

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

HIBRIDIZACIJA MED PANONSKIM (*TRITURUS  
DOBROGICUS*) IN VELIKIM PUPKOM (*TRITURUS  
CARNIFEX*) V VZHODNI SLOVENIJI

DAMIJANA RAŠL

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Hibridizacija med panonskim (*Triturus dobrogicus*) in velikim pupkom  
(*Triturus carnifex*) v vzhodni Sloveniji**

(Hybridization between Danube crested newt (*Triturus dobrogicus*) and Italian crested newt  
(*Triturus carnifex*) in eastern Slovenia)

Ime in priimek: Damijana Rašl

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentor: doc. dr. Martina Lužnik

Somentor: izr. prof. dr. Elena Bužan

Koper, september 2017

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Damijana RAŠL

Naslov magistrskega dela: Hibridizacija med panonskim (*Triturus dobrogicus*) in velikim (*Triturus carnifex*) pupkom v vzhodni Sloveniji.

Kraj: Koper

Leto: 2017

Število listov: 81

Število slik: 19

Število preglednic: 16

Število prilog: 3

Št. strani prilog: 5

Število referenc: 88

Mentor: doc. dr. Martina Lužnik

Somentor: izr. prof. dr. Elena Bužan

UDK: 597.943(043.2)

Ključne besede: hibridizacija, citokrom b, mikrosateliti, STRUCTURE, reka Mura, *Triturus dobrogicus*, *Triturus carnifex*, panonski pupek, veliki pupek

Izvleček:

V Sloveniji sta razširjeni dve vrsti iz skupine velikih pupkov (*Triturus cristatus* superspecies). To sta splošno razširjen veliki pupek (*Triturus carnifex*) in nedavno odkriti panonski pupek (*Triturus dobrogicus*). Slednji je bil pred našo raziskavo določen le na podlagi morfoloških znakov na območju reke Mure v severovzhodni Sloveniji. V pričujoči raziskavi smo analizirali 64 vzorcev pupkov iz 17 lokacij vzdolž reke Mure. Za določitev vrste in hibridizacije med vrstami smo uporabili analizo fragmenta mitohondrijskega gena (citokrom b) in genotipizacijo jedrnih markerjev (7 mikrosatelitnih lokusov). Na osnovi DNA analize smo potrdili prisotnost panonskega pupka v severovzhodni Sloveniji kot tudi hibridizacijo in introgresijo med obema vrstama. Panonski pupek je bil pogostejši na levem bregu Mure in dolvodno po reki proti tromeji s Hrvaško in Madžarsko. Na desnem bregu sta bila najdena le dva osebka panonskega pupka. Z mikrosatelitnimi markerji smo določili 43 hibridnih osebkov od skupno 64 vzorčenih osebkov. Le 9 osebkov panonskega pupka od 38 je bilo določenih kot čisti genotip. To potrjuje obstoj tako čistih osebkov *T. dobrogicus* kot hibridov *T. dobrogicus* x *T. carnifex* v Sloveniji. Za določitev razširjenosti panonskega pupka in obsežnosti hibridne cone v Sloveniji bodo potrebne dodatne raziskave čez večji del vzhodne Slovenije.

## Key words documentation

Name and SURNAME: Damijana RAŠL

Title of thesis: Hybridization between Danube crested newt (*Triturus dobrogicus*) and Italian crested newt (*Triturus carnifex*) in eastern Slovenia

Place: Koper

Year: 2017

Number of pages: 81

Number of figures: 19

Number of tables: 16

Number of appendix: 3

Number of appendix pages: 5

Number of references: 88

Mentor: Assist. Prof. Martina Lužnik, PhD

Co-Mentor: Assoc. Prof. Elena Bužan, PhD

UDK: 597.943(043.2)

Keywords: hybridization, citokrom b, microsatellite, STRUCTURE, Danube river, *Triturus dobrogicus*, *Triturus carnifex*, Danube crested newt, Italian crested newt

Abstract:

In Slovenia, two species from the *Triturus cristatus* superspecies are present. The widely distributed Italian crested newt (*Triturus carnifex*), and recently discovered Danube crested newt (*Triturus dobrogicus*). Before our study *T. dobrogicus* was determined only on the basis of morphological signs in area of river Mura in north-east part of Slovenia. In this study, we analyzed 64 sampled newts from 17 localities along the Mura river. For species determination and hybrid detection we used fragment of mitochondrial gene (cytochrome b) and nuclear (7 microsatellite loci) markers. With DNA analysis we confirmed the presence of Danube crested newt in north-east Slovenia, as well as hybridization and introgression between the two species. *T. dobrogicus* was more frequent on the left river bank of Mura river and downstream along the river to the border with Croatia and Hungary. On the right river bank only two *T. dobrogicus* specimens were found. With microsatellite markers, we determined 43 hybrid specimens from a total of 64 samples. Only 9 *T. dobrogicus* of 38 specimens were designated as pure genotype. This confirms the existence of both pure *T. dobrogicus* specimens and *T. dobrogicus* x *T. carnifex* hybrids in Slovenia. Additional research in east Slovenia will be needed to determine the prevalence of *T. dobrogicus* and the extent of the hybrid zone.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Martini Lužnik za vso pomoč in usmeritve pri izdelavi magistrske naloge.

Prav tako se zahvaljujem somentorici izr. prof. dr. Eleni Bužan za tehtne popravke magistrske naloge.

Za pomoč pri laboratorijskem delu magistrske naloge se zahvaljujem asist. Sari Zupan.

Dr. Petru Glasnoviću se zahvaljujem za nasvete pri izrisu zemljevidov, ki so del magistrske naloge.

Zahvaljujem se Centru za kartografijo favne in flore za posredovane vzorce pupkov.

Zahvaljujem se Martinu Seniču, Sari Cernich in Domnu Staniču za vsa lepo preživeta študentska leta.

Prav tako se zahvaljujem svoji družini, prijateljem in Primožu Volariču za spodbudne besede in podporo skozi vsa leta študija.

## Kazalo vsebine

<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Veliki pupek ( <i>Triturus carnifex</i> ) (Laurenti 1768) .....	2
1.1.1 Opis vrste .....	2
1.1.2 Razlikovanje od ostalih vrst .....	3
1.1.3 Habitat .....	4
1.1.4 Razširjenost vrste .....	4
1.1.5 Varstveni status in vzroki ogroženosti .....	5
1.2 Panonski pupek ( <i>Triturus dobrogicus</i> ) (Kiritzescu 1903) .....	6
1.2.1 Opis vrste .....	6
1.2.2 Razlikovanje od ostalih vrst .....	6
1.2.3 Habitat .....	6
1.2.4 Razširjenost vrste .....	7
1.2.5 Varstveni status in vzroki ogroženosti .....	8
1.3 Hibridizacija med velikim in panonskim pupkom .....	9
1.4 Genetski markerji .....	11
1.4.1 Gen za citokrom b .....	11
1.4.2 Mikrosateliti .....	12
1.5 Parametri genetske diverzitete .....	13
1.5.1 Heterozigotnost .....	14
1.5.2 Hardy-Weinbergovo ravnotežje .....	14
1.5.3 Vezano neravnovesje (Linkage disequilibrium, LD) .....	15
1.5.4 Nei-jeva genetska razdalja .....	15
1.5.5 Koeficient inbreedinga ( $F_{IS}$ ) .....	15
1.5.6 Število alelov (NA) .....	16
1.5.7 Bogastvo alelov (AR) .....	16
1.6 Namen in cilji dela .....	16
<b>2 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>18</b>
2.1 Vzorčenje .....	18
2.2 Izolacija DNA .....	20

2.3	Merjenje koncentracij DNA in nečistoč .....	20
2.4	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	21
2.5	Določanje nukleotidnega zaporedja: Citokrom b .....	21
2.5.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	21
2.5.2	Gelska elektroforeza .....	22
2.5.3	Direktno čiščenje PCR produktov .....	23
2.5.4	Sekvenčna reakcija.....	23
2.5.5	Čiščenje s precipitacijo z etanol/EDTA .....	23
2.5.6	Obdelava podatkov nukleotidnega zaporedja .....	23
2.6	Določanje mikrosatelitnih lokusov .....	24
2.6.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	24
2.6.2	Fragmentna analiza .....	26
2.6.3	Analiza mikrosatelitnih lokusov .....	26
<b>3</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>30</b>
3.1	Izolacija DNA in rezultati masne koncentracije .....	30
3.2	Analiza mitohondrijskega zaporedja .....	30
3.3	Analiza mikrosatelitnih lokusov .....	36
3.3.1	Vizualizacija alelov in preverjanje kvalitete podatkov mikrosatelitnih lokusov .....	36
3.3.2	Analiza genetske diverzitete .....	37
3.4	Analiza populacijske strukture in hibridizacije med velikim ( <i>Triturus carnifex</i> ) in panonskim ( <i>Triturus dobrogicus</i> ) pupkom.....	40
<b>4</b>	<b>DISKUSIJA</b> .....	<b>46</b>
4.1	Analiza mtDNA .....	46
4.2	Analiza mikrosatelitnih lokusov .....	47
4.3	Hibridizacija med panonskim in velikim pupkom .....	48
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČEK</b> .....	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA IN VIRI</b> .....	<b>55</b>

## Kazalo preglednic

<b>Preglednica 1:</b> Vrednosti Wolterstorffovega indeksa in število vretenc, ki nosijo rebra, za posamezne vrste iz skupine velikih pupkov (Povzeto po Jehle in sod. 2011).....	4
<b>Preglednica 2:</b> Lokacije vzorčenj z geografskimi lokacijami in številom vzorcev in pripadajočo populacijo.....	18
<b>Preglednica 3:</b> Podatki o populacijah.....	19
<b>Preglednica 4:</b> Lastnosti 8 mikrosatelitnih lokusov, ki so bili uporabljeni na 64 vzorcih.....	25
<b>Preglednica 5:</b> Referenčni vzorci za panonskega ( <i>T. dobrogicus</i> ) in velikega ( <i>T. carnifex</i> ) pupka.....	29
<b>Preglednica 6:</b> Rezultati določitve vrste izoliranih osebkov iz Reke Mure na podlagi citokroma b s pripadajočimi haplotipi.....	31
<b>Preglednica 7:</b> Razpon alelov, število alelov in število privatnih alelov na lokus. ....	37
<b>Preglednica 8:</b> Genetska diverziteta velikega in panonskega pupka v vzhodni Sloveniji.).....	38
<b>Preglednica 9:</b> Število alelov (NA) glede na lokus in populacijo.....	38
<b>Preglednica 10:</b> Bogastvo alelov (AR) glede na lokus in populacijo.....	38
<b>Preglednica 11:</b> Vrednosti FIS glede na lokus in populacijo.....	39
<b>Preglednica 12:</b> Hardy-Weinbergov test ravnotežja glede na lokus in populacijo.....	40
<b>Preglednica 13:</b> Niejeva genetska razdalja med populacijami.....	40
<b>Preglednica 14:</b> Rezultati koeficienta mešanja ( $q$ ) glede na lokacije vzorčenja.....	44
<b>Preglednica 15:</b> Primerjava števila alelov na lokus z drugimi raziskavami.....	47
<b>Preglednica 16:</b> Primerjava rezultatov morfoloških in molekularnih metod iz območja Mure. ....	50



