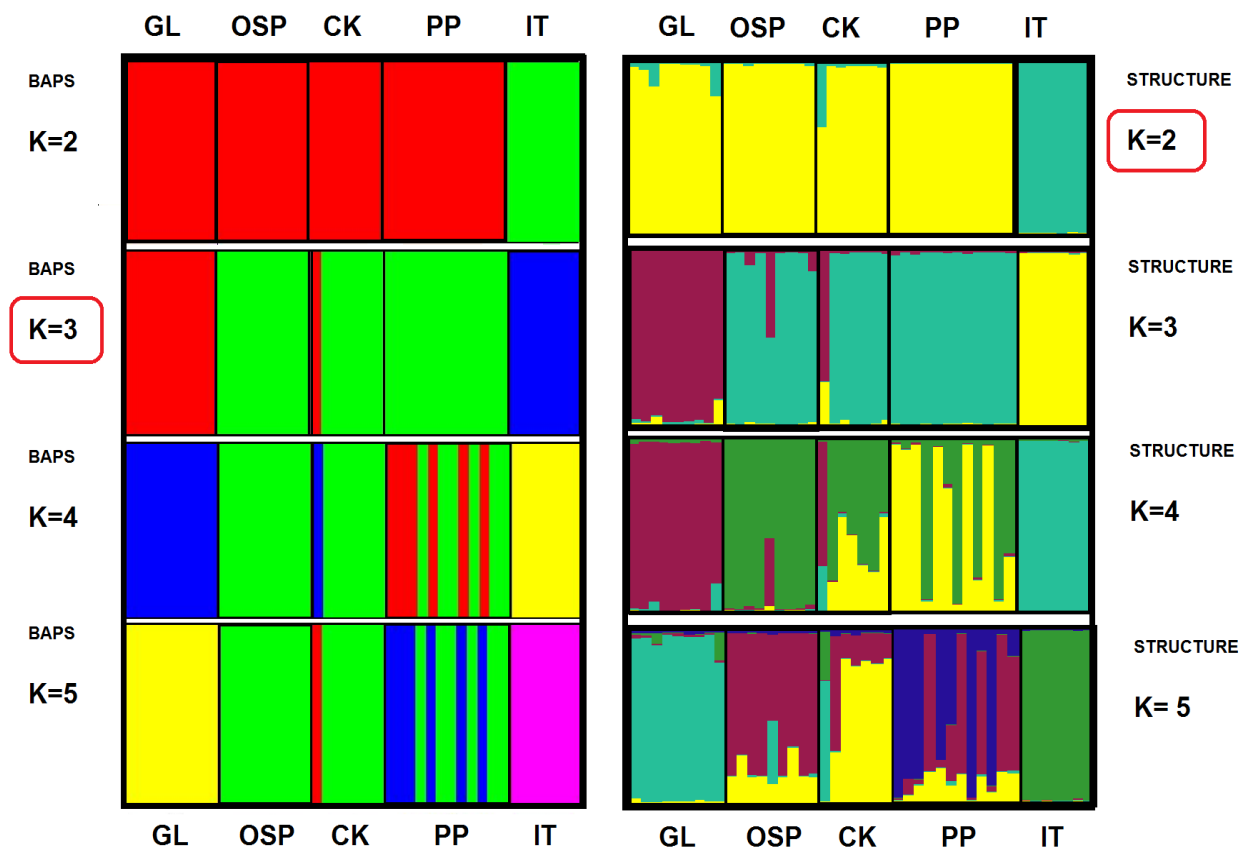


razlike prikazuje med populacijami, ki so si geografsko bližje (populacije Osp, Črni Kal, Podpeč). Največje genetske razlike se pojavljajo med geografsko najbolj oddaljenimi populacijami: populacija Istrske toplice se genetsko najbolj razlikuje od ostalih, oddaljenih populacij.

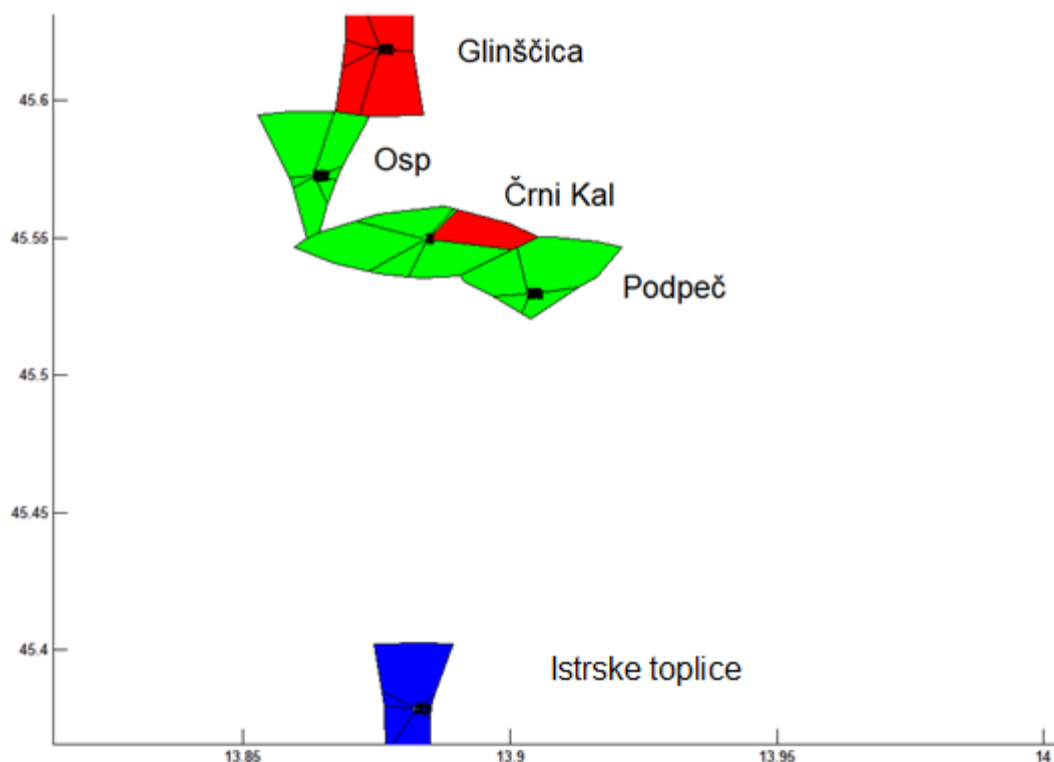


**Slika 11:** Rezultati Mantel testa kažejo na statistično značilno pozitivno korelacijo med genetsko diferenciacijo ( $\Phi_{PT}$ ) in geografsko razdaljo ( $r_{xy} = 0.919$ ,  $p = 0.05$ ) vzročnih populacij Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii*).

Program STRUCTURE razporedi vzorce Tommasinijeve popkorese v najprimernejše število skupin oz. klastrov ( $K$ ). Program vzorce razdeli v dve skupini ( $K = 2$ ;  $\Delta K = 700$ ) tako, da vzorce iz Istrskih toplic loči od ostalih vzorcev štirih populacij v Italiji in Sloveniji. Program BAPS z 99,3 % gotovostjo podaja  $K = 3$ . V eno skupino združuje vse vzorce iz Istrskih toplic, v drugo vzorce slovenskih populacij in v tretjo vse vzorce iz Glinščice ter en vzorec iz Črnega Kala (CK10). Prostorska razporeditev populacij za  $K = 3$ , pridobljena s programom BAPS 6, je prikazana na Sliki 13. Prikazuje pripadnost vzorcev populacijam, kjer so le-ti bili nabrani, le manjši del CK na podlagi genetskih podobnosti pripada populaciji IT. Slika 12 prikazuje strukturiranost populacij za vse možne  $K$  ( $K = 2 - 5$ ), kakršno podajata programa BAPS in STRUCTURE. Programa podajata podobno strukturiranost za vsak  $K$ , razlikujeta se le v predvidevanju števila klastrov.

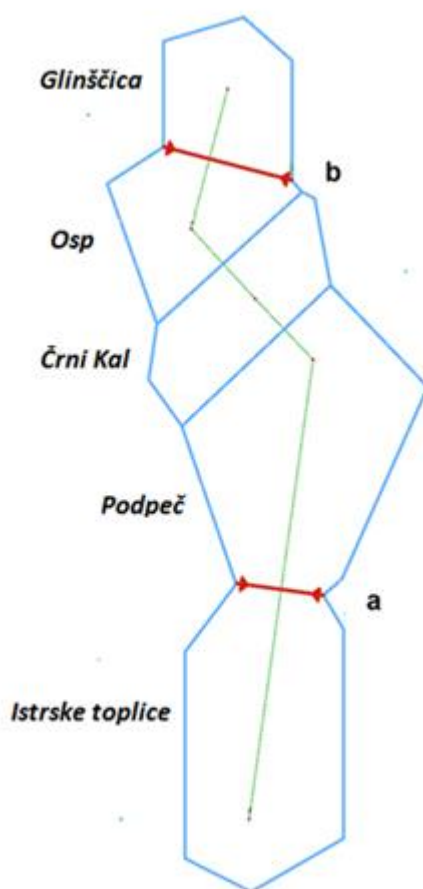


**Slika 12:** Strukturiranost populacij Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii*), prikazana za vsak možen  $K = 2-5$ ; populacije so označene z GL (Glinščica), OSP (Osp), CK (Črni Kal), PP (Podpeč) in IT (Istrske toplice). Levo: strukturiranost populacij na podlagi rezultatov programa BAPS 6, kjer je najbolj verjeten  $K=3$  in je z modro označena populacija IT, zeleno PP, CK in OSP ter z rdečo GL. Desno: strukturiranost populacij na podlagi rezultatov programa STRUCTURE, kjer je najbolj verjeten  $K=2$  in je z modro označena populacija IT in z rumeno GL, OSP, CK in PP.



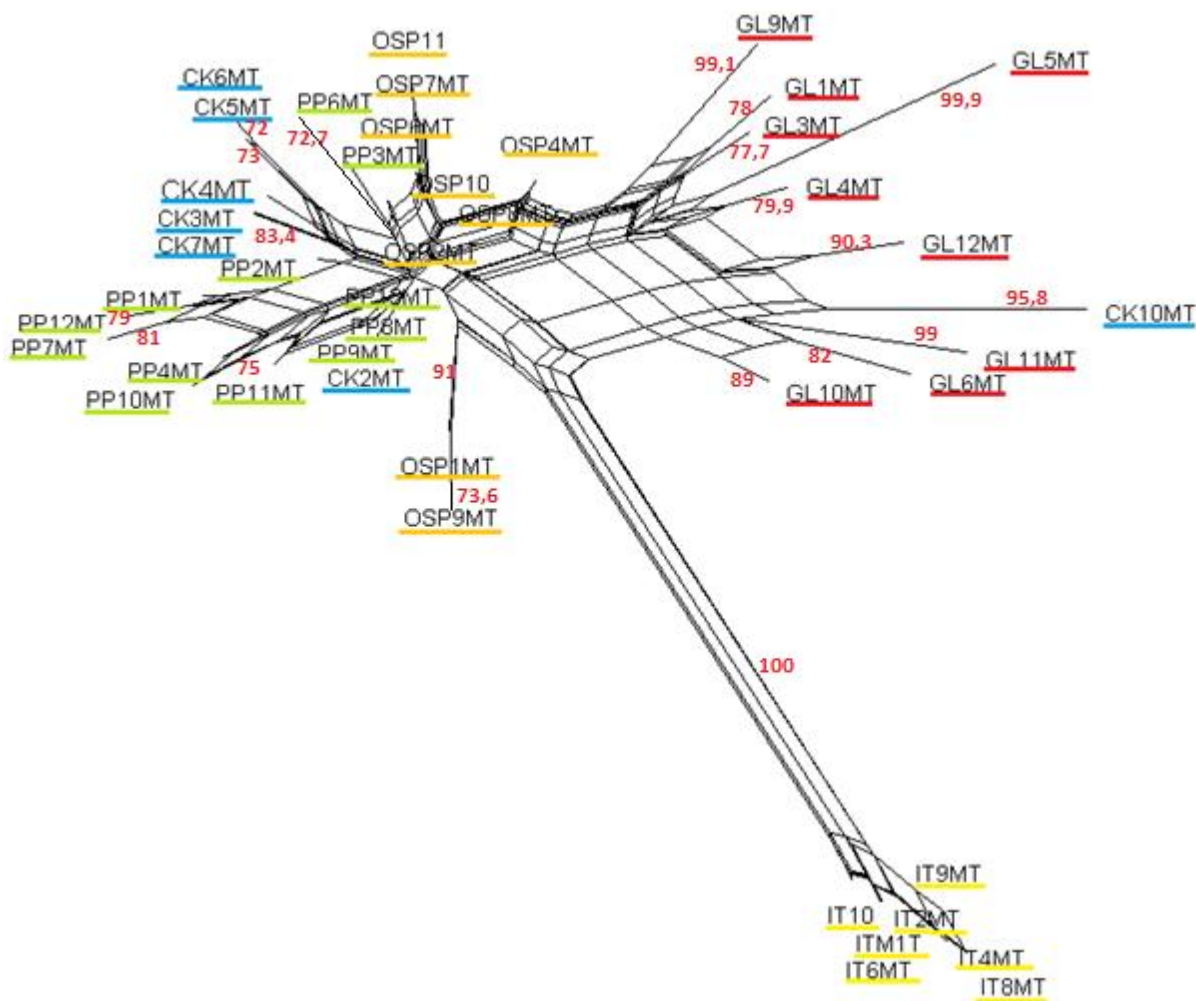
**Slika 13:** Voronoiev diagram, pridobljen s programom BAPS 6, ki prikazuje pripadnost vzorcev posameznim populacijam. Populaciji GL (rdeča) je genetsko najbolj podoben del populacije CK, prav tako obarvan rdeče. Slovenske populacije (zelena) se razlikujejo od GL in IT (modra).