## Kazalo slik

<b>Slika 1:</b> Razširjenost pupkov iz skupine <i>Triturus</i> .....	2
<b>Slika 2:</b> Razširjenost velikega pupka ( <i>Triturus carnifex</i> ).....	5
<b>Slika 3:</b> Razširjenost panonskega pupka ( <i>Triturus dobrogicus</i> ).....	8
<b>Slika 4:</b> Lokacije vzorčenj ob reki Muri. ....	19
<b>Slika 5:</b> Slika gela pod UV lučjo, prikazanih je 37 uspešno pomnoženih fragmentov citokroma b. ....	22
<b>Slika 6:</b> Referenčni vzorci velikega ( <i>T. carnifex</i> ) in panonskega ( <i>T. dobrogicus</i> ) pupka.....	29
<b>Slika 7:</b> Razporeditev haplotipov gena za citokrom b glede na geografsko lokacijo vzorcev.....	33
<b>Slika 8:</b> Razporeditev haplotipov znotraj populacij.....	33
<b>Slika 9:</b> Mreža haplotipov panonskega in velikega pupka.....	34
<b>Slika 10:</b> Drevo največjega verjetja (angl. maximum likelihood) vzorcev velikega in navadnega pupka iz SV Slovenije.....	35
<b>Slika 11:</b> Prikaz izrisa alelov v programu Genemapper 4.1v.....	36
<b>Slika 12:</b> Pričakovana ( $H_e$ ) in opažena heterozigotnost ( $H_o$ ) glede na populacijo.....	39
<b>Slika 13:</b> Strukturiranost vzorčenih lokacij za K2 - K5.....	41
<b>Slika 14:</b> Izbira najbolj verjetnega števila skupin z metodo $\Delta K$ (Evano in sod. 2006).....	42
<b>Slika 15:</b> Delež mešanja ( $q$ ) med velikim in panonskim pupkom v vzhodni Sloveniji na podlagi rezultatov programa STRUCTURE po prvi metodi.....	42
<b>Slika 16:</b> Delež mešanja ( $q$ ) med velikim in panonskim pupkom v vzhodni Sloveniji na podlagi rezultatov programa STRUCTURE po drugi metodi. ....	43
<b>Slika 17:</b> Grafični prikaz razvrstitve vzorcev glede na parameter mešanja $q$ (Structure) z uporabo mikrosatelitnih podatkov.....	44
<b>Slika 18:</b> Strukturiranost vzorčenih lokacij za K2 - K5. ....	45

<b>Slika 19:</b> Vzorci panonskega pupka in hibridnih osebkov med velikim in panonskim pupkom na Hrvaškem, Avstriji in Madžarskem.....	52
--	----

## **Kazalo prilog**

**Priloga A:** Koncentracije izoliranih vzorcev

**Priloga B:** Rezultati vezanega neravnovesja (Linkage disequilibrium)

**Priloga C:** Rezultati mešanja med *T. dobrogicus* in *T. carnifex* za vsak vzorec

## Seznam kratic

<b>A260</b>	absorbanca pri valovni dolžini 260nm
<b>A280</b>	absorbanca pri valovni dolžini 280nm
<b>AIC</b>	Akaike informacijski kriterij (angl. Akaike information criterion)
<b>AR</b>	bogastvo alelov
<b>BIC</b>	Bayesov informacijski kriterij (angl. Bayes information criterion)
<b>bp</b>	bazni par
<b>CYT b</b>	citokrom b (angl. Cytochrome b)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	voda brez RNA in DNA
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>EDTA</b>	etildiamin tetraacetna kislina
<b>F<sub>IS</sub></b>	koeficient inbridinga
<b>He</b>	pričakovana heterozigotnost
<b>Ho</b>	opažena heterozigotnost
<b>H-W</b>	Hardy-Weinbergovo ravnotežje
<b>K</b>	klaster/gruča (angl. Cluster)
<b>LD</b>	vezano neravnovesje (angl. linkage disequilibrium)
<b>MCMC</b>	Markova veriga Monte Carlo (angl. Markov Chain Monte Carlo)
<b>MtDNA</b>	mitohondrijska deoksiribonukleinska kislina
<b>NA</b>	število alelov
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>RAPD</b>	naključno pomnoževanje polimorfne DNA (angl. random amplified polymorphic DNA)
<b>RBW</b>	število vretenc, ki nosijo rebra
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina
<b>SD</b>	standardna deviacija

<b>STR</b>	kratka tandemska zaporedja (angl. short tandem repeats)
<b>SSR</b>	enostavna zaporedja (angl. simple sequence repeat)
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>WI</b>	Woltestorffov indeks

## 1 UVOD

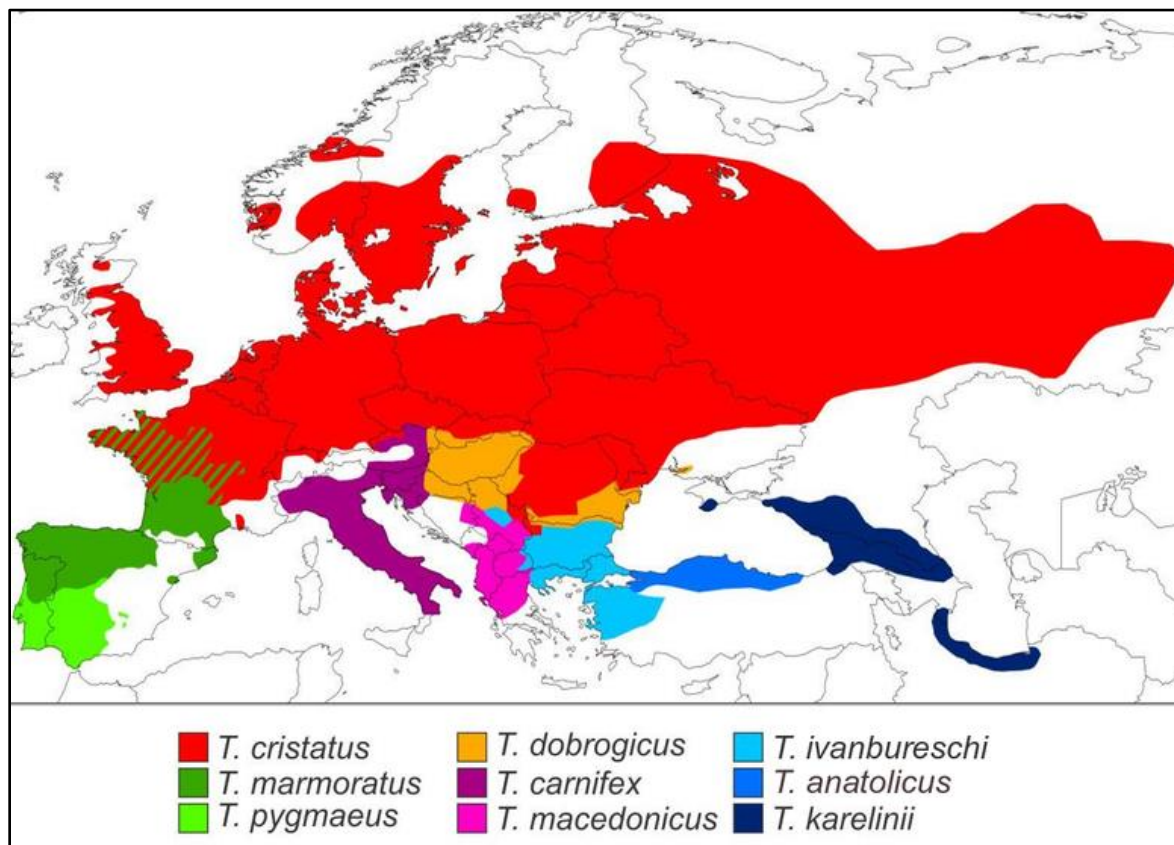
V Sloveniji so razširjene štiri vrste pupkov, navadni pupek (*Lissotriton vulgaris*), planinski pupek (*Mesotriton alpestris*), veliki pupek (*Triturus carnifex*) in panonski pupek (*Triturus dobrogicus*) (Veenvliet in Kus Veenvliet 2008; Stanković in Delić 2012). Velikega in panonskega pupka uvrščamo v rod *Triturus*, ki je razdeljen na marmorirane pupke (angl. Marbled newts) in na skupino velikih pupkov (angl. Crested newts superspecies). K marmoriranim pupkom prištevamo 2 vrsti, *Triturus marmoratus* in *Triturus pygmaeus* (Jehle in sod. 2011). V skupino velikih pupkov pa po zadnjih objavah prištevamo 7 vrst: veliki pupek (*Triturus carnifex*), severni veliki pupek (*Triturus cristatus*), panonski pupek (*Triturus dobrogicus*), *Triturus karelinii*, *Triturus macedonicus*, *Triturus ivanbureschi* in *Triturus anatolicus* (Wielstra in sod. 2013; Wielstra in Arntzen 2016) (Slika 1). Veliki pupek je razširjen po vsej Sloveniji, medtem ko je bil panonski pupek doslej najden le ob reki Muri na severovzhodu Slovenije (Veenvliet in Kus Veenvliet 2008; Stanković in Delić 2012).

Pupki so, kot ostale vrste dvoživk, ogroženi tako na globalni kot lokalni ravni. Dvoživke so občutljive na spremembe in jih prizadenejo že manjše spremembe v okolju. Velik problem predstavlja intenzifikacija kmetijstva, pri katerem se uporablja večja količina gnojil in škropiv, ki pridejo v stik z vodnimi habitatmi dvoživk. V stiku z onesnaženo vodo se lahko koža dvoživk poškoduje, saj je izredno tanka in prepustna (Arntzen in sod. 1997; Veenvliet in Kus Veenvliet 2008). V veliki meri jih ogroža degradacija, izsuševanje in zaraščanje vodnih habitatov (Jehle in sod. 2011). Ogroža jih tudi cestna infrastruktura, ki povzroči fragmentacijo kopenskih habitatov ter jim otežuje selitev med vodnimi in kopenskimi bivališči, in veliko dvoživk tako končna pod kolesi avtomobilov (Veenvliet in Kus Veenvliet 2008; Jehle in sod. 2011).

Določene vrste dvoživk ogroža tudi hibridizacija, ki se pojavlja na stičnih območjih arealov ozko sorodnih vrst (Mikuliček in sod. 2012). Skupina velikih pupkov ima parapatrično razširjenost, na nekaterih območjih tako prihaja do stika dveh ali celo treh vrst, pri katerih je mnogokrat potrjena hibridizacija in introgresija genov (Maletzky in sod. 2008; Maletzky in sod. 2010, Mikuliček in sod. 2012, Wielstra in Arntzen 2012).

Na območju Mure v Sloveniji se stikata areala velikega in panonskega pupka, zato obstaja velika verjetnost, da med vrstama na tem območju poteka hibridizacija. Tako je možno, da v Sloveniji nimamo čistih populacij panonskega pupka, temveč le hibride obeh vrst. Zato želimo v nalogi z molekularnimi metodami (uporabo različnih molekulskih markerjev) določiti vrstno pripadnost ujetim osebkom pupkov vzdolž reke Mure. Prav tako bomo raziskali genetsko diverziteto populacij ter njihovo genetsko strukturiranost. Preverili bomo ali prihaja na območju Mure do hibridizacije med obema vrstama. Za uspešno varovanje vrst in njihovih populacij je s stališča varstvene biologije pomembna taksonomska določitev oz. določitev evolucijsko

pomembnih enot pri genetsko čistih populacijah in pri tem pri tem iz varovanja izločiti hibride med dvema ali več vrstami.



Slika 1: Razširjenost pupkov iz skupine *Triturus*. (Prirejeno po Wielstra in Arntzen 2011).

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

### 1.1.1 Opis vrste

Veliki pupki so na zgornji strani telesa rjavo, sivo ali rumenkasto obarvani. Trebuh imajo obarvan v značilno živo oranžni barvi s številnimi temnimi lisami, na bokih imajo lahko nekaj belih pik (Arnold in Ovenden 2002; Veenvliet in Kus Veenvliet 2008; Jehle in sod. 2011). Grlo je temne barve, posuto z majhnimi belimi pikami (Veenvliet in Kus Veenvliet 2008; Jehle in sod. 2011). Samice odraslega velikega pupka dosegajo dolžino telesa do 18 cm, samci so v povprečju nekoliko krajši (Arnold in Ovenden 2002; Veenvliet in Kus Veenvliet 2008). Samca ločimo od samice po tem, da ima po sredini repa svetlomodro progo in večjo kloako kot samica. V času parjenja imajo samci nazobčan hrbtni greben, ki pa je manj nazobčan kot pri panonskem in severnem velikem pupku (Veenvliet in Kus Veenvliet 2008; Jehle in sod. 2011). Samice imajo spodnji del repa oranžno obarvan, večina samic ima tudi rumeno progo, ki poteka čez hrbet (Arnold in Ovenden 2002; Veenvliet in Kus Veenvliet 2008; Jehle in sod. 2011). Obdobje

parjenja poteka v stoječih vodah od aprila do junija. Samica jajčeca, ki so ovalne oblike, zavije v liste rastlin, s čimer jih zavaruje pred plenilci (Veenvliet in Kus Veenvliet 2008). Ličinke imajo na hrbtnem delu repnega grebena velike temne pike, greben je visok in sega daleč naprej po telesu, vse do glave. Rep je na koncu oblikovan v tanko nitasto konico. Prste zadnjih okončin imajo podaljšane. Skupna dolžina telesa ličinke velikega pupka je do 9 cm (Jehle in sod. 2011). Preobrazba ličink se dogaja v septembru, ko so ličinke velike približno 70 mm (Griffiths 1996). Mladi, preobraženi osebki imajo na trebuhu manj lis kot odrasli, na hrbtu pa imajo rumeno progo, tako kot samice. Večina aktivnosti pupkov poteka ponoči in po dežju (Veenvliet in Kus Veenvliet 2008). Življenjska doba velikega pupka je do 16 let (Jehle in sod. 2011).

### 1.1.2 Razlikovanje od ostalih vrst

Veliki pupek se od ostalih vrst iz rodu *Triturus* loči po tem, da je precej robusten in ima dolge noge. Robustna telesa z daljšimi okončinami imajo prednost pri premikanju na kopnem. Veliki pupek tako večino življenja preživi na kopnem, le okoli štiri mesece preživi v vodi (Arntzen in sod. 2007; Mikuliček in sod. 2012). Od severnega velikega pupka se loči po tem, da ima bolj gladko kožo, trebuh pa ima pogosto bolj oranže barve (Arnold in Ovenden 2002). Ker je ločitev vrst iz rodu velikih pupkov na podlagi morfoloških znakov težavna, se za determinacijo vrst uporablja Woltestorffov indeks, ki ga je razvil herpetolog Willy Wolterstorff (Arntzen in sod. 2007). To je razmerje med dolžino sprednjih okončin in razdaljo med sprednjimi in zadnjimi okončinami (Arntzen in sod. 2007). Pri uporabi Wolterstorffovega indeksa prihaja do 31% napačno določenih vrst, zato je že Wolterstorff predvidel, da bi uporaba značilnosti skeleta dala boljše kriterije za ločevanje med vrstami (Arntzen in Wallis 1994). Tako je zanesljivejša metoda določanja vrste rentgenska analiza števila vretenc, ki nosijo rebra (RBV), kar sta potrdila tudi Arntzen in Wallis (1994), ki sta ugotovila, da ta metoda vodi le do 13,7% napačne določitve vrste. Vrednosti Wolterstorffovega indeksa in števila vretenc, ki nosijo rebra, so za posamično vrsto prikazane v Preglednici 1. Iz preglednice je razvidno, da je indeks dobro merilo za ločitev panonskega pupka od drugih vrst, medtem ko je ostale vrste med sabo težje ločiti (Jehle in sod. 2011). Za določitev vrstne pripadnosti so v takem primeru najzanesljivejše molekularno genetske metode (Wielstra in Arntzen 2016).



**Preglednica 1:** Vrednosti Wolterstorffovega indeksa in število vretenc, ki nosijo rebra, za posamezne vrste iz skupine velikih pupkov (Povzeto po Jehle in sod. 2011).

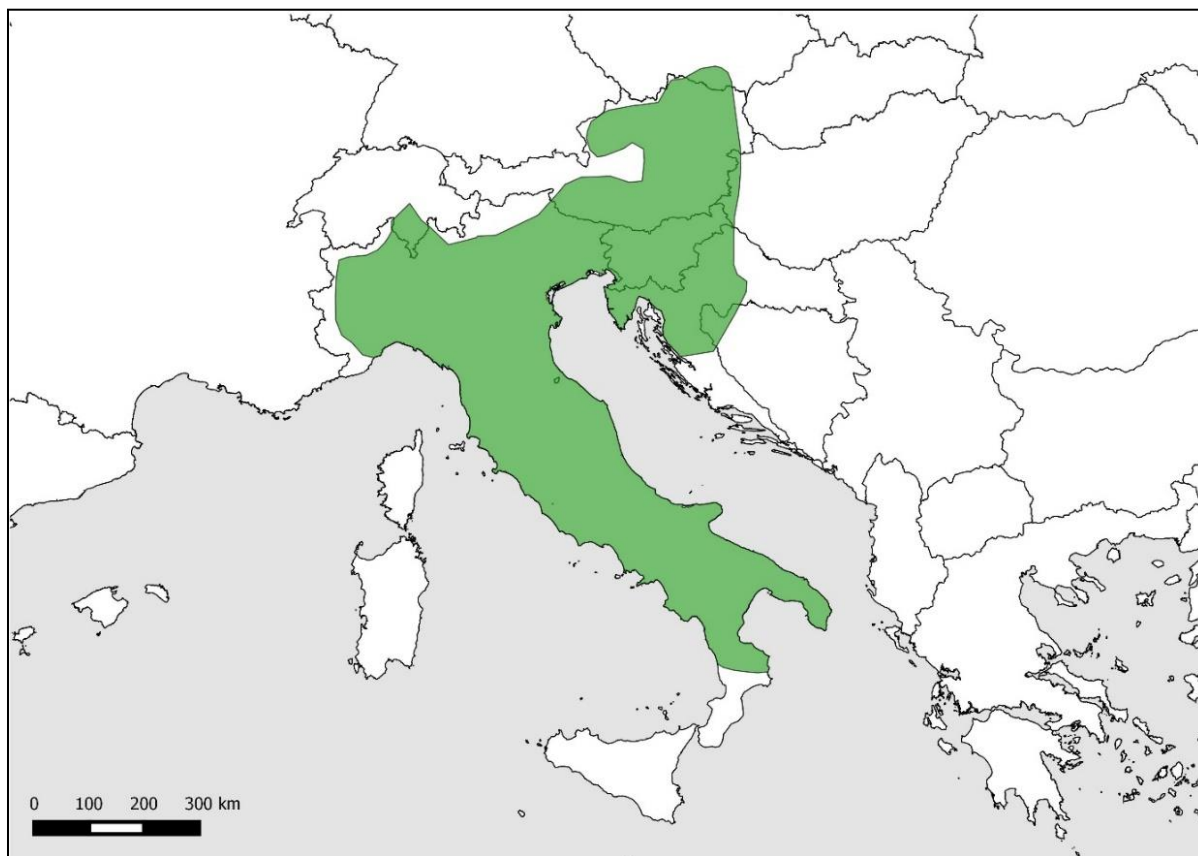
	Wolterstorffov indeks		Število vretenc, ki nosijo rebra
	Samci	Samice	
<i>Triturus dobrogicus</i>	< 54	< 46.2	16-17
<i>Triturus cristatus</i>	54.0-63.7	46.2-53.9	15
<i>Triturus carnifex</i>	63.7-67.1	53.9-59.2	14
<i>Triturus karelinii</i>	> 67.1	> 59.2	13

### 1.1.3 Habitat

Pupki iz rodu *Triturus* imajo radi odprte, večje in globlje vodne habitate, kot druge vrste pupkov. Raje se zadržujejo v vodnih telesih, ki niso pretirano osenčena in so v srednjem in poznem sukcesijskem stadiju. Vegetacija in druge strukture v vodnih habitatih so pomembne pri odlaganju jajčec pupkov (Jehle in sod. 2011). Razmnoževanje in razvoj ličink poteka v stalnih ali občasnih vodnih telesih, vendar se izogibajo habitatov v katerih so naseljene ribe. Veliki pupek preživi v vodi 4 mesece. Najdemo jih tako v stoječih kot počasi tekočih vodah. Pogosto pa naseljujejo tudi habitate, ki jih je ustvaril človek, kot so kamnolomi, vodnjaki, kali, cisterne in korita za napajanje (Veenvliet in Kus Veenvliet 2008; Arntzen 2007; Romano in sod. 2009; Jehle in sod. 2011). Po končani paritvi se pupki preselijo na kopno, kjer se skrivajo pod kamni in debli, zaradi česar jih je na kopnem zelo težko opaziti. Na kopnem jih najdemo večinoma v listnatih in mešanih gozdovih, ki so od 100 do 200 m oddaljeni od razmnoževalnih habitatov. Veliki pupek je razširjen vse od morja do 2000 m morske višine (Romano in sod. 2009).