S programom Barrier vs. 2.2 smo določili položaj obstoječih barier. Z uporabo dveh tipov vhodnih matrik (genetske razdalje med populacijami in parne  $\Phi_{PT}$  vrednosti) smo določili dve barieri; na Sliki 14 sta izrisani z rdečo in označeni z (a) in (b). Primarna bariera, ki jo program izriše vsakič na istem mestu z uporabo obeh matrik podatkov je bariera (a). Ta bariera ima največji pomen in razlaga potencialno odsotnost pretoka genov in izolacijo med populacijo Istrskih toplic od ostalih. Če programu odredimo izris druge bariere, nam oba tipa matrike podata bariero (b), izrisano med populacijo Glinščica in Osp. Vendar je bariera (b) sekundarna in ima tako manjši pomen kot bariera (a), vendar vseeno nakazuje na določeno mero izolacije med populacijam GL in OSP.



**Slika 14:** Voronoiev diagram, izrisan s programom Barrier vs. 2.2., kamor sta vrisani dve potencialni barieri (a in b), pridobljeni na podlagi matrik genetskih razdalj in rezultatov AMOVA. Primarna je bariera (a), ki nakazuje potencialno izolacijo med populacijo IT ter ostalimi, medtem ko je bariera (b) sekundarna in ima nekoliko manjši pomen pri opredelitvi potencialne izolacije med populacijami GL in ostalimi.

Nekoreninjena drevesa prikazujejo sorodstvene vezi med posameznimi 'listi' drevesa – v našem primeru med vzorci. Izdelali smo nekoreninjeno drevo (Slika 15), ki razporedi 44 vzorcev petih populacij Tommasinijeve popkorese. Razvejišča, ki so bližje eden drugemu, so si bolj podobna. Program SplitsTree4, kjer smo izdelali nekoreninjeno drevo, razvejišča razporedi na podlagi matrike AFLP vrhov (1/0). Najmanjšo genetsko podobnost z ostalimi populacijami SplitsTree4 določi populaciji Istrske toplice (IT), katere razvejišča so najdlje oddaljena od ostalih populacij (Slika 15). V nekoreninjeno drevo so pripisane le vrednosti metode vezenja (ang. *bootstrapping*), večje od 70.



**Slika 15:** Nekoreninjeno drevo (NeighbourNet). Prikazana je genetska podobnost med vzorci populacij Tommasinijeve popkorese: Itrske toplie (IT; rumena), Podpeč (PP; zelena), Črni Kal (CK; modra), Osp (OSP; oranžna) in Glinšica (GL; rdeča). Z rdečo so pripisane vrednosti metode vezenja (ang. *bootstrapping*), večje od 70.

Program SplitsTree4 nam poda vrednosti filogenetske raznolikosti, izračunane znotraj treh skupin, ki jih poda nekoreninjeno drevo: (1) GL, (2) OSP, CK, PP in (3) IT (Preglednica 7). Največjo filogenetsko raznolikost ima populacija Glinščica, najmanjšo Itrske toplie. Filogenetska raznolikost sovпада s Shannonovim indeksom raznolikosti – po obeh izračunih ima GL najvišje in IT najnižje določeno raznolikost.

**Preglednica 7:** Filogenetska raznolikost, izračunana na podlagi nekoreninjenega drevesa.

<b>skupina</b>	<b>filogenetska raznolikost (%)</b>
Glinščica	40
Osp, Črni Kal, Podpeč	31,5
Istrske toplice	5,4

## 4.2 Število pelodnih zrn, jajčnih celic in razmerje števila pelodnih zrn in jajčnih celic (P/O)

S programom IBM SPSS Statistics 20 (IMB Corp. 2011) smo določili povprečno število pelodnih zrn, jajčnih celic in mediano razmerja P/O med populacijami in vrstami Tommasinijeve in mahovne popkorese. Za vsako povprečje smo določili standardno deviacijo ter minimalno in maksimalno vrednost, ki se pojavlja znotraj populacije/vrste pri posameznih vzorcih. Vrednosti so predstavljene v Preglednici 8. Največje povprečno število pelodnih zrn ( $11499,9 \pm 5228,3$  SD) in razmerja P/O (Me = 1720) se pri vrsti *M. tommasinii* pojavlja pri rastlinah, nabranih na nahajališču Istrske toplice 1. Znotraj vrste *M. muscosa* ima največje razmerje P/O populacija Rakitovec (Me = 709), najmanjše pa populacija Snežnik (Me = 505), Snežnik ima na ravni obeh vrst prav tako največje povprečno število jajčnih celic (9). Če primerjamo obe vrsti, ima najmanjše povprečno število jajčnih celic ( $6,6 \pm 1,9$  SD) in razmerje P/O (Me = 663) populacija Glinščica. Število prašnikov je pri obeh vrstah enako (Me = 8). Skupno število prašnikov obeh vrst variira med 4 in 11 prašnikov na cvet.

Če primerjamo Tommasinijevo in mahovno popkoreso, ima večjo mediano razmerja P/O *M. tommasinii* (Me = 820), *M. muscosa* ima mediano razmerja P/O Me = 656. Posledično je razumljivo večje povprečno število pelodnih zrn *M. tommasinii* (6762,2) in nekoliko manjše povprečno število jajčnih celic (*M. tommasinii* 7,5; *M. muscosa* 8).

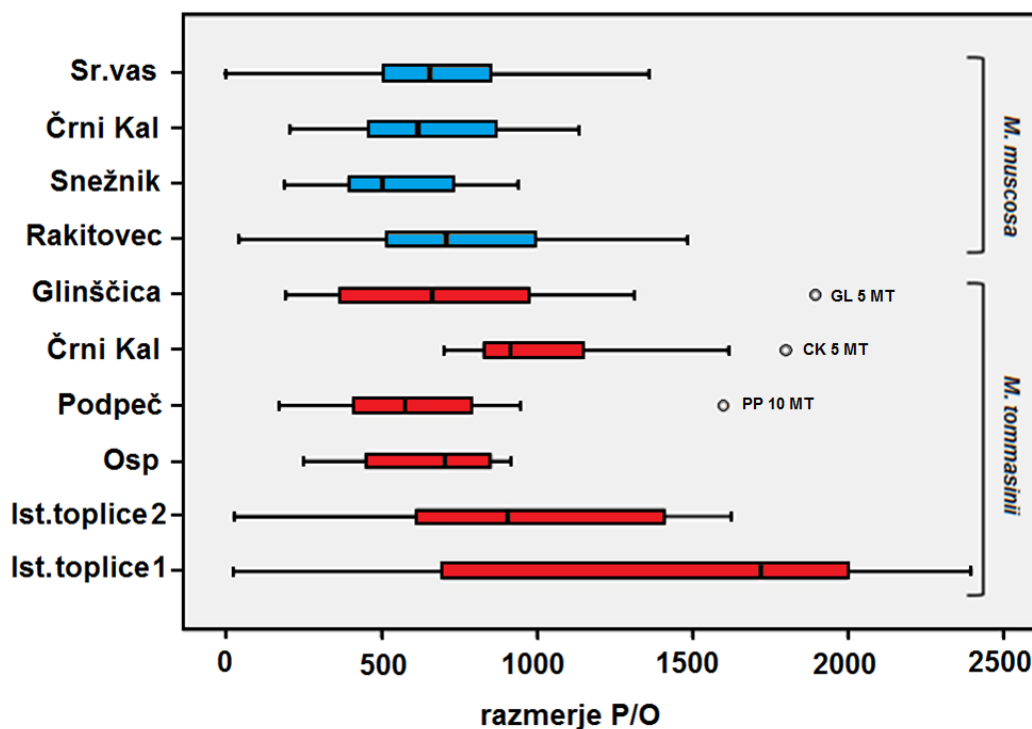
**Preglednica 8:** Povprečje ( $\bar{x}$ ) števila pelodnih zrn, jajčnih celic in mediana (Me) razmerja P/O pri posameznih populacijah in pri vrstah *M. tommasinii* in *M. muscosa*. Podana je standardna deviacija (SD) ter minimalna in maksimalna vrednost znotraj populacije.

Vrsta	Populacija	Pelodna zrna			Jajčne celice			Razmerje P/O	
		$\bar{x}$	SD	min/max	$\bar{x}$	SD	min/max	Me	min/max
<i>M. tommasinii</i>	Ist. toplice 1	11499,9	5228,3	125 / 19625	8,1	2,4	5 / 13	1720	25 / 2396
	Ist. toplice 2	6966,1	4306,3	188 / 12812	7,6	0,8	7 / 9	906	27 / 1625
	Osp	4767,1	1820,4	1750 / 7125	7,5	0,7	6 / 8	705	250 / 917
	Podpeč	4578,2	1770,2	1375 / 8000	7,5	0,8	5 / 8	576	172 / 1600
	Črni Kal	7491,6	1823,7	4188 / 10625	7,3	1,1	5 / 8	914	703 / 1800
	Glinščica	4499,9	2478,7	1562 / 10500	6,6	1,9	3 / 8	663	195 / 1896
<i>M. muscosa</i>	Rakitovec	5928,2	2503,3	438 / 10375	8,3	1,3	6 / 12	709	44 / 1482
	Snežnik	4804,6	2283,2	1875 / 9562	9	1,8	7 / 12	505	188 / 938
	Črni Kal	4750,1	1983,9	1250 / 9000	7,3	1,6	4 / 11	617	208 / 1134
	Srednja Vas	4924,9	2219,2	0 / 9062	7,4	1,1	4 / 8	656	0 / 1359
<i>M. tommasinii</i>	SKUPAJ	6762,2	4001,26	125 / 19625	7,47	1,456	3 / 13	820	25 / 2396
<i>M. muscosa</i>	SKUPAJ	5160,1	2281,95	0 / 10375	8,03	1,578	4 / 12	656	0 / 1482

S pomočjo srednjih logaritamskih vrednosti razmerja P/O (Priloga C) vrst *M. tommasinii* ( $\log P/O = 2,86$ ) in *M. muscosa* ( $\log P/O = 2,73$ ) na podlagi Cruden-a (1977) opredeljujemo vrsti kot fakultativno ksenogamni.

Škatle z brki (ang. *boxplot*) grafično prikazujejo razmerja P/O po populacijah (Slika 16). Obarvani del škatle z brki (med 1. in 3. kvartilom) zajema polovico vrednosti razmerja P/O znotraj populacije, znotraj okvira je s črno črto označena mediana (2. kvartil), ki predstavlja sredinsko vrednost vseh vzorcev znotraj populacije.