### 1.1.4 Razširjenost vrste

Veliki pupek se pojavlja v Italiji (brez otokov), Sloveniji, severnem delu Hrvaške, na severozahodnem delu Bosne in Hercegovine, zahodnem delu Madžarske, v Avstriji, severno od Alp in južnem delu Češke. Vnesen je bil tudi na Nizozemsko, na Azore (Portugalska), Švico, Nemčijo in v Veliko Britanijo (Romano in sod. 2009). Razširjenost je prikazana na Sliki 2. V Sloveniji je splošno razširjen, vendar razmeroma redek (Veenvliet in Kus Veenvliet 2008).



**Slika 2:** Razširjenost velikega pupka (*Triturus carnifex*).

### 1.1.5 Varstveni status in vzroki ogroženosti

V Sloveniji je veliki pupek, kot vse ostale dvoživke, zavarovan z Uredbo o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah (Url. I. RS št. 2004, dopolnitev 13.10.2016). Živali je tako prepovedano loviti, vznemirjati, usmrtiti, zastrupljati in odvzeti iz narave. V uredbi je dopuščena izjema le za raziskovalne namene. Veliki pupek je uvrščen na Rdeči seznam ogroženih rastlinskih in živalskih vrst (2002) kot ranljiva vrsta. Zaščiten je tudi z Direktivo sveta o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst (92/43/EGS z dne 21. maja 1992), kjer spada v kategorijo II in IV. Kategorija II določa živalske in rastlinske vrste, ki so pomembne za Evropsko unijo in za ohranjanje katerih je potrebno določiti posebna ohranitvena območja. Priloga IV pa določa živalske in rastlinske vrste, ki so pomembne za Evropsko unijo in jih je potrebno strogo varovati. Po Bernski konvenciji (Konvencija o varstvu prosto živečega evropskega rastlinstva in živalstva ter njihovih naravnih življenjskih prostorov, sprejeta v Bernu 19. septembra 1979, ratificirana v Sloveniji leta 1999) spada veliki pupek v kategorijo II, za katero velja, da je vrsta strogo zavarovana. Na Rdečem seznamu IUCN je veliki pupek uvrščen med manj ogrožene vrste (angl. *Least Concern*), zaradi široke razširjenosti, tolerance na različne habitate, zaradi velike populacije in ker je malo verjetno, da bo v naslednjih letih upad populacije tolikšen, da bi bila vrsta klasificirana v višjo kategorijo ogroženosti (Romano in sod.

2009). Veliki pupek je kot ostale vrste dvoživk občutljiv na spremembe v kvaliteti vode. Največjo grožnjo pa predstavlja izguba vodnih habitatov zaradi intezifikacije kmetijstva in zaradi onesnaževanja vodnih teles. Ogroža pa jih tudi introdukcija plenilskih rib v vodne habitate (Romano in sod. 2009).

## **1.2 Panonski pupek (*Triturus dobrogicus*) (Kiritzescu 1903)**

### **1.2.1 Opis vrste**

Skupna dolžina telesa panonskega pupka znaša pri samcih do 13 cm, pri samicah pa do 16 cm (Arnold in Ovenden 2002; Jehle in sod. 2011). Imajo sorazmerno vitko in dolgo telo z relativno kratkimi nogami (Griffiths 1996; Jehle in sod. 2011). V vodi preživijo 6 mesecev (Arntzen in sod. 2007; Jehle in sod. 2011). Hrbtna stran telesa je črno, temno rjavo, lahko pa tudi rdečkasto obarvana. Pogosto imajo opazne temnejše lise in drobne bele pike na bokih (Griffiths 1996; Arnold in Ovenden 2002; Jehle in sod. 2011). Grlo je sive ali črne barve z belimi pikami, ki so bolj pogoste pri samicah. Nekatere samice imajo po hrbtu rumeno črto (Jehle in sod. 2011). Na ventralni strani so obarvani temno oranžno ali rdeče, s črno-rjavimi pikami, ki se lahko združijo in tvorijo en ali dva pasa. V sezoni parjenja imajo samci zelo visok in nazobčan greben na telesu, ki je ločen od bolj gladkega grebena na repu (Griffiths 1996; Arnold in Ovenden 2002; Jehle in sod. 2011). Panonski pupek ima najmanjšo velikost jajčec med velikimi pupki, ter najmanjšo velikost ličinke ob izvalitvi (Jehle in sod. 2011). Ličinke so čokate, temno obarvane z velikim številom rebrnih utorov (Arntzen in sod. 2007). Preobraženi osebki zapustijo vodne habitate okrog oktobra (Jehle in sod. 2011).

### **1.2.2 Razlikovanje od ostalih vrst**

Panonski pupek se od sorodnih vrst razlikuje predvsem zaradi načina življenja, saj je najbolj akvatična vrsta iz skupine velikih pupkov (Mikuliček in sod. 2012). Dolgo obdobje, ki ga preživi v vodi, se odraža na obliki telesa, ki je prilagojena plavanju. Od ostalih vrst ga lahko ločimo tudi z uporabo Wolterstorffovega indeksa (Preglednica 1), ki je pri panonskem pupku najnižji. Možno je tudi razlikovanje s štetjem vretenc, ki nosijo rebra, saj jih ima panonski pupek največ (16-17) (Preglednica 1). Pri razlikovanju od drugih vrst pomaga tudi pregled obarvanosti, panonski pupek ima na bokih bele pike, grlo ima rjavo-črno obarvano z belimi pikami. Trebušna stran je oranžno obarvana s črnimi lisami, ki se v večini primerov združujejo longitudinalno. Od velikega pupka se obarvanost razlikuje po tem, da ima veliki pupek rumeno obarvano trebušno stran z manj definiranimi lisami (Stanković in Delić 2012).

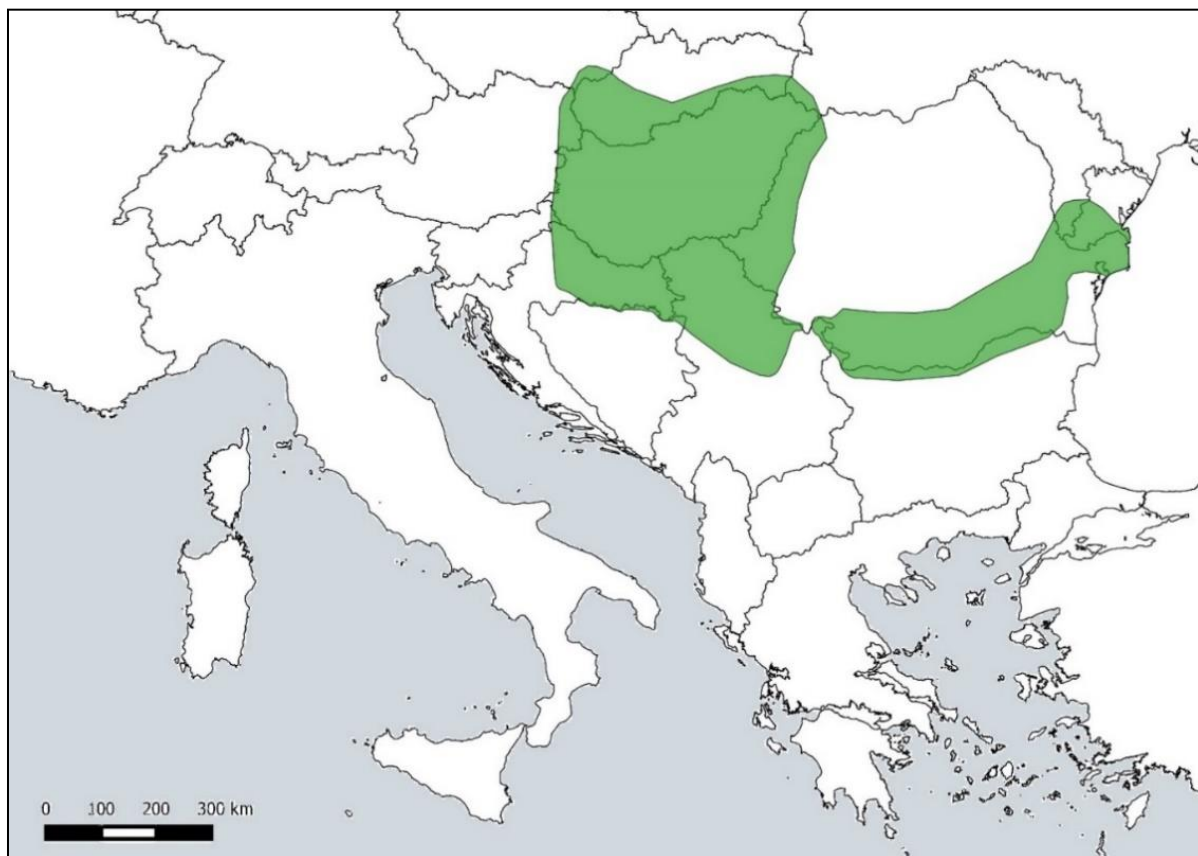
### **1.2.3 Habitat**

Panonski pupek je vrsta, ki poseljuje nižinske habitate. Na kopnem ga najdemo na odprtih območjih z mešanimi listopadnimi gozdovi, v nasadih, grmovju, poplavnih travnikih, močvirjih

pa tudi na kmetijskih površinah, ob obrežni vegetaciji in v stepah (Arntzen in sod. 2009). Njihovi značilni vodni habitati so poplavna območja z jezeri in mrtvicami, najdemo pa jih tudi v ribnikih, mlakah, manjših vodnih telesih in tudi v rekah (Griffiths 1996). Lahko sobiva z ribami v mrtvicah, ob rečnih obrobjih in drugih stalnih vodnih telesih. Lahko se pa pojavi tudi na motenih habitatih in habitatih v bližini človeških bivališč (Griffith 1996; Arnold in Ovenden 2002). Migracija v vodna telesa, kjer poteka razmnoževanje, traja od sredine februarja do konca marca (Griffith 1996). Razmnožujejo se v manjših vodnih telesih z mirujočo vodo, lahko tudi v kanalih, mlakah in na poplavljenih območjih (Arntzen in sod. 2009). Zaradi pogostih poplav v nižinskih habitatih, so populacije povezane in temu primeren je visok genski pretok med njimi (Mikuliček in sod. 2012). Običajno ga najdemo na območjih pod 300 m nadmorske višine (Arntzen in sod. 2009).

#### **1.2.4 Razširjenost vrste**

Panonski pupek je razširjen v Panonski in Donavski ravnini (Arntzen in sod. 2007). Najdemo ga v vzhodni Avstriji, južni Češki, Slovaški, Madžarski, severni Hrvaški, severni Bosni in Hercegovini, severni Srbiji, zahodni Romuniji, severni Bolgariji, južni Moldaviji in Ukrajini (Arntzen in sod. 2009; Jehle in sod. 2011). Razširjenost panonskega pupka je prikazana na Sliki 3. Z uporabo Wolterstorffovega indeksa sta Stanković in Delić (2012) leta 2009 zabeležila panonskega pupka na Dolinskem polju v severovzhodni Sloveniji, kar so potrdile tudi nadaljnje molekularne raziskave z uporabo mitohondrijske DNA (mtDNA) (Lužnik in sod. 2015).



**Slika 3:** Razširjenost panonskega pupka (*Triturus dobrogicus*).

### 1.2.5 Varstveni status in vzroki ogroženosti

Panonski pupek je v Evropski uniji zaščiten z Direktivo sveta o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst (92/43/EGS z dne 21. maja 1992). Uvrščen je v kategorijo II, ki določa živalske in rastlinske vrste, ki so pomembne za Evropsko unijo in za ohranjanje katerih je potrebno določiti posebna ohranitvena območja. Panonski pupek je zaščiten tudi po Bernski konvenciji (Konvencija o varstvu prosto živečega evropskega rastlinstva in živalstva ter njihovih naravnih življenjskih prostorov, sprejeta v Bernu 19. Septembra 1979, ratificirana v Sloveniji leta 1999), pod kategorijo II, ki varuje strogo zavarovane živalske vrste. Zaščiten je tudi z nacionalno Uredbo o zavarovanih prostoživečih vrstah (Ur. l. RS št. 46/04 z dne 30. 4. 2004). V tej Uredbi je uvrščen v Prilogo 2 Poglavja B, sem spadajo tiste živalske vrste, ki niso domorodne na območju Republike Slovenije in za katere so, če se pojavijo ali razširijo na območje Republike Slovenije brez človekove pomoči iz naravnih območij razširjenosti, določeni ukrepi varstva habitatov in smernice za ohranitev ugodnega stanja njihovih habitatov. Na rdečem seznamu IUCN je panonski pupek označen kot potencialno ogrožena vrsta (angl. *Near Threatened*), ker je vrsta v opaznem zmanjševanju zaradi izgube habitata na širšem območju njene razširjenosti, in zaradi česar lahko postane v prihodnosti ranljiva vrsta (angl. *Vulnerable*) (Arntzen in sod. 2009). Glavna grožnja

panonskemu pupku je hitra izguba habitatov zaradi človeških dejavnosti, kot so zaježitve, izsuševanje in onesnaževanje njihovih vodnih habitatov. V južnem delu njegove razširjenosti je prišlo do izgube razmnoževalnih habitatov zaradi povečanja spomladanskega dežja, ki je verjetno rezultat podnebnih sprememb (Arntzen in sod. 2009). Grožnjo jim predstavlja tudi hibridizacija z drugimi vrstami na stičnih območjih.

### 1.3 Hibridizacija med velikim in panonskim pupkom

Hibridizacija je proces pri katerem prihaja do parjenja osebkov genetsko oddaljenih populacij ne glede na taksonomski status populacij (Allendorf in sod. 2001; Avise 2004; Mills 2013). Kljub temu, da biološki koncept vrste opredeljuje vrsto kot skupino organizmov, ki se med seboj razmnožujejo in so reproduktivno izolirane od drugih takšnih skupin, se pogosto zgodi, da prihaja med sorodnimi vrstami do hibridizacije. Do tega prihaja zato, ker proces speciacije pogosto vključuje fazo, v kateri si vrste še vedno lahko izmenjujejo genetski material (Freeland in sod. 2011; Wielstra in sod. 2017). Hibridizacija je lahko naravnega ali antropogenega izvora. Slednja ima številne negativne posledice na vrste in populacije v svetu. Stopnje hibridizacije in introgresije se na svetu povečujejo, predvsem zaradi translokacij organizmov in spreminjanja habitatov s strani človeka. Negativne posledice hibridizacije so na svetu vodile do izumrtja številnih populacij in vrst rastlinskih ter živalskih taksonov (Allendorf in sod. 2001). Posledica hibridizacije so lahko tudi malformacije osebkov, ki se nahajajo v hibridnih conah (Mačat in sod. 2015).

Hibridizacija je posebej problematična za redke vrste, ki pridejo v kontakt z bolj pogostimi vrstami, kar vodi v zmanjšan fitnes redkih vrst ali genetske združitve obeh vrst (Allendorf in sod. 2001; Ferrière in sod. 2004). V nasprotju z antropogeno ima lahko naravna hibridizacija tudi pozitivne učinke na populacije in vrste. Definirana je kot sekundarni kontakt med dvema populacijama, ki sta se razvili ločeno skozi daljše časovno obdobje (Genovart 2009). Naravna hibridizacija je imela pomembno vlogo v evoluciji mnogih taksonov (Allendorf in sod. 2001). Je evlucijski fenomen, ki lahko okrepi paritvene preference, kar lahko vodi v popolno izolacijo vrst, ali pa privede do izvora novih evlucijskih linij (Marie Curie Speciation network 2012).

Hibridizacija poteka v hibridni conah. To so regije, kjer se genetsko ločene populacije stikajo, razmnožujejo in imajo potomce mešanih prednikov. Hibridi imajo po navadi genetsko manj združljive kombinacije genov (notranji izbor), kasnejše generacije hibridov pa imajo introgresirane alele, ki vodijo k zmanjšanju fitnesa v novih ekoloških in vedenjskih razmerah (zunanja selekcija). Hibridna cona se pogosto vzdržuje zaradi nenehnega odstranjevanja neprimernih genotipov, ki je uravnotežen s pritokom genov iz starševske populacije (Barton in Hewit 1985). Medvrstni genski pretok je olajšan z vzpostavitvijo hibridnih con, ki nastanejo ob sekundarnem kontaktu vrst. V primeru, da ena od vrst zamenja drugo, pride do premika hibridne cone. Hibridne cone pogosto nastanejo na mestih, kjer prihaja do okoljskih tranzicij, kar kaže

na to, da so vrste v hibridni coni prilagojene na različne okoljske razmere (Wielstra in sod. 2017).

Do leta 1960 je detekcija hibridnih osebkov temeljila na morfoloških značilnostih, razvoj genetskih markerjev v sredini šestdesetih let pa je močno olajšal identifikacijo hibridnih populacij (Allendorf in sod 2001). Čeprav so evolucijski procesi pri hibridizacijah enaki, so lahko rezultati hibridizacij različni. V procesu hibridizacije lahko tako nastanejo naravni hibridi (taksoni s spolnim ali nespolnim razmnoževanjem); lahko pride do introgresije genetskih lastnosti brez vzpostavitve hibridne cone ali pa nastanejo prehodne hibridne cone, ki so tudi najbolj pogost rezultat hibridizacije (Allendorf in sod. 2001).

Determinacija ali je hibridizacija naravnega izvora ali povzročena s strani človeka, je ključna za varovanje, vendar je mnogokrat težavna (Allendorf in sod 2001). V preteklosti se hibridi niso varovali, saj so se smatrali kot nečisti osebki (Allendorf in sod. 2001), danes pa vemo, da imamo različne kategorije hibridizacije, ki niso vse negativne (Genovart 2009). Še vedno se pojavljajo nejasnosti, ko gre za varovanje hibridnih osebkov ali populacij. Problem je predvsem v tem, da ni možno postaviti priporočil ukrepov, ki jih je potrebno izvesti v primeru detekcije hibridizacije. Vsak primer je drugačen, zato je treba vsak primer natančno preučiti in se odločiti o smiselnosti morebitnih varstvenih ukrepov (Genovart 2009).

Vrste iz rodu *Triturus* so skupina ozko sorodnih vrst s parapatrično razširjenostjo, zato obstaja velika verjetnost, da se bodo na območjih, kjer prihaja do stika, med seboj hibridizirale (Mikuliček in sod. 2012). Pri teh vrstah je hibridizacija naravnega (Maletzky in sod. 2008; Mikuliček in sod. 2012) ali antropogenega izvora (med avtohtono vrsto *T. cristatus* in vneseno vrsto *T. carnifex* v Švici) (Dufresnes in sod. 2016; Wielstra in sod. 2016). Do hibridizacije v srednji Evropi prihaja večinoma med pari dveh vrst (Mikuliček in sod. 2004; Maletzky in sod. 2008; Maletzky in sod. 2009), obstajajo pa primeri kjer prihaja do hibridizacije treh vrst na istem kontaktnem območju (Mikuliček in sod. 2012). Hibridizacija med vrstami je bila v srednji Evropi potrjena z različnimi markerji; od morfoloških (Wolterstorffov indeks, RBV), do mitohondrijskih molekularnih markerjev (gen za citokrom b) in jedrnih markerjev (mikrosateliti, naključno pomnoževanje polimorfne DNA - RAPD) (Mikuliček 2004; Maletzky 2008; Maletzky 2009; Mikuliček 2012).