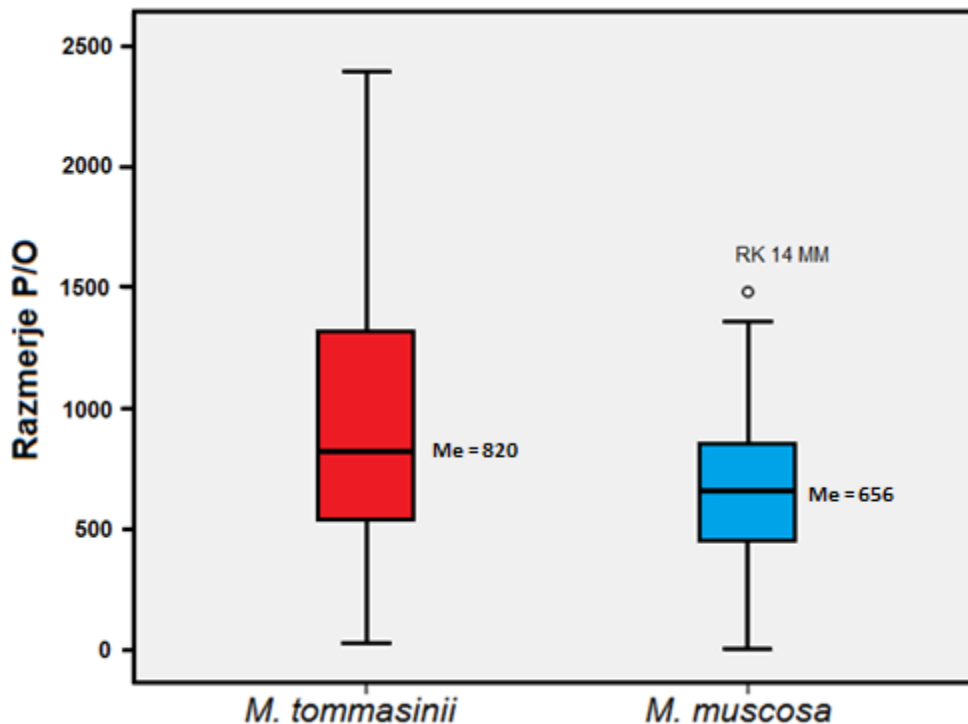
Vidimo odstopanje vzorcev, nabranih na nahajališču Istrske toplice 1 (*M. tommasinii*), saj ima večjo mediano ter razpon vrednosti razmerja P/O (od 25 do 2400). Tri iztopajoče vrednosti (ang. *outliers*) pri vzorcih GL 5 MT, CK 5 MT in PP 10 MT predstavljajo nenormalne vrednosti, ki se razlikujejo od ostalih vrednosti znotraj populacije, saj imajo nenavadno večje razmerje P/O v primerjavi z ostalimi vzorci v populaciji.



**Slika 16:** Razmerje P/O desetih populacij: štiri populacije vrste *M. muscosa* (modra) in šest populacij *M. tommasinii* (rdeča), znotraj okvira je s črno črto označena mediana (2. kvartil). Prisotne so tri izstopajoče vrednosti (ang. *outliers*) pri vzorcih GL 3 MT, CK 12 MT in PP 8 MT.



Slika 17 prikazuje primerjavo razmerja P/O med Tommasinijevo in mahovno popkoreso. Škatla z brki prikazuje večje razmerje P/O, nekoliko večjo mediano in večji razpon med minimalno in maksimalno vrednostjo P/O pri vrsti *M. tommasinii*.



**Slika 17:** Razmerje P/O pri vsaki vrsti posebej. Z rdečo je obarvan okvir (med 1. in 3. kvartilom) Tommasinijeve popkorese (*Moehringia tommasinii*), z modro okvir mahovne popkorese (*M. muscosa*). Prikazana je mediana (820 in 656) in ena izstopajoča vrednost (ang. *outlier*) – vzorec RK 14 MM.

V programu IBM SPSS Statistics 20 smo izvedli enosmerni test analize variance ANOVA; Preglednica 9 in testirali, ali obstajajo statistično značilne razlike med populacijami oz. med vrstama glede na število pelodnih zrn, jajčnih celic in razmerja P/O. Vir variabilnosti smo določili med in znotraj populacij/vrst. Statistično značilne razlike med populacijami vrste *M. tommasinii* so prisotne glede na število pelodnih zrn ( $p < 0,001$ ) in razmerje P/O ( $p < 0,001$ ). Statistično značilne razlike med populacijami vrste *M. muscosa* so prisotne le glede števila jajčnih celic ( $p = 0,006$ ). Prav tako so statistično značilne razlike med vrstama glede na število pelodnih zrn ( $p = 0,005$ ), število jajčnih celic ( $p = 0,028$ ) in razmerje P/O ( $p = 0,001$ ).

**Preglednica 9:** Enosmerni test analize variance (ANOVA) med populacijami/vrstama glede na število pelodnih zrn, jajčnih celic in razmerja P/O. Podani so vir variabilnosti, SS (vsota kvadratov), df (stopinje prostosti), MS (srednji kvadrat/varianca), F (razmerje med varianco med skupinami in varianco znotraj skupin) in  $p$  vrednost (za statistično značilne razlike).

	<b>Vir variabilnosti</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Število jajčnih celic po populacijah</b> ( <i>M. tommasinii</i> )	Med populacijami	13,2	5	2,6	1,270	0,286
	Znotraj populacij	147,9	71	2,1		
	Skupaj	161,2	76			
<b>Število jajčnih celic po populacijah</b> ( <i>M. muscosa</i> )	Med populacijami	29,3	3	9,8	4,496	0,006
	Znotraj populacij	132,6	61	2,2		
	Skupaj	161,9	64			
<b>Število pelodnih zrn po populacijah</b> ( <i>M. tommasinii</i> )	Med populacijami	493966305,8	5	98793261,2	9,704	0,001
	Znotraj populacij	722797869,7	71	10180251,7		
	Skupaj	1216764175,5	76			
<b>Število pelodnih zrn po populacijah</b> ( <i>M. muscosa</i> )	Med populacijami	12215264,2	3	4071754,7	,797	0,500
	Znotraj populacij	311764987,6	61	5110901,4		
	Skupaj	323980251,8	64			
<b>P/O po populacijah</b> ( <i>M. tommasinii</i> )	Med populacijami	7002111,3	5	1400422,3	6,299	0,001
	Znotraj populacij	15785502,8	71	222331,0		
	Skupaj	22787614,1	76			
<b>P/O po populacijah</b> ( <i>M. muscosa</i> )	Med populacijami	316320,4	3	105440,1	1,180	0,325
	Znotraj populacij	5451488,8	61	89368,7		
	Skupaj	5767809,1	64			
<b>Število jajčnih celic po vrstah</b>	Med vrstama	11,3	1	11,3	4,912	0,028
	Znotraj vrst	323,1	141	2,3		
	Skupaj	334,4	142			
<b>Število pelodnih zrn po vrstah</b>	Med vrstama	91219852,2	1	91219852,2	8,27	0,005
	Znotraj vrst	1555236835,2	141	11030048,5		
	Skupaj	1646456687,4	142			
<b>P/O po vrstah</b>	Med vrstama	2464921,6	1	2464921,6	12,082	0,001
	Znotraj vrst	28765787,2	141	204012,7		
	Skupaj	31230708,8	142			

Izvedli smo POST HOC (Scheffe in Bonferroni) test za populacije in določili tiste, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo. Med seboj smo primerjali populacije glede na razmerje P/O in za statistično značilno razlikovanje določili  $p < 0,05$ . Rezultati so prikazani v Preglednici 10; zgoraj desno so prikazane  $p$  vrednosti testa Scheffe, spodaj levo pa  $p$  vrednosti testa Bonferroni. IT1 je edina populacija, ki se statistično značilno razlikuje od štirih populacij vrste *M. tommasini*. S Scheffe testom smo dokazali statistično značilno razlikovanje med populacijami Istrske toplice 1 in OSP ( $p = 0,003$ ), PP ( $p < 0,001$ ) in GL ( $p = 0,032$ ). Bonferroni test je odkril še četrto statistično značilno razlikovanje med

populacijama IT1 in IT2 ( $p = 0,044$ ). POST HOC test je podoben rezultat pokazal ob primerjavi populacij vrste *M. tommasinii* glede na število pelodnih zrn, statistično značilnih razlikovanj med populacijami vrste *M. muscosa* ni (podatki niso prikazani).

**Preglednica 10:** Določitev statistično značilno različnih populacij vrste *M. tommasinii* glede na razmerje P/O ( $p < 0,05$ ). Izvedena POST HOC testa Scheffe in Bonferronii prikazujeta  $p$  vrednosti za statistično značilno razlikovanje med populacijami vrste *M. tommasinii*. Zgoraj desno so prikazane  $p$  vrednosti testa Scheffe, spodaj levo pa  $p$  vrednosti testa Bonferroni.

Populacije	GL	OSP	CK	PP	IT1	IT2
GL	-	0,994	0,860	0,989	0,997	<b>0,032</b>
OSP	1,00	-	0,471	1,00	0,898	<b>0,003</b>
CK	1,00	0,525	-	0,339	0,987	0,294
PP	1,00	1,00	0,281	-	0,848	<b>0,001</b>
IT1	1,00	1,00	1,00	1,00	-	0,105
IT2	<b>0,009</b>	<b>0,001</b>	0,222	<b>0,001</b>	<b>0,044</b>	-

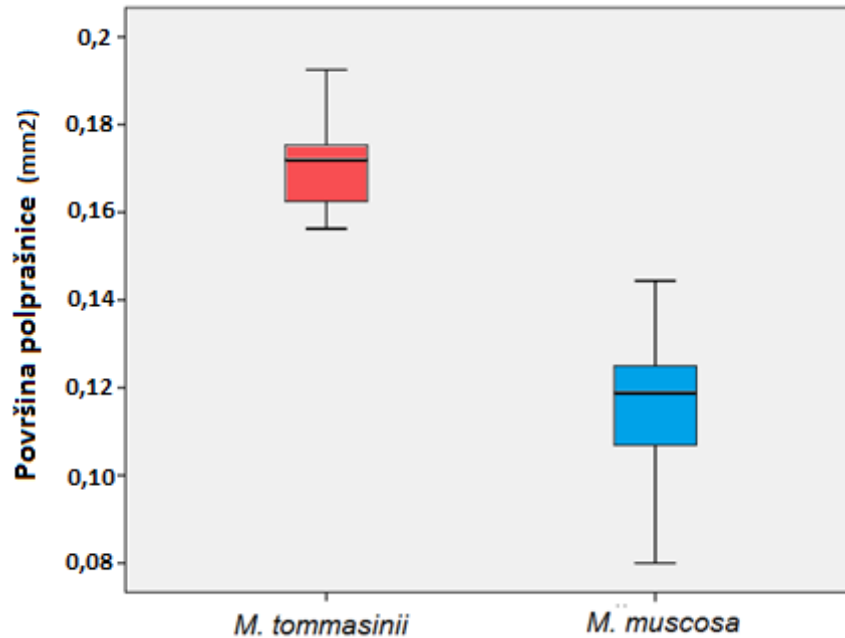
Primerjali smo, ali se površina polprašnic obeh vrst statistično značilno razlikuje. Polprašnice smo izmerili pri populacijah Istrske toplice 1 in Črni Kal (*M. tommasinii*) ter Rakitovec, Snežnik, Črni Kal in Srednja Vas v Bohinju (*M. muscosa*). Enosmerni test ANOVA je razkril statistično značilno razlikovanje ( $p < 0,001$ ) površine polprašnic med vrstama *M. tommasinii* in *M. muscosa* (Preglednica 11).

**Preglednica 11:** Enosmerni test analize variance (ANOVA) med vrstama glede na površino polprašnic. Podani so vir variabilnosti, SS (vsota kvadratov), df (stopinje prostosti), MS (srednji kvadra), F (razmerje med varianco med skupinami in varianco znotraj skupin) in  $p$  vrednost (za statistično značilne razlike).

Vir variabilnosti	SS	df	MS	F	$p$
Med vrstama	0,038	1	0,038	195,2	0,001
Znotraj vrste	0,01	53	0		
Skupaj	0,048	54			

Slika 18 prikazuje razlike v površini polprašnic pri Tommasinijevi in mahovni popkoresi. Povprečje površine polprašnic Tommasinijeve popkorese (izmerjene pri 20 polprašnicah) je  $0,1705 \text{ mm}^2 \pm 0,010297 \text{ SD}$ , vrednosti površine se gibljejo od najmanjše  $0,1563 \text{ mm}^2$  do največje  $0,1925 \text{ mm}^2$ . Mahovna popkoresa ima povprečno velikost (izmerjeno pri 35

polprašnicah)  $0,115821 \text{ mm}^2 \pm 0,0156403 \text{ SD}$ , vrednosti površine se gibljejo od najmanjše  $0,08 \text{ mm}^2$  do največje  $0,1444 \text{ mm}^2$ .



**Slika 18:** Primerjava velikosti polprašnic ( $\text{mm}^2$ ) med Tommasinijevo (*Moehringia tommasinii*) in mahovno popkoreso (*M. muscosa*). Z rdečo je obarvan okvir (med 1. in 3. kvartilom) Tommasinijeve, z modro pa okvir mahovne popkorese.

## 5 DISKUSIJA

Velikost populacij se spreminja v času in prostoru in je rezultat kompleksnih interakcij med biologijo vrste (ang. *life-history*) in ekoloških ter lokalnih okoljskih dejavnikov. Velikost populacije značilno vpliva na reprodukcijski sistem, genetsko sestavo in evolucijsko dinamiko vrste. Prav genetske značilnosti s pripadajočo genetsko variabilnostjo so postale ena izmed glavnih osredotočenj varstvene biologije, predvsem varstvene genetike. Izguba genetske variabilnosti pripelje do zmanjšanja možnosti prilagajanja populacije na spreminjajoče se okoljske razmere (Falk in Holsinger 1991). Glavne evolucijske sile, ki vplivajo na genetsko variabilnost in variacijo znotraj ali med populacijami so mutacije, naravna selekcija, migracije s pretokom genov in genetski zdrs (Loveless in Hamrick 1984). Ti procesi različno vplivajo na različne populacije. Če so populacije manjše in izolirane, kar se pojavlja pri večini redkih in endemičnih vrstah, predstavlja genetski zdrs dominanten dejavnik genetske strukture populacij (Wright 1931).

Splošno je privzeto, da imajo redke in endemične rastlinske vrste manjšo genetsko variabilnost in večjo genetsko strukturiranost v primerjavi s sorodnimi, širše razširjenimi vrstami (npr. Waller in sod. 1987, Hamrick in Godt 1989, Crawford in sod. 2001, Torres in sod. 2003, Juan in sod. 2004, Nicoletti in sod. 2012), ki naj bi bila posledica majhnih in pogosto izoliranih populacij (Ellstrand in Elam 1993) in s tem povezani genetsko ozko grlo (Waller in sod. 1987, Hamrick in Godt 1989), parjenje v sorodstvu in genetski zdrs (Ellstrand in Elam 1993). Vendar nizka genetska variabilnost in visoka diferenciacija med populacijami nista vedno lastnosti redkih vrst. Young in Brown (1996), Ávila-Díaz in Oyama (2007) ter Escaravage in sod. (2011) so dokazali, da imajo lahko redke in endemične vrste veliko genetsko variabilnost in neizrazito populacijsko strukturo. Tako se genetske raznolikost in populacijske strukture ne more vedno predvidevati na podlagi velikosti populacije in areala vrste (Torres in sod. 2003). Tudi slovenske in hrvaške populacije vrste *M. tommasinii* ne kažejo povezanosti populacij (Glasnović 2013, Brana 2005) s stopnjo genetske raznolikosti, čeprav podatkov o velikosti populacije v Glinščici nimamo. Prav tako tudi Minuto in sod. (2006) niso našli pomembne korelacije med velikostjo populacije in genetsko raznolikostjo endemičnih vrst *M. lebrunii* in *M. sedoides*.

Pridobljeni rezultati genetske analize vrste *M. tommasinii* nakazujejo nekoliko manjšo genetsko raznolikost in nizek odstotek polimorfnih lokusov (Preglednica 4), prisotna je visoka stopnja variacije med populacijami (58%; Preglednica 6). Vrednost variacije med populacijami nakazuje na močno diferenciacijo med populacijami in prisotno genetsko strukturiranost populacij oziroma vrste. Ta diferenciacija se v največji meri pojavlja med populacijo Istrske toplice ter ostalimi populacijami, ki je na podlagi Nei-jeve genetske

razdalje najbolj oddaljena od ostalih (Preglednica 5). Prav tako razporeditev podatkov 53,68 % variabilnosti pripisuje ločitvi populacije Istrske toplice (PCoA; Slika 9), vendar je verjetno visok odstotek variabilnosti prve osi PCoA odraz nekoliko manjšega števila lokusov populacije Istrske toplice (57 lokusov; Preglednica 4). Bolj izrazita diferenciacija se pojavlja tudi med populacijo Glinščica in vsemi ostalimi slovenskimi populacijami (Preglednica 5). Populacija vrste *M. tommasinii* z največjo, a kljub temu relativno majhno genetsko raznolikostjo (Shannonov indeks raznolikosti je 0,155) ter z 1 privatnim in 5 lokalno pogostimi lokusi in 31.71% polimorfni lokusov je populacija Glinščica. Na podlagi Nei-jeve genetske razdalje so si med seboj genetsko najbolj podobne slovenske populacije, kar je razumljivo, saj so si geografsko nekoliko bližje in med njimi lahko prihaja do navzkrižnega opraševanja in tako do pretoka genov. Vendar je med njimi kljub temu prisotna določena mera diferenciacije, saj so populacije kljub vsemu prostorsko ločene vzdolž Kraškega roba. Lahko potrdimo hipotezo (1), saj je vrsta *Moehringia tommasinii* vzdolž svojega areala genetsko strukturirana. Ugotavljamo, da sta majhna genetska raznolikost (z majhnim odstotkom polimorfni lokusov) ter velika stopnja genetske diferenciacije znotraj vrste *M. tommasinii* skladni z ugotovitvami Hamrick-a in Godt-a (1996) o nizki genetski raznolikosti endemičnih in redkih vrst, ki pa kljub temu kažejo precejšno populacijsko strukturo, saj je lahko razlog večje variabilnost med populacijami geografska izoliranost in s tem povezana odsotnost pretoka genov. Pretok genov stremi k homogenizaciji genetske strukturiranosti, večja genetska variabilnost in deluje nasprotujoče genetskemu zdrsu in je pomemben dejavnik pri varstveni genetiki (Slatkin 1987, Ellstrand and Elam 1993). Posledično je odraz genetske raznolikosti v takih populacijah odvisen od vira genetske variabilnosti donorskih populacij, od koder poteka prenos genov v ponorne populacije (Ellstrand in Elam 1993). Ohranjanje variabilnosti znotraj in med populacijami je pomembno za dolgotrajni varstveni program (Ávila-Díaz in Oyama 2007). Vendar je za določitev nizke ali visoke raznolikosti najbolj primerna primerjava s širše razširjeno sorodno vrsto, ki naj bi po Hamrick in Godt (1989) imela višjo genetsko raznolikost.

Ker v študijo genetske variabilnosti in strukturiranosti nismo vključili sorodne, a širše razširjene vrste (npr. *M. muscosa*), je trenutno najprimernejša primerjava s študijo avtorjev Minuto in sod. (2006), kjer so določili genetsko variabilnost dveh endemičnih popkores Primorskih Alp: redke vrste *M. lebrunii* in nekoliko bolj pogoste vrste *M. sedoides*. Vrsti *M. lebrunii* na podlagi ISSR markerjev pripisujejo nizko genetsko raznolikost s prisotno diferenciacijo med populacijami. Shannonov indeks raznolikosti se razteza med 0,074 in 0,12, ki je (izvzemajoč populacijo Istrske toplice) podoben kot pri vrsti *M. tommasinii*. Nekoliko bolj razširjena vrsta *M. sedoides* kaže manjšo populacijsko diferenciacijo in večjo genetsko variabilnost, kjer se Shannonov indeks raznolikosti z izjemo ene populacije giblje med 0,25 – 0,34. Indeks raznolikosti je več kot dvakrat višji pri vrsti *M. sedoides*

kakor pri *M. lebrunii* in *M. tommasinii*. Tako lahko sklepamo, da je redka vrsta *M. lebrunii*, prisotna samo na treh nahajališčih, na podlagi strukturiranosti bolj podobna *M. tommasinii* kakor nekoliko bolj širše razširjena *M. sedoides*. Minuto in sod. (2006) so prepoznali le eno populacijo *M. sedoides* z zelo nizko genetsko raznolikostjo (podobno kot pri populaciji Istrske toplice vrste *M. tommasinii*), verjetno kot posledica geografske izolacije od zadnje poledenitve.

Število privatnih lokusov v populacijah je majhno. Pojavljajo se le v dveh populacijah (Glinščica z enim in Podpeč z dvema privatnima lokusoma). Zaradi majhnega števila privatnih lokusov podatek ni ravno informativen in si z njim težko razlagamo vzorce raznolikosti, nakazujejo pa na potencialno posebnost v genskem bazenu vrste, saj je število privatnih lokusov lahko še večje, ki jih pa z uporabo uporabljenih kombinacij AFLP markerjev nismo odkrili. Število lokalno pogostih lokusov kaže nekoliko drugačno sliko in sovпада s stopnjo genetske raznolikosti: populaciji Glinščica in Črni Kal z najvišjo genetsko raznolikostjo imata največje število lokalno pogostih lokusov (Preglednica 4), Istrske toplice z najmanjšo genetsko raznolikostjo pa le dva lokalno pogosta lokusa. Tako lahko potrdimo hipotezo (2), saj se populacije *M. tommasinii* med seboj razlikujejo tako v številu privatnih in lokalno pogostih lokusih kakor tudi v stopnji genetske raznolikosti.

Pri nekaterih vzorcih znotraj populacij je bil odkrit identičen genotip – klon (?). Desetim vzorcem pripisujemo samo štiri različne genotipe. En genotip se pojavlja celo znotraj dveh različnih populacij (Osp in Podpeč), kjer pa vsled manj kot 10 km oddaljenosti populacij težko govorimo o klonskem razširjanju preko tako velike razdalje. Razlog za pojav identičnih genotipov pri večjem številu vzorcev – klonov je lahko agamospermija (t.j. nastanek semen brez predhodne oploditve) ali pa klonsko razširjanje z ukoreninjanjem odtrganih delov rastlin in z rizomi, katere je Hind (1988) kot prisotne potrdil tudi pri Tommasinijevi popkoresi, a ni dokazal ali se rastlina z njimi lahko tudi v naravi klonsko razširja. Pa vendar pripisujemo manjšo verjetnost nastanka identičnih genotipov posledici nespolnega razmnoževanja in kot najbolj verjeten razlog izpostavljam napako pri vzorčenju ali laboratorijskem delu.

Programa STRUCTURE in BAPS razporejata vzorce vrste *M. tommasinii* vsak v različno število skupin (Slika 12): STRUCTURE  $K = 2$  in BAPS  $K = 3$ , čeprav se oba programa ujemata v razporejanju vzorcev na vsakem nivoju skupin ( $K = 2 - 5$ ). Na nivoju dveh skupin ločita populacijo Istrske toplice, na nivoju treh skupin pa ločita še populacijo Glinščica. To sta populaciji z največjo (GL) in najmanjšo (IT) genetsko raznolikostjo in številom lokalno pogostih lokusov. Pri opredelitvi štirih ali petih skupin oba programa med slovenskimi populacijami razlikujeta populacijo Podpeč, razlog za to sta najverjetneje prisotna dva privatna lokusa znotraj genetskega bazena populacije Podpeč. Barrier je tretji program, ki nam prikazuje možno strukturiranost populacij. Na prvem nivoju izriše

bariero, kjer predvideva zmanjšan oz. odsoten pretok genov in tako loči populacijo Istrske toplice od ostalih (Slika 14; bariera a). Na drugem nivoju pa nakazuje na pristnost barriere med populacijo Glinščica in ostalimi populacijami (Slika 14; bariera b). Tako tudi program Barrier na dveh nivojih določa tri skupine.

Dva algoritma programa BAPS in Barrier nakazujeta isti rezultat in sicer tri skupine. Algoritem programa STRUCTURE pa podaja le dve skupini. Vendar program Barrier deluje na dveh nivojih (bariera a in b), tako da na nivoju barriere (a) opisuje strukturiranost populacije kot algoritem programa STRUCTURE, na nivoju obeh barrier (a in b) pa podaja isto število skupin kakor algoritem programa BAPS in deluje kot vmesni člen med obema algoritmoma.