V preliminarni raziskavi pupkov na Dolinskem polju ob reki Muri (SV Slovenija), kjer so za identifikacijo uporabili Wolterstorffov indeks, so identificirali dva osebka, ki kažeta hibridne znake med velikim in panonskim pupkom. Vendar bi bilo za zanesljivejše rezultate potrebno šteti vretenca, ki nosijo rebra, ali pa uporabiti molekularne markerje (Stanković in Delić 2012).

## 1.4 Genetski markerji

### 1.4.1 Gen za citokrom b

Citokrom b je del mitohondrijske DNA (mtDNA), ki je mnogokrat uporabljena pri študijah populacijske genetike. Mitohondrijsko DNA najdemo tako pri rastlinah kot pri živalih in se deduje po materi (Freeland in sod. 2011). Evolucijska stopnja mtDNA je od 5 do 10 -krat hitrejša od jedrnega genoma, predvsem zaradi tega, ker mitohondriji nimajo popravljalnih encimov za napake pri replikaciji in pri poškodbah DNA. Posledica je, da ima mtDNA visoko stopnjo tranzicij (mutacija purina v purin in pirimidina v pirimidin) in tranzverzij (mutacija purina v pirimidin in obratno) (Castro in sod. 1998). Visoke mutacijske stopnje povzročijo, da mtDNA kaže relativno visoko stopnjo polimorfizma, zaradi tega lahko mnogokrat detektiramo več genetskih linij znotraj in med populacijami (Freeland in sod. 2011).

Gen za citokrom b je dolg 1140 bp in kodira protein citokrom b, centralno redoks katalitično podenoto citokroma c, ki je odgovoren za transmembranski transport elektronov (Irwin in sod. 1991; Esposti in sod. 1993). Variabilnost gena za citokroma b je uporabna za primerjavo vrst znotraj vrst, rodu ali med družinami. Uporaba tega gena je privedla do številnih predlogov novega sistematskega razvrščanja, ki bolje odražajo filogenetske povezave med vrstami. Koristen je tudi pri klasifikaciji novo opisanih vrst v rodove (Castresana 2001).

#### Prednosti mtDNA

- Enostavna za delo (majhna velikost, konservativen razpored genov, kar omogoča uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov).
- Mutacijska stopnja je relativno visoka, kar se kaže v visoki stopnji polimorfizma, detektiramo lahko več genetskih linij znotraj in med populacijami.
- Pomankanje rekombinacije, kar pomeni, da bodo potomci v večini primerov imeli enak mitohondrijski genom kot mati. Tako lahko sledimo posameznim linijam skozi prostor in čas. Zaradi tega je mtDNA občutljiva na demografske dogodke, kot je npr. učinek ozkega grla in je mnogokrat uporabljena pri filogeografskih študijah (Lowe in sod. 2004; Freeland in sod. 2011).

#### Pomanjkljivosti mtDNA

- Organeli se obnašajo kot ena podedovana enota, in z njimi lahko sledimo zgodovini samo ene genetske linije.
- Mnogokrat niso reprezentativni za celotno populacijo (npr. ko se v populaciji selijo samo samci, samice pa ostanejo v populaciji).
- Prisotnost mitohondrijskih psevdogenov (kopije mtDNA se prepisejo/translocirajo v jedrni genom. Pri PCR-ju lahko tako pomnožimo tudi psevdogene, ki so ohranili mesta za prileganje začetnih oligonukleotidov).



- Aplikacija mtDNA je drugačna pri organizmih z nespolnim razmnoževanjem (Freeland in sod. 2011).

#### 1.4.2 Mikrosateliti

Mikrosateliti so kodominantni markerji s pomočjo katerih lahko identificiramo vse prisotne alele na lokusu. Pri diploidnih vrstah se tako za vsak kodominantni marker identificira en alel pri homozigotnem osebku in dva alela pri heterozigotnem osebku (Wan in sod. 2004; Frankham in sod. 2010; Freeland in sod. 2011). Mikrosateliti so ne kodirajoča zaporedja DNA, ki so sestavljena iz tandemskih ponovitev od 1 do 6 baznih parov, ki se ponovijo 5-100 krat (Wan in sod. 2004; Oliveira in sod. 2006; Selkoe in sod. 2006; Freeland in sod. 2011). Najdemo jih tako v prokariotskem kot v evkariotskem genomu (Oliveira in sod. 2006). Nahajajo se v jedrnem in kloroplastem genomu, pri nekaterih vrstah pa so bili najdeni tudi v mitohondrijskem genomu (Freeland in sod. 2011). Znani so tudi pod imenom ponovitve enostavnih zaporedij oz. SSR (angl. simple sequence repeats) in kratke tandemske ponovitve oz. STR (angl. short tandem repeats) (Freeland in sod. 2011; Guichoux in sod. 2011).

Glede na tip ponovljivega zaporedja jih delimo na:

**Popolne:** Zaporedje ni prekinjeno z nobeno bazo, ki ne pripada ponovljivemu motivu (npr. TATATATATATATATA)

**Nepopolne:** Zaporedje je prekinjeno s parom baz, ki ne pripadajo ponovljivemu motivu (npr. TATATATACTATATA)

**Prekinjene:** Znotraj zaporedja se nahaja manjše zaporedje, ki ne pripada ponovljenemu motivu (npr. TATATACGTGTATATATATA)

**Sestavljene:** Ponovljiv motiv je sestavljen iz dveh različnih zaporedij (npr. TATATATATAGTGTGTGTGTGT) (Oliveira in sod. 2006).

Mikrosateliti imajo visoko mutacijsko stopnjo ( $10^{-2}$  do  $10^{-6}$  nukleotidov na lokus na generacijo), razlog za to je nepravilno parjenje zdrsnenih verig med replikacijo DNA, kar vodi do insercij in delecij ene ali več ponavljajočih se enot ter nepravilnega prekrižanja dela kromosomov pri mejozi (Oliveria in sod. 2006; Brown 2007; Kalia in sod. 2010; Freeland in sod. 2011). Pri mikrosatelitih ni uniformne mutacijske stopnje, saj varira med lokusi, aleli in vrstami. Mikrosateliti z večjim številom ponovitev so bolj podvrženi mutacijam zaradi večje verjetnosti zdrsa verig (Bhargava in Fuentes 2009). Tako so mikrosateliti z daljšo ponovitvijo tudi bolj polimorfni (Hoshino in sod. 2012).

Mikrosateliti niso uporabni za študije evlucijskih dogodkov, ki so se zgodili v daljni preteklosti, zaradi njihove hitre mutacijske stopnje. So pa prav zaradi tega uporabni pri raziskavah nedavnih genetskih dogodkov, saj imajo zaradi hitre mutacijske stopnje mnogokrat več alelov na lokusu in so visoko polimorfni. Zaradi njihove variabilnosti jih lahko uporabljamo

za identifikacijo posameznikov in identifikacijo med populacijami kar s počasneje razvijajočimi regijami ni mogoče (Freeland in sod. 2011). V preteklosti so veljali za selektivno nevtralne markerje, ki niso pod vplivom selekcijskih pritiskov. Zdaj je znano, da razširitev števila ponovitev lahko povzroči nekatere človeške bolezni kot je na primer Huntingtonova bolezen (Oliveria in sod. 2006).

Mikrosateliti so uporabni predvsem za študije genomske nestabilnosti pri raku, bioinvazije in epidemiologije, za študije populacijske genetike, forenzike, varstvene biologije, molekularne antropologije, evolucijske zgodovine, za identifikacijo posameznikov ter za določanje starševstva (Chistiakov in sod. 2006; Bhargava in Fuentes 2009; Hoshino in sod. 2012).

### **Prednosti mikrosatelitov**

Za analizo rabimo majhno količino DNA, uporabni so tudi pri uporabi degradirane DNA, saj za analizo mikrosatelitnih lokusov potrebujemo kratke fragmente (Selkoe in Toonen 2006). Ko so mikrosateliti za določeno vrsto razviti, so preprosti za uporabo in cenovno ugodni. Imajo visoko ponovljivost ter visoko abudanco v živih organizmih (Bhargava in Fuentes 2009).

So pogosti in uniformno razporejeni čez celoten genom, vendar so bolj pogosti pri živalskih kot rastlinskih vrstah. Mutacijska stopnja pri mikrosatelitnih markerjih, je visoka zaradi česar so uporabni pri intrapopulacijski študijah (Lowe in sod. 2004; Selkoe in Toonen 2006).

### **Pomanjkljivosti mikrosatelitov**

Med slabosti mikrosatelitnih markerjev lahko prištevamo, da je začetna identifikacija mikrosatelitov draga in dolgotrajna (Wan in sod. 2004; Lowe in sod. 2004). Prav tako so za mikrosatelite značilni nerazjasnjeni mutacijski mehanizmi, napake pri določanju alelov, velikostna homoplazija (Aleli so identični v dolžini, vendar niso enaki po izvoru) in ničelni aleli (delecije lokusa ali mutacije na mestu prileganja začetnih oligonukleotidov lahko onemogočijo pomnoževanje in identifikacijo heterozigotov) (Hoshino in sod. 2012). To lahko vodi v napake pri določanju frekvence alelov (Hoshino in sod. 2012) in napake pri pomnoževanju (Wan in sod. 2004; Selkoe in Toonen 2006).

## **1.5 Parametri genetske diverzitete**

Genetska diverziteta je raznolikost alelov in genotipov, ki je prisotna pri vrsti, populaciji ali skupini vrst (Lowe in sod. 2004; Frankham in sod. 2009). Po navadi jo opisujemo s polimorfizmom, povprečno heterozigotnostjo ( $H$ ) in alelno frekvenco (Frankham in sod. 2009). Nastane z mutacijami znotraj osebkov v populaciji ali pa je v populacijo vnesena z migracijami (Lowe in sod. 2004). Genetska diverziteta je potrebna, da se lahko populacija prilagodi okoljskim spremembam. Pri večjih populacijah je po navadi prisotna visoka genetska diverziteta, medtem ko je pri manjših populacijah zmanjšana, takšne populacije imajo zmanjšano možnost prilagoditve okoljskim spremembam (Frankham in sod. 2009). Merimo jo na stopnji osebka, populacije ali vrste (Lowe in sod. 2004).

Parametre genetske diverzitete uporabljamo za analize izgube genetske variacije, za evolucijske spremembe in genetske diferenciacije v populaciji (Lowe in sod. 2004). Mikrosateliti so med najbolj praktičnimi in informativnimi markerji za analize DNA variacije v populacijah (Frankham in sod. 2009). Vzdrževanje genetske diverzitete je primarni cilj v upravljanju populacij (Frankham in sod. 2009).