Potrebno je poudariti, da prikazana genetska strukturiranost vrste *M. tommasinii* ni nujno odraz dejanskega stanja v naravi. Identifikacija populacije Istrske toplice kot samostojne skupine z nizko raznolikostjo in omejenim pretokom genov je lahko v stvarnosti neutemeljena in lahko izstopa kot artefakt algoritma programov STRUCTURE in BAPS - umetno zasnovana skupina, ki v našem primeru lahko nastane kot posledica manjšega števila lokusov (57; Preglednica 4). Če prikazana strukturiranost vrste ni artefakt algoritma, potem programa za prikaz populacijske strukture dodatno podkrepita hipotezo (1) o strukturiranosti vrste *M. tommasinii* vzdolž svojega areala.

Nekoreninjeno drevo (SplitsTree; Slika 15) loči populacijo Istrske skupine z nizko filogenetsko raznolikostjo (Preglednica 7) od ostalih skupin. Diferenciacija ostalih populacij je nekoliko manj jasna, vendar se z največjo filogenetsko raznolikostjo (Preglednica 7) populacija Glinščica umesti v bolj ali manj enotno skupino. Več analiz (PCoA; Slika 9, BAPS; Slika 13 in nekoreninjeno drevo; Slika 15) določen delež populacije Črni Kal pripisuje v populacijo Glinščica. Nekoreninjeno drevo jasno prikazuje vzorec CK10MT, umeščen znotraj populacije Glinščica. Težko govorimo o pripadnosti vzorca populaciji GL (ki bi lahko bil posledica npr. prenosa semena iz GL v CK), vendar pripisujemo večjo možnost napake, storjene med laboratorijskim delom – napačno poimenovanje vzorca oziroma možne kontaminacije med vzorci. Za najbolj optimalno razpravo o umestitvi vzorca CK10MT bi le-tega morali ponoviti vse od izolacije do končnih analiz.

Mantelov test nam izpostavlja pozitivno korelacijo med geografsko razdaljo in genetsko diferenciacijo (Slika 11). Manjša mera korelacije med genetsko diferenciacijo in geografsko razdaljo se pojavlja med slovenskimi populacijami. Korelacija je največja med populacijo Istrske toplice in ostalimi (Slika 11), saj so Istrske toplice oddaljene več kot 20 km od najbližje slovenske populacije (Slika 10), kar že lahko predstavlja bariero za pretok genov. Čebelam kot najpogostejšim opraševalcem popkores (Hind 1988) predstavlja takšna



razdalja velik zalogaj in je zato opraševanje s čebelami med populacijami Istrske toplice ter ostalimi lahko dokaj omejeno. Povprečna razdalja, ki jo pri paši preletavajo čebele je 1,5 km, vendar lahko ob pomanjkanju virov in manj intenzivnem cvetenju rastlin čebele preletijo tudi razdaljo do 10 km (Steffan-Dewenter in Kuhn 2003). Vendar težko govorimo o odsotnosti navzkrižnega opraševanja med populacijo Istrske toplice in ostalimi, saj tipi opraševalcev vrste *M. tommasinii* še niso dodobra raziskani. Pretok genov z disperzijo semen med populacijami je prav tako malo verjeten, saj je domači okoliš mravelj dokaj majhen in prenašajo semena do največ 80 m razdalje (Gómez in Espadler 1988). Zaradi visoke genetske diferenciacije populacije Istrske toplice lahko sklepamo, da je izmenjava genov med populacijo Istrske toplice in ostalimi populacijami majhna. Na podlagi pozitivne korelacije med genetsko diferenciacijo in geografsko razdaljo (Slika 11) ter določitve barrier (Slika 14), ki nakazujejo na potencialno izolacijo med populacijami, lahko potrdimo hipotezo (3): relativna genetska izolacija populacij *M. tommasinii* je povezana s prostorsko izoliranostjo.

Vrste s prevladujočim ksenogamnim tipom opraševanja lahko ohranjajo visoko stopnjo genetske raznolikosti zaradi pogoste izmenjave genov med populacijami (Wright 1931). Lavergne in sod. (2004) so izpostavili kar precej razlik v ekologiji in biologiji endemičnih in sorodnih široko razširjenih vrst. Endemične vrste se pogosteje pojavljajo v stresnih habitatih na kamnitih tleh ter v vrstno siromašnejših združbah zaradi slabših kompeticijskih sposobnosti in imajo manjšo produkcijo semen ter razmerje P/O. Razmerje števila pelodnih zrn in jajčnih celic odraža uspešnost opraševanja s pomočjo vektorjev in upada v smeri ksenogamije proti avtogamiji. Pri ksenogamnih vrstah, katerih razmnoževanje je odvisno od uspešnosti opraševalca, je potrebna proizvodnja večjega števila pelodnih zrn kakor pri avtogamnih, kjer načeloma vektor prenosa pelodnih zrn ni potreben (Jürgens in sod. 2002).

Nekoliko večje razmerje P/O smo ugotovili pri vrsti *M. tommasinii* (Preglednica 8), predvsem na račun večjega števila pelodnih zrn. Tommasinijeva popkoresa ima velik razpon variiranja razmerja P/O (25 – 2396; Preglednica 8; Slika 17). Razlikovanje med vrstama na podlagi razmerja P/O je statistično značilno (Preglednica 9). Lavergne in sod. (2004) pripisujejo variacije v reproduktivnih lastnostih med posamezniki razlikam v okoljskih faktorjih, ki vladajo na rastišču. S pomočjo srednjih logaritamskih vrednosti razmerja P/O (Priloga C) vrsti *M. tommasinii* in *M. muscosa* opredeljujemo kot fakultativno ksenogamni. Razmerje P/O je pri popkoresah raziskal že Hind (1988), kjer na podlagi pridobljenih vrednosti (*M. tommasinii*:  $\log P/O = 2,54$  in *M. muscosa*:  $\log P/O = 2,36$ ) po Hindu (1988) vrsti uvrstimo nekoliko bližje fakultativni avtogamiji. Vendar je Hind (1988) preučeval razmerje pri gojenih primerkih popkores z nekoliko okrnjenim opisom protokola določitve P/O, zato se kot na primernejše razmerje zanašamo na naš izračun razmerja P/O.

Variabilnost razmerja P/O je večja med populacijami kakor znotraj populacij (Preglednica 9). Predvsem statistično značilno izstopa populacija Istrske toplice 1 pri vrsti *M. tommasinii* (Preglednica 10). Populacija Istrske toplice 1 ima velik razpon vrednosti razmerja P/O ter srednjo vrednosti do skoraj dvakrat večjo kot pri ostalih populacijah vrste *M. tommasinii* (Preglednica 8; Slika 16). Tako veliko razmerje lahko pripisujemo več dejavnikom, izpostavili bi lahko odsotnost učinkovitega oprasovalca na tej lokaciji, zato rastlina uravnoveša to pomanjkljivost z večjo produkcijo pelodnih zrn in tako zagotovi, da se vsaj del pelodnih zrn prenese z navzkrižnim oprasovanjem. Lahko pa se ravno v Istrskih toplicah pojavlja učinkovit oprasovalec, ki ga pri drugih populacijah ni; le-ta oprasuje rastline in mu nagrado oz. hrano predstavljajo pelodna zrna, s katerimi se prehranjuje. Ko rastlina zagotavlja nagrado oprasovalcu, s tem sebi zagotovi oprasitev.

Endemične vrste naj bi imele manjše razmerje P/O kakor širše razširjene sorodne vrste predvsem zaradi manjšega števila cvetov, ko brazda in prašniki niso dobro prostorsko ločeni. Vse to lahko povezujemo z manjšo velikostjo populacij in posledično manjšim potencialom prenosa pelodnih zrn zaradi omejenega obiska oprasovalcev ter povečanega parjenja v sorodstvu znotraj populacije (Lavergne in sod. 2004). Popkorese imajo relativno majhne cvetove, kar že lahko nakazuje na prisotnost občasne avtogamije pri popkoresah. Podoben trend smo pričakovali tudi v primeru Tommasinijeve popkorese, za katero smo sklepali, da je bolj fakultativno avtogamna v primerjavi z mahovno popkoreso. Vendar se je izkazalo, da P/O Tommasinijeve popkorese ni manjše kakor pri mahovni popkoresi, ampak večje. To je v nasprotju z našimi pričakovanji, zato smo ovrgli zastavljeno hipotezo (4): vrsta *Moehringia tommasinii* je fakultativno avtogamna vrsta in vsled ozke razširitve ima vrsta *M. tommasinii* manjše razmerje P/O kakor širše razširjena vrsta *M. muscosa*.

Iz reprodukcijskega sistema lahko predvidevamo, kakšna naj bi bila strukturiranost populacij. Vrste, ki so bolj nagnjene k avtogamiji, imajo načeloma manjšo genetsko raznolikost ter večjo diferenciacijo med populacijami kot ksenogamne. Ker je pri avtogamnih vrstah pretok genov med populacijami omejen, prihaja do izraza genetska strukturiranosti med populacijami (Hamrick in Godt 1996, Glémin in sod. 2006). Na podlagi naše hipoteze (4), da je Tommasinijeva popkoresa fakultativno avtogamna, bi lahko predhodno sklepali, da ima vrsta nizko genetsko raznolikost in visoko diferenciacijo med populacijami, kar se je izkazalo kot pravilno, kljub temu, da smo hipotezo o fakultativni avtogamiji vrste *M. tommasinii* ovrgli.

Ker smo se za primerjavo velikosti polprašnic vrst *M. tommasinii* in *M. muscosa* odločili šele v zadnji fazi praktičnega dela magistrske naloge, nimamo pripisanih velikosti polprašnic cvetov, kjer smo šteli pelodna zrna. Polprašnice smo izmerili naknadno in nimamo podatka, koliko pelodnih zrn vsebujejo določeni velikostni razredi polprašnic. Večja variabilnost med velikostjo polprašnic se pojavlja med vrstama (Preglednica 11), saj

so polprašnice vrste *M. tommasinii* precej večje kot pri vrsti *M. muscosa* (Slika 18). Velikost polprašnic Tommasinijeve popkorese lahko omogoča produkcijo in shranjevanje večjega števila pelodnih zrn in posledično prispeva k večjem razmerju P/O. Vendar pa ni nujno, da velikost polprašnic pomeni vzrok za večje razmerje P/O, lahko je le posledica načina življenja kakor tudi ekoloških razmer (Cruden 1976). Večinoma Cruden (1976) razlike v razmerju P/O pripisuje spremembi učinkovitosti in številčnosti opraševalcev, v motenih habitatih je teh lahko manj. Navaja tudi pomembnost števila sočasno odprtih cvetov in količine nektarja, saj sta do tega odvisna pogostost opraševanja in čas zadrževanja opraševalca na cvetu.

Med italijansko in slovenskimi populacijami je lahko prisoten '*outbreeding depression*', saj so populacije dokaj diferencirane, a med njimi še vedno prihaja do pretoka genov, ki pa je verjetno odsoten med hrvaško ter ostalimi populacijami. '*Outbreeding depression*' se pojavlja zaradi križanja med različnimi populacijami, ki so medsebojno diferencirane kot posledica lokalne adaptacije, naravne selekcije ali fiksacije genov zaradi genetskega zdrsa (Schierup in Christiansen 1996). Kaže se kot zmanjšan fitness potomca, saj so lahko nekateri geni prednost v določenem okolju, v okolju neke druge populacije pa lahko negativno vplivajo na fitness rastlin (Frankham in sod. 2011). Lahko bi predvidevali, da se '*outbreeding depression*' med slovenskimi populacijami ne pojavlja, saj so si geografsko dokaj blizu in zaradi verjetno rednega pretoka genov med njimi ni prisotne večje diferenciacije. Vendar '*outbreeding depression*' ne moramo kar tako dokazati, za zanesljivo potrditev bi morali kontrolirano križati rastline iz populacij z različno oddaljenostjo in meriti reprodukcijski uspeh (Schierup in Christiansen 1996). Glede na to, da ima populacija Istrske toplice večje število pelodnih zrn na cvet, bi bilo potrebno preveriti, kakšna je zadostna količina peloda in tako preveriti, ali populacija Istrske toplice proizvaja dodatne količine pelodnih zrn (npr. za nagrado opraševalcev) ali pa ostale populacije trpijo za pomanjkanjem količine pelodanih zrn.

Ne izključujemo možnosti, da bi lahko bila katera populacija v težavah zaradi parjenja v sorodstvu - '*inbreeding depression*'. Pri vrstah s ksenogamnim načinom razmnoževanja se ta kaže v večji meri kot pri avtogamnih vrstah (Eckert in Barrett 1994) in glede na genetsko variabilnost bi lahko predvidevali, da se pojavlja v populaciji Istrske toplice. V majhni populaciji je parjenje v sorodstvu zelo verjetno, saj ima populacija Istrske toplice nizko genetsko variabilnost in najnižje število lokalno pogostih lokusov. Vendar na podlagi genetske variabilnosti, redkih lokusov kakor tudi P/O razmerja težko sklepamo, ali je populacija v težavah zaradi parjenja v sorodstvu - '*inbreeding depression*', za kaj takega bi potrebovali dokaze iz kontroliranih, neposrednih križanj ter meritve fitnessa potomcev – preživetje, rast ter reprodukcijski uspeh (število, velikost, teža in kaljivost semen) (Eckert in Barrett 1994).

## 6 ZAKLJUČEK

Težko govorimo, da so populacije Tommasinijeve popkorese nekoč imele enoten areal, saj ni dovolj primernih habitatov za njeno poselitev, vsaj med Slovenijo in Hrvaško ne. Populacije Tommasinijeve popkorese so genetsko strukturirane, prepoznavamo dve do tri skupine, ki imajo relativno nizko genetsko raznolikost (predvsem populacija Istrske toplice). Če predpostavljamo, da ločevanje populacije Istrske toplice od ostalih ni artefakt algoritma programov za prikaz populacijske strukture, je najverjetneje, da je majhna genetska raznolikost te populacije posledica ustanoviteljevega učinka. Poznavanje strukturiranosti populacij je v luči varovanja vrst pomembno, saj je potrebno poznavanje genetske sorodnosti med populacijami v primeru, če številčnost neke populacije drastično upade in je potrebna obnova populacije s ponovno naselitvijo osebkov. V tem primeru bi v populacijo naselili osebkove, ki so si genetsko najbolj podobni in imajo tako najbolj primerno genetsko podlago za uspešno preživetje v novem okolju (Weeks in sod. 2011). Najbolj podobne so si slovenske populacije, kar je razumljivo, saj so si geografsko nekoliko bližje in med njimi lahko prihaja do navzkrižnega opraševanja in tako do pretoka genov. Relativna genetska izolacija populacij *M. tommasinii* je povezana s prostorsko izoliranostjo.

Vrsti *M. tommasinii* in *M. muscosa* na podlagi P/O razmerja opredeljujemo kot fakultativno ksenogamni. V nasprotju z našimi pričakovanji ima vrsta *M. tommasinii* nekoliko večje P/O razmerje kot *M. muscosa*, izstopa predvsem populacija Istrske toplice, kar verjetno lahko pripisujemo drugačni številčnosti, vrstni sestavi in učinkovitosti opraševalcev.

Populacije vrste *M. tommasinii* so precej majhne, zato iz varstvenega vidika ne smemo spregledati potencialnih problemov majhnih populacij kot so parjenje v sorodstvu in genetski zdrski ter pomembnosti ohranjanja raznolikosti med populacijami. To lahko zagotovimo z ohranjanjem ali povečanjem velikosti populacij. Potrebno je ohranjati genetsko raznolikost Tommasinijeve popkorese in tako zagotavljati čim boljše možnosti preživetja populacije. Iz vidika varstvene genetike bi kot pomembno za varovanje izpostavili populacijo Istrske toplice zaradi svoje genetske samoniklosti in najmanjše raznolikosti in tako največje možnosti za upad fitnesa kot posledice homogenizacije zaradi genetskega zdrsa. Taka populacija ima manjše zmožnosti prilagajanja na potencialne spremembe v okolju in s tem manjše možnosti dolgotrajnega preživetja. Kot drugo bi izpostavili populacijo Glinščica, ki zaradi svoje raznolikosti pomembno prispeva k genskem bazenu vrste in s tem k dolgotrajnem obstoju vrste.

Znanje o Tommasinijevi popkoresi je še vedno dokaj skromno, s svojo magistrsko nalogo smo pridobili vpogled v populacijsko strukturo in deloma v razmnoževalni sistem vrste, vendar je za primerno varovanje endemične popkorese potrebno še veliko temeljnega znanja o njeni biologiji in ekologiji.

## 7 LITERATURA

- Akeroyd J.R. in Preston C.D. 1981. Observations on two narrowly endemic plants, *Moehringia minutiflora* Bronn. and *Silene viscariopsis* Bronn., from Prilep, Yugoslavia. *Biological conservation* 19(3): 223-233
- Ávila-Díaz I. in Oyama K. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchideaceae). *Journal of botany* 94(2): 184-193
- Behrendsen W. 1904. Ein neuer *Moehringia*-Bastard. *Allgemeine botanische Zeitschrift für Systematik, Floristik, Pflanzengeographie etc.* 5(6): 65 - 66
- Bernska konvencija – Konvencija o varstvu evropskih prostoživečih živali in rastlin in naravnih habitatov, Priloga I. 1979. Svet Evrope, Bern  
<http://conventions.coe.int/Treaty/FR/Treaties/Html/104-1.htm> (datum dostopa: 2.7.2015)
- Bhatnagar S.P. in Johri B.M. 1972. Development of angiosperm seeds. V: Kozłowski T.T. (ur.). *Seed Biology, Volume I: Importance, Development, and Germination.* Elsevier: 77-149
- Binks R.M., Millar M.A., Byrne M. 2015. Not all rare species are the same: contrasting patterns of genetic diversity and population structure in two narrow-range endemic sedges. *Biological Journal of the Linnean Society* 144: 873-886
- Bittrich V. 1993. Caryophyllaceae. V: Kubitzki K., Rohwer J., Bittrich V. (ur.). *The families and genera of vascular plants, vol. 2: Magnoliid, Hamamelid, and Caryophyllid families.* Springer Verlag, Berlin, Nemčija: 206-236
- Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P., Pompanon F., Brochmann C., Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetic studies. *Molecular Ecology* 13: 3261-3273
- Brana S. 2005. *Moehringia tommasinii*. V: Nikolić T. in Topić J. *Crvena knjiga vaskularne flore Hrvatske.* Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska, Zagreb
- Brown T.A. 2007. *Genomes 3.* 3rd ed. New York, Garland Science: 713 str

- Brunet J. in Charlesworth D. 1995. Floral sex allocation in sequentially blooming plants. *Evolution* 49(1): 70-79
- Casazza G., Borghesi B., Roccotiello E., Minuto L. 2008. Dispersal mechanisms in some representatives of the genus *Moehringia* L. (Caryophyllaceae). *Acta Oecologica* 33: 246-252
- Closa I. in Goicoechea N. 2011. Infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in naturally regenerating, unmanaged and clear-cut beech forests. *Pedosphere* 21(1): 65-74
- Corander J., Sirén J., Arjas E. 2008. Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Computational Statistics* 23: 111-129
- Crawford D.J., Ruiz E., Stuessy T.F., Tepe E., Aqueveque P., Gonzalez F., Jensen R.J., Anderson G.J., Bernardello G., Baeza C.M., Swenson U., Silva M.O. 2001. Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation. *American journal of botany* 88(12): 2195-2203
- Cruden R.W. 1976. Intraspecific variation in pollen-ovule ratios and nectar secretion – preliminary evidence of ecotypic variation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 63: 277-289
- Cruden R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 35: 32-46
- Cruden R.W. 2000. Pollen grains: why so many? *Plant systematics and evolution* 222: 143-165
- Cruden R.W. in Miller-Ward S. 1981. Pollen-ovule ratio, pollen size, and the ratio of stigmatic area to the pollen bearing area of the pollinator: an hypothesis. *Evolution* 35(5): 964-974
- Dakskobler I. 2004. *Moehringia villosa* (Wulfen) Fenzl - kratkodlakava popkoresa. V: Čušin B. (ur.). *Natura 2000 v Sloveniji*. Založba ZRC, ZRC SAZU, Ljubljana: 129-134

Diniz-Filho J.A., Soares T.N., Lima J.S., Dobrovolski R., Lendeiro V.L., de Campos Telles M.P., Rangel T.F., Bini L.M. 2013. Mantel test in population genetics. *Genetics and molecular biology* 36(4): 475-485

Direktiva 92/43/EEC o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst – Habitatna direktiva. 1992. Evropska komisija

Earl D.A. in von Holdt B.M. 2012. Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources* 4(2): 359-361

Eckert C.G. in Barrett S.C.H. 1994. Inbreeding depression in partially self-fertilizing *Decodon verticillatus* (Lythraceae): population-genetic and experimental analyses. *Evolution* 48(4): 952-964

Ellstrand N.C. in Elam D.R. 1993. Population genetic consequence of small population size: implications for plant conservation. *Annual reviews of ecological systems* 24: 217-242

Escaravage N., Cambecèdes J., Largier G., Pornon A. 2011. Conservation genetics of the rare Pyreneo-Cantabrian endemic *Aster pyrenaicus* (Asteraceae). *AoB plants* [www.aobplants.oxfordjournals.org](http://www.aobplants.oxfordjournals.org) (datum dostopa: 18.8.2015)

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular ecology* 14: 2611-2620

Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-91

Faith D.P. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological conservation* 61: 1-10

Falk D.A. in Holsinger K.E. 1991. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press

Fenzl E. 1833. Versuch einer Darstellung der geographischen Verbreitungs- und Vertheilungsverhältnisse der natürlichen Familie der Alsineen in der Palarregion und einem Theile der gemässigten Zone der alten Welt. Wallishausens, Dunaj



- Fior S. in Karis P.O. 2007. Phylogeny, evolution and systematics of *Moehringia* (Caryophyllaceae) as inferred from molecular and morphological data: a case of homology reassessment. *Cladistics* 23: 362-372
- Fišer Pečnikar Ž., Fujs N., Glasnovič P., Surina B., Varljen Bužan E. 2014. *Moehringia tommasinii*, an endemic chasmophyte from the Karst edge. V: Varljen Bužan E., Pallavicini A. (ur.). Biodiversity and conservation of Karst ecosystems. Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Inštitut za biodiverzitetne študije
- Fordyce J.A. 2006. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *The journal of experimental biology* 209: 2377-2383
- Frankham R., Ballou J.D., Brislove D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press
- Frankham R., Ballou J.D., Eldridge M.D.B., Lacy R.C., Ralls K., Dudash M.R., Fenster C.B. 2011. Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation biology* 25(3): 465-475
- Galičič B. in Skok J. 2005. Slovenija: športnoplezalni vodnik. Ljubljana, Sidarta
- Gasparo D. in Polli E. 2015. Informacijski material Regional Nature Reserve of the Val Rosandra. <http://www.riservavalrosandra.it/Riserva/Materiale-Informativo.aspx> (datum dostopa: 4.7.2015)
- Gevaert S.D., Mandel J.R., Burke J.M., Donovan L.A. 2013. High genetic diversity and low population structure in Porter's sunflower (*Helianthus porteri*). *Journal of heredity* 104: 407-415
- Glasnovič P. 2013. Botanično ovrednotenje Osapske udornice. Poročilo. Zavod ZR za varstvo narave in Univerza na Primorskem, Znanstveno raziskovalno središče Koper.
- Glémin S., Bazin E., Charlesworth D. 2006. Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. *Proceedings of the Royal society B* 273:3011–3019

- Gómez C. in Espadler X. 1988. Myrmecochorous dispersal distances: a world survey. *Journal of biogeography* 25(3): 573-580
- Greenberg A.K. in Donoghue M.J. 2011. Molecular systematics and character evolution in Caryophyllaceae. *Taxon* 60(6): 1637–1652
- Hamrick J. L. in Godt M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. V: Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S.(ur.). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*, Sinauer, Sunderland
- Hamrick J.L. in Godt M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 351: 1291-1298
- Heinken T. in Raudnitschka D. 2002. Do wild ungulates contribute to the dispersal of vascular plants in central European forests by epizoochory? A case study in NE Germany. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 121(4): 179–194
- Hayek A. 1902. Über eine neue *Moehringia*. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien* 52: 147-149
- Hind D.J.N. 1988. The biology and systematics of *Moehringia* L. (Caryophyllaceae). Doktorska disertacija. University of Reading
- Hudson D.H. in Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution* 23(2): 254-267
- IBM Corp. 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, New York: IBM Corp.
- Iverson L. 2015. Illinois plant information network – information on *Moehringia lateriflora*. <http://www.fs.fed.us/ne/delaware/ilpin/1930.co> (datum dostopa: 20.6.2015)
- Jakobsson M. in Rosenberg N.A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806