### 1.5.1 Heterozigotnost

Heterozigotnost je mera genetske diverzitete, ki predstavlja frekvenco vseh heterozigotov v populaciji (Frankham in sod. 2009; Page in Holmes 2009). Je najpogosteje uporabljena mera za določanje genetske diverzitete na posameznem lokusu (Frankham in sod. 2009). Na ravni populacij je po navadi opisana kot pričakovana ali kot opažena heterozigotnost (Mills 2013).

**Pričakovano heterozigotnost ( $H_e$ )** pričakujemo za populacijo glede na alelno frekvenco, ki je predpostavljena na podlagi Hardy-Weinbergovega ravnotežja (H-W ravnotežje) (Frankham in sod. 2009; Mills 2013). Po navadi se uporablja pri opisovanju genetske diverzitete, saj je manj občutljiva na velikost vzorca kot opažena heterozigotnost (Frankham in sod. 2009).

**Opažena heterozigotnost ( $H_o$ )** je dejanski delež opaženih heterozigotnih osebkov na lokusu (Mills 2013). Ta mera je pogosto uporabljena pri kodominantnih podatkih za diploidne organizme. Ne uporablja se za dominantne podatke, saj se število heterozigotov v populaciji ne da enostavno določiti (Lowe in sod. 2004).

Z izrazom heterozigot označujemo tiste osebkke, ki imajo na posameznem lokusu dva različna alela. V nasprotju pa je homozigot tisti osebek, ki ima na določenem lokusu kopiji dveh enakih alelov (Frankham in sod. 2009).

Heterozigotnost lahko izračunamo direktno s štetjem heterozigotnih osebkov ali jo izračunamo iz alelnih frekvenc z uporabo H-W ravnotežja (Griffiths in sod. 2008). Z izračunom heterozigotnosti lahko v populaciji zaznamo različne procese, kot so genetski zdrs, selekcija in genski pretok (Mills 2013).

### 1.5.2 Hardy-Weinbergovo ravnotežje

Model Hardy-Weinbergovega ravnotežja sta leta 1908 neodvisno razvila Godfrey H. Hardy in Wilhelm Weinberg (Lowe in sod. 2004). Model temelji na načelu, da se alelne in genotipske frekvence v času ne spreminjajo. To velja pod predpostavko, da populacije niso pod vplivom evolucijskih procesov kot so naravna selekcija, genetski zdrs, mutacije in genski pretok (Frankham in sod. 2009; Mills 2013). Vendar to v naravnih populacijah ne drži, zato prihaja v naravi do odstopanja od H-W ravnotežja. Odstopanje je posledica petih faktorjev vpliva: mutacij, naravne selekcije, razporejenega parjenja (angl. assortative mating), genskega pretoka in majhne populacijske velikosti (Lowe in sod. 2004; Frankham in sod. 2009). Nenaključno parjenje povzroča odstopanje od H-W ravnotežja, to je lahko posledica razporejenega parjenja ali parjenja v sorodstvu (Höglund 2009). Do razporejenega parjenja prihaja, ko spolno

razmnoževanje ni naključno, temveč prihaja do pogostejše izbire določenega genotipa nasprotnega spola (Griffiths in sod. 2008; Höglund 2009).

Hardy-Weinbergovo ravnotežje je pomemben parameter genetske diverzitete s katerim lahko določimo odstopanje od naključnega parjenja, testiramo selekcijo, modeliramo posledice parjenja v sorodstvu in selekcije in ocenjujemo alelno frekvenco na dominantnih lokusih (Frankham in sod. 2009). Odstopanje od H-W ravnotežja lahko izračunamo s koeficientom inbreedinga ( $F_{IS}$ ) (Lowe in sod. 2004).

### 1.5.3 Vežano neravnovesje (Linkage disequilibrium, LD)

Vežano neravnovesje (angl. Linkage disequilibrium) opisuje nenaključno kombinacijo alelov na različnih lokusih. Meri se kot odstopanje haplotipnih frekvenc od vežanega ravnovesja (angl. linkage equilibrium). Do vežanega neravnovesja pride, če so lokusi vezani na isti kromosom (Frankham in sod. 2009) ali pa zaradi učinka ozkega grla v majhnih populacijah, nedavnega mešanja različnih populacij ali zaradi selekcije (Lowe in sod. 2004, Frankham in sod. 2009). Lokusi, ki kažejo takšno neravnovesje v velikih populacijah z naključnim parjenjem, so pogosto pod vplivom naravne selekcije. Vežano neravnovesje je pogosto pri ogroženih vrstah, kjer je velikost populacij majhna. Ko se v populaciji pojavi vežano neravnovesje, se pojavijo tudi spremenjeni evolucijski odnosi (Frankham in sod. 2009).

### 1.5.4 Nei-jeva genetska razdalja

Je mera genetske diferenciacije med alelnimi frekvencami dveh populacij ali vrst (Lowe in sod. 2004; Frankham in sod. 2009). Je najpogosteje uporabljena mera genetske diferenciacije med vrstami ali populacijami. Če sta dve populaciji popolnoma enaki, je genetska razdalja med njima 0, kadar pa je vrednost 1, sta si populaciji popolnoma različni (Frankham in sod. 2009).

### 1.5.5 Koeficient inbreedinga ( $F_{IS}$ )

Do parjenje v ožjem sorodstvu (angl. inbreeding) prihaja, ko se med seboj pari osebki, ki si delijo enega ali več skupnih prednikov. Proces je posebej pogost v majhnih populacijah, kjer so po nekaj generacijah parjenja v sorodstvu vsi osebki v sorodu (Frankham in sod. 2009). Zaradi parjenja v sorodstvu prihaja do večjega deleža homozigotov na lokusih, kar močno zmanjša genetsko diverzitetu osebkov v populaciji (Freeland in sod. 2011). Parjenje v sorodstvu ima na populacijo in njihove osebkove številne negativne posledice. V populaciji lahko privede do zmanjšane razmnoževalnega potenciala in preživetja populacije (zmanjšan fitness populacije). Do inbreedinga lahko pride tudi pri naključnem parjenju v majhnih populacijah, kjer se v tem primeru zgodi genetski zdrs (angl. genetic drift), kar vodi v izgubo heterozigotnosti. Posledica tega je, da se osebki, kljub naključnemu parjenju, pari z osebki s katerimi si delijo skupne prednike (Mills 2013).

Parjenje v sorodstvu lahko zaznamo z izračunom koeficienta inbreedinga ( $F_{IS}$ ). To je mera genetske diverzitete, ki opiše izgubo heterozigotnosti, ki nastane zaradi nenaključnega parjenja

ali genetskega zdrsa v populaciji (Mills 2013). Pove nam razliko med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo v vsaki sub-populaciji zaradi nenaključnega parjenja osebkov (Frankham in sod. 2009; Hamilton 2009; Mills 2013).

Koeficient inbreedinga izračunamo iz razlike opažene in pričakovane heterozigotnosti v populaciji.

$F_{IS}=(H_e-H_o)/H_e$  (Lowe in sod. 2004).

### 1.5.6 Število alelov (NA)

Je mera, ki nam pove število alelov na posameznem lokusu. Število alelov na lokusu je funkcija, ki se postopoma povečuje in nikoli ne doseže asimptote. Zato pri večjemu številu vzorcev najdemo več redkih alelov (Lowe in sod. 2004). Če je na lokusu v populaciji prisoten več kot en alel, je lokus polimorfen (Mills 2013). Mera je odvisna od velikosti vzorca, zato jo pogosto nadomestimo z izbiro bogastva alelov (AR) (Höglund 2009), ki korigira število alelov in velikost vzorca.

### 1.5.7 Bogastvo alelov (AR)

Bogastvo alelov je mera, ki nam pove povprečno število alelov na posameznem lokusu (Höglund 2009; Mills 2013). Od števila alelov (NA) se razlikuje po tem, da je mera prilagojena na velikost vzorca in zato primerna tudi za manjše vzorce ali za primerjavo med vzorci z različno velikostjo (Lowe in sod. 2004). Bogastvo alelov računamo glede na populacijo ali vrsto. Je ena izmed najpogostejših mer za izračun genetske variabilnosti (Leberg 2002). Je pomembna mera pri identifikaciji učinka ozkega grla (angl. bottleneck) v populacijah, saj se bogastvo alelov v tem primeru hitreje izgubi kot heterozigotnost. Heterozigotnost namreč še ni takoj pod vplivom velikih sprememb v frekvenci izgubljenih redkih alelov, ki se zgodijo v procesu ozkega grla. (Frankham in sod. 2010; Mills 2013).

Pri lokusih z večjo polimorfnošjo prihaja do večjih odstopanj, kot pri manj polimorfnih lokusih (Lowe in sod. 2004). To moramo upoštevati, ko analiziramo populacije različnih velikosti (Lowe in sod. 2004). Pri analizi več populacij z različnim številom vzorcev, je najpogostejša metoda zmanjšanja napake t.i. rarefaction metoda, pri kateri primerjamo populacije glede na velikost najmanjšega vzorca. Vendar je slabost te metode, da izgubimo nekaj pomembnih podatkov zaradi zmanjšanja velikosti vzorca (Leberg 2002).

## 1.6 Namen in cilji dela

Namen magistrskega dela je bil raziskati genetsko diferenciacijo med velikim in panonskim pupkom, katerih areali se v Sloveniji stikajo na območju reke Mure in zaznati morebitno hibridizacijo. Z uporabo molekularnih analiz smo določili vrsto 64 osebkov, ki so bili vzorčeni

v letu 2013 in 2014 vzdolž reke Mure. Za določitev vrste smo analizirali odsek gena za citokrom b, ki je del mitohondrijskega genoma. Z genotipizacijo sedmih mikrosatelitnih lokusov smo določili stopnjo hibridizacije med velikim in panonskim pupkom in raziskali genetsko strukturiranost vrst in populacij. Genetsko diverziteto populacij smo izračunali z odstopanjem od Hardy-Weinbergovega ravnotežja, s pričakovano in opaženo heterozigotnostjo, koeficientom inbreedinga (Fis), številom alelov (NA) in bogastvom alelov (AR).