- Jalas J. in Suominen J. 1983. Atlas Florae Europaea: distribution of vascular plants in Europe, Vol.6: Caryophyllaceae (Alsinoideae and Paronychioideae). The Committee for Mapping the Flora of Europe in Societas Biologica Fennica Vanamo
- Jiménez-Mejías P., Fernández-Mazuecos M., Amat M.E., Vargas P. 2015. Narrow endemics in European mountains: high genetic diversity within the monospecific genus *Pseudomisopates* (Plantaginaceae) despite isolation since the late Pleistocene. *Journal of biogeography* 42(8): 1455-1468
- Juan A., Crespo M.B., Cowan R.S., Lexer C., Fay F. 2004. Patterns of variability and gene flow in *Medicago citrina*, an endangered endemic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular ecology* 13: 2679-2690
- Jürgens A., Witt T., Gottsberger G. 2002. Pollen grain numbers, ovule numbers and pollen-ovule ration in Caryophylloideae: correlation with breeding system, pollination, life form, style number, and sexual system. *Sexual plant reproduction* 14: 279-289
- Kaligarič M. 1992. Rastlinstvo Kraškega roba. *Proteus* 54(6-7): 224-230
- Kaligarič M. 2004. *Moehringia tommasiniana* Marchesetti – Tommasinijeva popkoresa. V: Čušin B. (ur.) NATURA 2000 v Sloveniji – Rastline. Založba ZRC, SAZU: 129-134
- Lavergne S., Thompson J.D., Garnier E., Debussche M. 2004. The biology and ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *OIKOS* 107: 505-518
- Linnaeus C. 1753. *Species Plantarum Exhibitentes Plantas Rite Cognitas ad Genera Relatas, cum Differentiis Specificis, Nominibus Trivialibus, Synonymis Selectis, et Locis Natalibus, Secundum Systema Sexuale Digestas*. Laurentius Salvius, Švedska
- Lopes M.S., Mendonça D., Bettencourt S.X., Borba A.R., Melo C., Baptista C., da Câmara Machado A. 2014. Genetic diversity of an Azorean endemic and endangered plant species inferred from inter-simple sequence repeat markers. *AoB plants* 6
- Loveless M.D., Hamrick J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and systematics* 15: 65-95

- Manni F., Guérard E., Heyer H. 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by "Monmonier's algorithm". *Human biology* 76(2): 173-190
- Marchesetti C. 1879. *Moehringia tommasinii*. Bollettino della Societa Adriatica di Scienze Naturali Trieste 5: 327-329
- Martini F. 1990. Distribution and phytosociological behaviour of *Moehringia tommasinii* March. *Studia geobotanica* 10: 119-132
- Mayer E. 1960. Endemične cvetnice območja jugovzhodnih apneniških Alp, njihovega predgorja in ilirskega prehodnega ozemlja. V: Lazar J. (ur.). Zbornik ob 150. letnici botaničnega vrta v Ljubljani (Ad annum Horti botanici Labacensis solemnem): 25-48
- McNeill J. 1962. Taxonomic studies in the Alsinoideae: I. Generic and infregeneric groups. Notes from the Royal botanic garden of Edinburgh 24 (2): 79-155
- Merxmüller H. in Grau J. 1967. *Moehringia*-Studien. Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung Münche: 257-273
- Merxmüller H. in Gutermann W. 1957. Eine neue *Moehringia*-Sippe aus den Süualpen. *Phyton* 7(1-3): 1-7
- Meudt H.M. in Clarke A.C. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in plant science* 12(3): 106-117
- Minuto L., Fior S., Roccotiello E., Casazza G. 2006. Seed morphology in *Moehringia* L. and its taxonomic significance in comparative studies within the Caryophyllaceae. *Plant systematic and evolution* 262: 189 – 208
- Minuto L., Grassi F., Casazza G. 2006. Ecogeographic evaluation of endemic species in the Maritime Alps: the case of *Moehringia lebrunii* and *M. sedoides* (Caryophyllaceae). *Plant biosystems* 140(2): 146-155
- Montagnani C., Gargano D., Jogan N. 2013. *Moehringia tommasinii*. The IUCN Red List of Threatened Species. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (datum dostopa: 6.7.2015)

- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American naturalist* 106(949): 283-292
- Neyman C.F. 1878. *Conspectus florae Europaeae : seu, Enumeratio methodica plantarum phanerogamarum Europae indigenarum, indicatio distributionis geographicae singularum etc.* Örebro Sueciae: Typis Officinae Bohlinianae
- Nicoletti F., De Benedetti L., Ruffoni B., Mercuri A. 2012. Spatial genetic structure of *Campanula sabatia*, a threatened narrow endemic of the Mediterranean basin. *Folia geobotanica* 47(3): 1-14
- Okasha S. 2012. Population genetics. V: Zalta E.N. (ur.). *The Stanford Encyclopedia of Philosophy* (izdaja: jesen 2012). <http://plato.stanford.edu/entries/population-genetics> (datum dostopa: 15.7.2015)
- Peakall R. in Smouse P.E. 2012a. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539
- Peakall R.. in Smouse P.E. 2012b. GenAEx Appendix 1 – Methods and statistics in GenAEx 6.5
- Pospichal E. 1897-1899. *Flora des Oesterreichischen Kuestenlandes.* Leipzig, Wien
- Pravilnik o prepovedi vzemirjanja živali zavarovanih prosto živečih vrst ptic v naravnih skalnih apnenčastih stenah na območju Kraškega roba. 2006. Uradni list RS, št. 5/2000
- Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. 2002. Uradni list RS, št. 82/2002
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Rossi G., Montagnani C., Gargano D., Peruzzi L., Abeli T., Ravera S., Cogoni A., Fenu G., Magrini S., Gennai M., Foggi B., Wagensommer R.P., Venturella G., Blasi C., Raimondo F.M., Orsenigo S. 2013. Lista Rossa della Flora Italiana. 1. Policy Species e altre specie minacciate. Comitato Italiano IUCN e Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare

- Rosenberg N.A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology* 4:137-138
- Ruesink A. 2003. *Moehringia macrophylla* (Hook.) Fenzl Large-Leaved Sandwort - conservation and research plan for New England. New England flower society, ZDA
- Sambamurty A.V.S.S. 2005. Caryophyllaceae (Pink-family). V: Sambamurty A.V.S.S. (ur.). Taxonomy of angiosperms. I. K. International Pvt Ltd: 270-279
- Sauer W. 1959. Zum kenntnis von *Moehringia bavarica*. *Phyton* 8(3-4): 267 - 283
- Schierup M.H. in Christiansen F.B. 1996. Inbreeding depression and outbreeding depression in plants. *Heredity* 77: 461-468
- Sheridan S.L., Iversen K.A., Itagaki H. 1996. The role of chemical senses in seed-carrying behaviour by ants: a behavioural, physiological and morphological study. *Journal of insect physiology* 42(2): 149-159
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236(4803): 787-792
- Steffan-Dewenter I. in Kuhn A. 2003. Honeybee foraging in differentially structured landscape. *The royal society of London B* 270: 569-575
- Stevanović V., Tan K., Petrova A. 2007. Mapping the endemic flora of the Balkans – a progress report. *Bocconea* 21: 131 – 137
- Stoeva M. 2011. *Moehringia jankae* Janka. V: Peev D., Vladimirov V., Anchev M., Temniskova D., Denchev C.M., Ganeva A., Gussev C. (ur.). Red Data Book of the Republic of Bulgaria: Vol.1 – Plants and fungi. <http://e-coddb.bas.bg/rdb/en/vol1/Moejanka.html> (datum dostopa: 9.6.015)
- Stoyanov S. 2011. *Moehringia grisebachii*. V: Peev D., Vladimirov V., Anchev M., Temniskova D., Denchev C.M., Ganeva A., Gussev C. (ur.). Red Data Book of the Republic of Bulgaria: Vol.1 – Plants and fungi <http://e-coddb.bas.bg/rdb/en/vol1/Moegrise.html> (datum dostopa: 9.6.015)

Surina B. 2007. *Moehringia*. V: Martinčič. A. (ur.). Mala flora Slovenije. Tehnična založba Slovenije: 161 - 162

Škornik I. 1992. Prosto plezanje ogroža živi svet Kraškega roba. *Proteus* 54: 269 - 273

Threatened Plants Unit. 1983. List of rare, threatened and endemic plants in Europe (izdaja 1982). IUCN Conservation Monitoring Centre in Evropska komisija za varovanje narave in naravnih virov, Svet Evrope, Strasbourg

Torres E., Iriando J.M., Pérez C. 2003. Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. *American journal of botany* 90: 85-92

Turrill W.B. 1946. The ecotype concept - a consideration with appreciation and criticism, especially of recent trends. *New phytologist* 45(1): 34-43

Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O., Edmondson J.R., Heywood V.H., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A. 1993. *Flora Europaea*, Volume 1: Psilotaceae to Platanaceae. Cambridge University Press: 148 - 152

Uredba o posebnih varstvenih območjih (območjih Natura 2000). 2004. Uradni list RS, št. 49/2004

Uredba o zavarovanih prosto živečih rastlinskih vrstah. 2004. Uradni list RS, št. 46/2004

Vandepitte K., Gristina A.S., De Raedt R., Roldán-Ruiz I., Marcenò C., Sciandrello S., Honnay O. 2013. Conservation genetics of an endemic from the Mediterranean Basin: high genetic differentiation but no genetic diversity loss from the last populations of the Sicilian Grape Hyacinth *Leopoldia gussonei*. *Conservation genetics* 14(5): 963-972

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* 23(21): 4407-4414

Waller D.M., O'Malley D.M., Gawler S.C. 1987. Genetic variation in the extreme *Pedicularis furbishiae* (Scrophulariaceae). *Conservation biology* 1(4): 335-340

- Weeks A.R., Sgro C.M., Young C.M., Frankham R., Mitchell N.J., Miller K.A., Byrne M. Coates D.J., Eldridge M.D.B., Sunnucks P., Breed M.F., James E.A., Hoffmann A.A. 2011. Assessing the benefits and risk of translocations in changing environments: a genetic prespective. *Evolutionary applications* 4(6): 709-725
- Wraber T. 1977: Samoniklo nahajališče lovora (*Laurus nobilis* L.) v Sloveniji. Slovensko morje in zaledje: zbornik za humanistične, družboslovne in naravoslovne raziskave 1 (1): 193-199
- Wraber T. 1984. »Bavarska« popkoresa na Bizeljskem. *Proteus* 47(2): 56-59
- Wraber. T. 1992. Tommasinijeva popkoresa. *Proteus* 54 (6-7): 231 – 233
- Wright S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16(2): 97-159
- Zorec R. 1983. Osp – vas, stena, dolina. Rastlinske posebnosti. *Planinski vestnik* 7: 391 – 393
- Young A.G. in Brown A.H.D. 1996. Comparative population genetic structure of the rare woodland shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosoides*. *Conservation biology* 10: 1220-1228



## **PRILOGE**

**Priloga A:** Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov (1/0) za kombinacijo *Pst*I-AGA-6-FAM + *Mse*I-CAG; v vrsticah so predstavljeni posamezni vzorci, v stolpcih pa prisotnost oz. odsotnost posameznega lokusa podane dolžine.

	60	70	71	75	77	81	82	87	96	98	101	122	123	124	134	135	136	137	139	140	144	148	162	163	164	178	186	187	189	
CK10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
CK2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CK3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CK4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CK5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CK6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CK7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GL10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GL11	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
GL12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GL1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
GL3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GL4	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GL5	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GL6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
GL9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
IT10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
IT2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
IT4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
IT6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
IT8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
IT9	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
ITM	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
OSP10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OSP11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OSP1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OSP2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OSP4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OSP6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OSP7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OSP8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OSP9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
PP10	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
PP11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
PP12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PP13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PP1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PP2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PP3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PP4	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PP6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PP7	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PP8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PP9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1

	206	208	209	210	211	220	230	231	235	236	250	253	273	274	275	285	286	287	318	319	343	344	394	425	435	469	
CK10	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
CK2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
CK3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	
CK4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
CK5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
CK6	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
CK7	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
GL10	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	
GL11	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	
GL12	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	
GL1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
GL3	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
GL4	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
GL5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
GL6	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	
GL9	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	
IT10	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
IT2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
IT4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
IT6	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
IT8	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
IT9	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
ITM	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
OSP10	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
OSP11	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
OSP1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	
OSP2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
OSP4	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
OSP6	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
OSP7	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
OSP8	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
OSP9	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	
PP10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP13	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP6	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP8	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
PP9	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	

**Priloga B:** Matrika prisotnosti in odsotnosti AFLP vrhov (1/0) za kombinacijo *Pst*I-ACA-6-FAM + *Mse*I-CAG; ; v vrsticah so predstavljeni posamezni vzorci, v stolpcih pa prisotnost oz. odsotnost posameznega lokusa podane dolžine.

	58	64	68	71	77	87	92	101	110	113	115	123	133	145	148	157	161	178	181	185	199	210	223	241	272	291	312
CK10	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
CK2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
CK3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
CK4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
CK5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
CK6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
CK7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
GL10	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
GL11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
GL12	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
GL1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
GL3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
GL4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
GL5	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
GL6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
GL9	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
IT10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
IT2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
IT4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
IT6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
IT8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
IT9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
ITM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
OSP10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
OSP11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
OSP1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
OSP2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
OSP4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
OSP6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
OSP7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
OSP8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
OSP9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
PP10	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
PP11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
PP12	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
PP13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
PP1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
PP2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
PP3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
PP4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0
PP6	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
PP7	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
PP8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0
PP9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0

**Priloga C:** Cvetovi (vzorci), nabrani na posameznih lokacijah, kjer je vsakemu cvetu pripisano pripadajoče število prašnikov, število jajčnih celic in pelodnih zrn ter razmerje P/O.

lokacija	vzorec	št. prašnikov	št. jajčnih celic	št. pelodnih zrn	razmerje P/O	log (razmerje P/O)	
<b>Istrske toplice 1</b>	IST 1 MT	9	9	5312,5	590,3	2,77	
	IST 2 MT	9	13	8812,5	677,9	2,83	
	IST 3 MT	8	8	11250	1406,3	3,15	
	<i>M.tommasinii</i>	IST 4 MT	8	6	14375	2395,8	3,38
	IST 5 MT	8	8	18687,5	2335,9	3,37	
	IST 6 MT	8	10	16562,5	1656,3	3,22	
	IST 7 MT	8	11	19625	1784,1	3,25	
	IST 8 MT	11	8	10750	1343,8	3,13	
	IST 9 MT	8	8	14625	1828,1	3,26	
	IST 10 MT	10	5	125	25	1,40	
	IST 11 MT	8	5	10625	2125	3,33	
	IST 12 MT	8	11	7000	636,4	2,80	
	IST 13 MT	7	8	5562,5	695,3	2,84	
	IST 14 MT	8	6	12000	2000	3,30	
	IST 15 MT	9	6	11000	1833,3	3,26	
<b>Istrske toplice 2</b>	IT 1 MT	8	7	5125	732,1	2,86	
	IT 2 MT	8	7	10000	1428,6	3,15	
	IT 3 MT	8	7	11375	1625	3,21	
	<i>M.tommasinii</i>	IT 4 MT	8	9	8875	986,1	2,99
	IT 5 MT	8	9	12812,5	1423,6	3,15	
	IT 6 MT	8	8	7250	906,3	2,96	
	IT 7 MT	8	8	11187,5	1398,4	3,15	
	IT 8 MT	8	7	687,5	98,2	1,99	
	IT 9 MT	8	7	5187,5	741,1	2,87	
	IT 10 MT	8	7	187,5	26,8	1,43	
	IT 11 MT	8	8	3937,5	492,2	2,69	
<b>Osp</b>	OSP 1 MT	8	8	6937,5	867,2	2,94	
	OSP 2 MT	8	8	7125	890,6	2,95	
	OSP 3 MT	8	8	6250	781,3	2,89	
	<i>M.tommasinii</i>	SOP 4 MT	8	6	5500	916,7	2,96
	OSP 5 MT	8	7	5875	839,3	2,92	
	OSP 6 MT	8	8	2812,5	351,6	2,55	
	OSP 7 MT	8	8	4375	546,9	2,74	
	OSP 8 MT	8	7	4937,5	705,4	2,85	
	OSP 9 MT	8	8	4500	562,5	2,75	
	OSP 10 MT	8	7	1750	250	2,40	
	OSP 11 MT	8	7	2375	339,3	2,53	

lokacija	vzorec	št. prašnikov	št. jajčnih celic	št. pelodnih zrn	razmerje P/O	log (razmerje P/O)
<b>Podpeč</b> <i>M.tommasinii</i>	PP X MT	6	8	5000	625	2,80
	PP 1 MT	8	8	1375	171,9	2,24
	PP 2 MT	8	8	3937,5	492,2	2,69
	PP 3 MT	8	8	3125	390,6	2,59
	PP 4 MT	8	7	5750	821,4	2,91
	PP 5 MT	8	7	3687,5	526,8	2,72
	PP 6 MT	8	8	6125	765,6	2,88
	PP 7 MT	8	7	2562,5	366,1	2,56
	PP 8 MT	8	8	5812,5	726,6	2,86
	PP 9 MT	8	8	3437,5	429,7	2,63
	PP 10 MT	8	5	8000	1600	3,20
	PP 11 MT	9	8	3875	484,4	2,69
	PP 12 MT	8	8	3000	375	2,57
	PP 13 MT	8	8	6500	812,5	2,91
	PP 14 MT	8	7	6625	946,4	2,98
PP 15 MT	8	7	4437,5	633,9	2,80	
<b>Črni Kal</b> <i>M.tommasinii</i>	CK 1 MT	8	8	9125	1140,6	3,06
	CK 2 MT	8	8	6562,5	820,3	2,91
	CK 3 MT	8	8	9250	1156,3	3,06
	CK 4 MT	8	8	7312,5	914,1	2,96
	CK 5 MT	9	6	9687,5	1614,6	3,21
	CK 6 MT	8	8	6125	765,6	2,88
	CK 7 MT	8	8	7250	906,3	2,96
	CK 8 MT	9	8	10625	1328,1	3,12
	CK 9 MT	8	8	5625	703,1	2,85
	CK 10 MT	8	7	5312,5	758,9	2,88
	CK 11 MT	8	8	7937,5	992,2	3,00
	CK 12 MT	8	5	4187,5	837,5	2,92
	CK 13 MT	8	7	6312,5	901,8	2,96
	CK 14 MT	8	5	9000	1800	3,26
	CK 15 MT	8	8	8062,5	1007,8	3,00
<b>Glinščica</b> <i>M.tommasinii</i>	GL 1 MT	4 *	8	4312,5	539,1	2,73
	GL 2 MT	10	8	10500	1312,5	3,12
	GL 3 MT	8	4	3500	875	2,94
	GL 4 MT	8	8	2562,5	320,3	2,51
	GL 5 MT	8	3	5687,5	1895,8	3,28
	GL 6 MT	7	7	3562,5	508,9	2,71
	GL 7 MT	8	5	4875	975	2,99
	GL 8 MT	8	7	5500	785,7	2,90
	GL 9 MT	5 *	8	2937,5	367,2	2,56
	GL 10 MT	7	8	1562,5	195,3	2,29

lokacija	vzorec	št. prašnikov	št. jajčnih celic	št. pelodnih zrn	razmerje P/O	log (razmerje P/O)
<b>Rakitovec</b>  <i>M.muscosa</i>	RK 1 MM	8	8	8937,5	1117,2	3,05
	RK 2 MM	8	10	4437,5	443,8	2,65
	RK 3 MM	8	7	7750	1107,1	3,04
	RK 4 MM	8	8	6062,5	757,8	2,88
	RK 5 MM	8	8	6000	750	2,88
	RK 6 MM	8	8	8250	1031,3	3,01
	RK 7 MM	7	10	437,5	43,8	1,64
	RK 8 MM	8	9	4250	472,2	2,67
	RK 9 MM	8	8	7687,5	960,9	2,98
	RK 10 MM	8	12	8625	718,8	2,86
	RK 11 MM	8	8	9125	1140,6	3,06
	RK 12 MM	8	8	4500	562,5	2,75
	RK 13 MM	8	6	4187,5	697,9	2,84
	RK 14 MM	8	7	10375	1482,1	3,17
	RK 15 MM	10	8	3437,5	429,7	2,63
	RK 16 MM	8	7	6062,5	866,1	2,94
	RK 17 MM	8	9	5812,5	645,8	2,81
	RK 18 MM	8	9	2312,5	256,9	2,41
	RK 19 MM	8	8	5437,5	679,7	2,83
	RK 20 MM	8	7	4875	696,4	2,84
<b>Snežnik</b>  <i>M.muscosa</i>	SNŽ 1 MM	5	12	2312,5	192,7	2,28
	SNŽ 2 MM	8	12	9562,5	796,9	2,90
	SNŽ 3 MM	8	7	3562,5	508,9	2,71
	SNŽ 4 MM	8	8	5250	656,3	2,82
	SNŽ 5 MM	8	10	1875	187,5	2,27
	SNŽ 6 MM	8	8	4000	500	2,70
	SNŽ 7 MM	8	8	2000	250	2,40
	SNŽ 8 MM	8	8	3125	390,6	2,59
	SNŽ 9 MM	8	12	5437,5	453,1	2,66
	SNŽ 10 MM	8	8	7500	937,5	2,97
	SNŽ 11 MM	8	8	3750	468,8	2,67
	SNŽ 12 MM	8	8	5625	703,1	2,85
	SNŽ 13 MM	8	8	6500	812,5	2,91
	SNŽ 14 MM	8	8	3187,5	398,4	2,60
	SNŽ 15 MM	8	11	8375	761,4	2,88
	SNŽ 16 MM	8	8	4812,5	601,6	2,78
<b>Črni Kal</b>  <i>M.muscosa</i>	CK 1 MM	8	8	5937,5	742,2	2,87
	CK 2 MM	8	7	4062,5	580,4	2,76
	CK 3 MM	9	8	4250	531,3	2,73
	CK 4 MM	7	8	4937,5	617,2	2,79
	CK 5 MM	7	7	5187,5	741,1	2,87

lokacija	vzorec	št. prašnikov	št. jajčnih celic	št. pelodnih zrn	razmerje P/O	log (razmerje P/O)
	CK 6 MM	8	7	7937,5	1133,9	3,05
	CK 7 MM	8	8	9000	1125	3,05
	CK 8 MM	8	5	4750	950	2,98
	CK 9 MM	8	7	3812,5	544,6	2,74
	CK 10 MM	8	8	3125	390,6	2,59
	CK 11 MM	8	8	2625	328,1	2,52
	CK 12 MM	8	4	3687,5	921,9	2,96
	CK 13 MM	8	11	4250	386,4	2,59
	CK 14 MM	8	8	6437,5	804,7	2,91
	CK 15 MM	7	6	1250	208,3	2,32
	SVB 1 MM	8	8	8062,5	1007,8	3,00
<b>Srednja Vas v Bohinju</b>	SVB 2 MM	8	7	5937,5	848,2	2,93
	SVB 3 MM	7	6	2625	437,5	2,64
	SVB 4 MM	8	4	5437,5	1359,4	3,13
<i>M.muscosa</i>	SVB 5 MM	8	8	3937,5	492,2	2,69
	SVB 6 MM	8	8	6812,5	851,6	2,93
	SVB 7 MM	8	8	4437,5	554,7	2,74
	SVB 8 MM	8	8	3062,5	382,8	2,58
	SVB 9 MM	8	7	3625	517,9	2,71
	SVB 10 MM	8	7	0	0	0,00
	SVB 11 MM	8	8	5250	656,3	2,82
	SVB 12 MM	8	8	5812,5	726,6	2,86
	SVB 13 MM	9	8	4500	562,5	2,75
	SVB 14 MM	8	8	5312,5	664,1	2,82
	SVB 15 MM	8	8	9062,5	1132,8	3,05

\* Kljub manjšemu številu prašnikov ima cvet 7 prašničnih niti