Cilji dela:

1. Izolacija DNA in pomnoževanje mikrosatelitnih markerjev in gena za citokrom b iz pridobljenih tkivnih vzorcev
2. Določanje delnega nukleotidnega zaporedja gena za citokrom b
3. Analiza mikrosatelitnih lokusov
4. Analiza genske diverzitete, strukture in stopnje hibridizacije med velikim in panonskim pupkom na območju Mure

Hipoteze:

1. Na območju Mure sta prisotni dve vrsti iz rodu *Triturus* in sicer, veliki pupek (*Triturus carnifex*) in panonski pupek (*Triturus dobrogicus*)
2. Na območju prihaja do hibridizacije med obema vrstama
3. Panonski pupek je manj pogost na desnem bregu reke Mure

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Vzorčenje

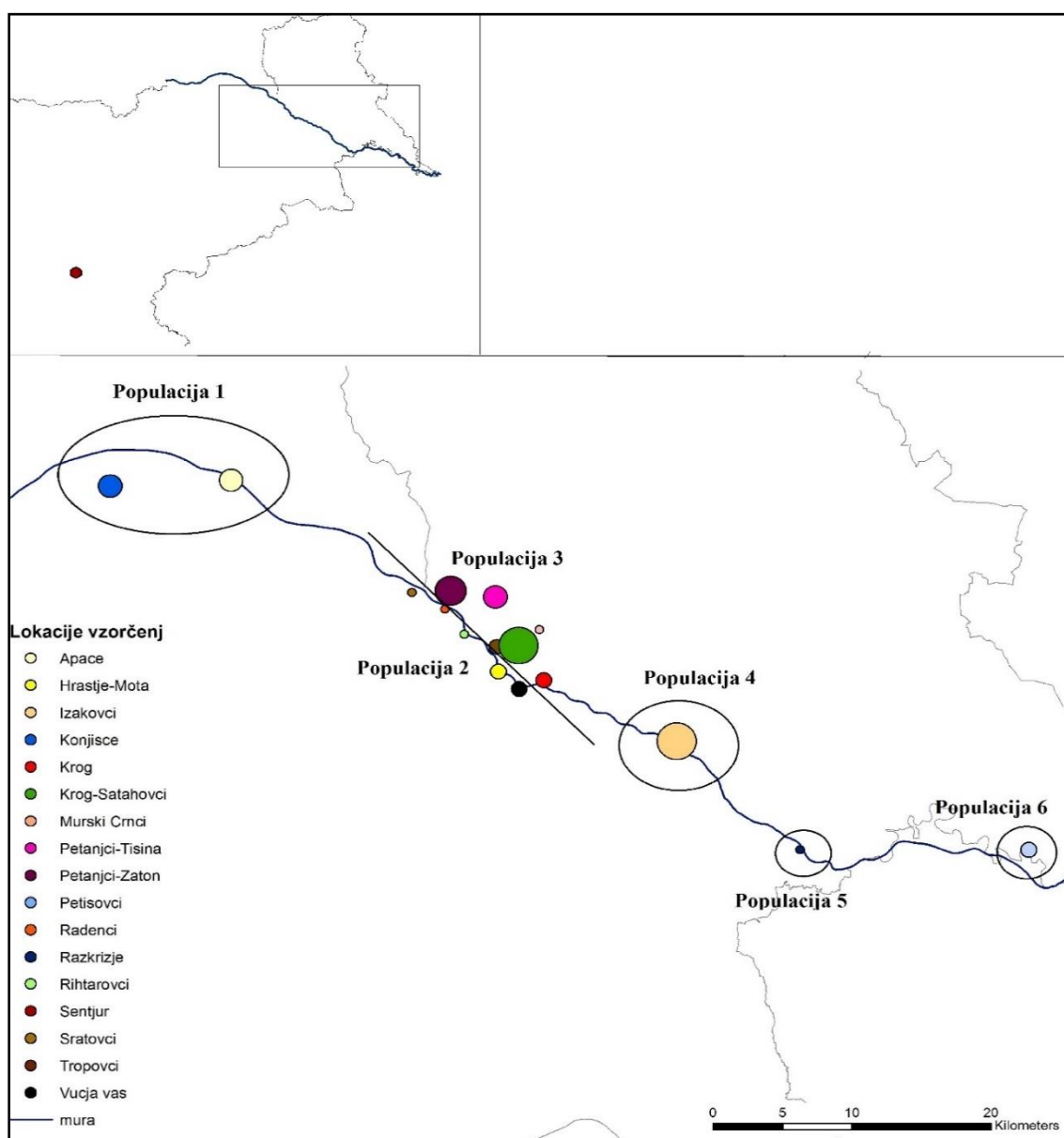
Vzorci pupkov so bili pridobljeni s strani Centra za kartografijo favne in flore. Vzorci so bili odvzeti v letu 2013 in 2014 s standardno metodologijo lova z Ortmannovimi pastmi (Heyer in sod. 1994). Osebkom je bil odvzet majhen košček tkiva (konica repa) in shranjen v etanolu. Lokacije vzorčenj s koordinatami in številom osebkov so prikazane v Preglednici 2 in Sliki 4. Lokacije vzorčenj smo združili v 7 večjih populacij, saj je večina lokalitet tesno skupaj (Preglednica 3).

**Preglednica 2:** Lokacije vzorčenj z geografskimi lokacijami in številom vzorcev in pripadajočo populacijo.

Lokaliteta	Populacija	KRAJ	Koordinate		Število vzorcev
			X	Y	
1	3	Murski Črnci	46.63875	16.11301	1
2	3	Petanjci-Tišina	46.65303	16.08533	5
3	3	Tropovci	46.62854	16.08474	2
4	7	Šentjur	46.22195	15.32901	3
5	3	Krog	46.61287	16.11651	3
6	1	Apače	46.70778	15.91126	5
7	3	Petanjci-Zaton	46.65406	16.05069	8
8	2	Hrastje-Mota	46.61750	16.08597	2
9	2	Rihtarovci	46.63501	16.06469	1
10	4	Ižakovci	46.58349	16.20494	12
11	1	Konjišče	46.70418	15.83034	4
12	3	Krog-Satahovci	46.62823	16.09987	11
13	6	Petišovci	46.53390	16.42666	2
14	2	Radenci	46.64613	16.05252	1
15	5	Razkrižje	46.53237	16.28269	1
16	2	Šratovci	46.65285	16.03127	1
17	2	Vučja vas	46.60874	16.10503	2

**Preglednica 3:** Podatki o populacijah.

Populacija	Ime populacije	št. vzorcev
1	Apače-Konjišče	9
2	Tropovci-Vučja vas	7
3	Petanjci-Krog	30
4	Ižakovci	12
5	Razkrižje	1
6	Petišovci	2
7	Šentjur	3



**Slika 4:** Lokacije vzorčenj ob reki Muri. Lokacije so združene v sedem večjih populacij.



## 2.2 Izolacija DNA

Izolacija je potekala po protokolu proizvajalca Invitrogen s kitom za izolacijo: PureLink Genomic DNA Kits (Thermofisher 2016). Izolirali smo vzorce iz svežega tkiva (koščki repkov shranjeni v etanolu). Izolacija je potekala tako, da smo s skalpelom odrezali košček tkiva, ki smo ga na papirnati brisački narezali na manjše koščke ter zmacerirali s skalpelom. Tako pripravljeno tkivo smo prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko. Za vsak vzorec smo očistili pribor in zamenjali brisačke, da ne bi prišlo do kontaminacije med vzorci. Sledila je Liza tkiva kjer smo vzorcem dodali 180  $\mu$ L PureLink Genomic Digestion pufra in 20  $\mu$ L Proteinaze K. Vzorce smo dobro zvorteksirali na vibracijskem mešalniku ter inkubirali čez noč. Po inkubaciji smo vzorce scentrifugirali na maksimalni hitrosti za 3 minute, da smo odstranili večje delce materiala. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in vsakemu vzorcu dodali 20  $\mu$ L RNA A raztopine, zvorteksirali ter inkubirali za 2 minuti na sobni temperaturi. Vzorcem smo nato dodali 200  $\mu$ L Pure Link Genomic lysis/Binding pufra in dobro zvorteksirali. Lizatu smo dodali 200  $\mu$ L 96% alkohola in vorteksirali 5 sekund. Lizat smo nato prepipetirali na kolone za izolacijo, ki so bile položene na zbiralno mikrocentrifugirko. Vzorce smo centrifugirali 1 minuto na 10000 obratih. Zavrgli smo zbiralno mikrocentrifugirko in položili kolono v novo zbiralno mikrocentrifugirko. Nato je sledilo čiščenje DNA, v kolono smo dodali 500  $\mu$ L Wash pufra in centrifugirali na sobni temperaturi 1 minuto na 10000 obratov. Kolono smo nato predstavili v novo zbiralno mikrocentrifugirko in dodali 500  $\mu$ L Wash 2 pufra ter centrifugirali na sobni temperaturi za 3 minute na maksimalni hitrosti. Sledila je elucija DNA pri kateri smo kolono položili v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko ter dodali 70  $\mu$ L Pure Genomic Elution pufra. Vzorce smo inkubirali na sobni temperaturi za 10 minut in jih nato scentrifugirali na sobni temperaturi 1 minuto na maksimalni hitrosti. Odstranili smo kolono ter shranili mikrocentrifugirko, ki je vsebovala čisto DNA. Vzorce smo shranili na  $-20^{\circ}\text{C}$  za nadaljnje analize.

## 2.3 Merjenje koncentracij DNA in nečistoč

Metoda merjenja koncentracije nukleinskih kislin s spektrofotometrom temelji na dejstvu, da nukleinske kisline absorbirajo ultravijolično svetlobo z največjo absorbanco pri valovni dolžini 260 nm. Količina absorbirane svetlobe pa je sorazmerna s količino nukleinskih kislin v vzorcu (Brown 2010). Čistost vzorcev se določa z razmerjem absorbanc pri valovni dolžini A260 nm in A280 nm. Pri valovni dolžini A260 nm imajo absorpcijski maksimum nukleinske kisline, pri A280 nm pa proteini. Vzorec je čist, če je razmerje A260/A280 med vrednostmi 1,8 in 2. Nižje razmerje od 1,8 nakazuje preveliko prisotnost proteinov ali fenolov v vzorcu (Brown 2010). Koncentracijo in čistost vzorcev smo merili s spektrofotometrom EPOCH. Za umeritev spektrofotometra smo na ploščo najprej nanесли dva slepa vzorca z 3  $\mu$ L deionizirane vode. Nato smo na ploščo nanесли 3  $\mu$ L vsakega vzorca. Pri nanašanju smo pazili, da so nanešene kapljice brez mehurčkov. Najprej smo izmerili slepe vzorce in če so bili ti ustrezni, smo izmerili

še koncentracije ostalim vzorcem. Meritve so potekale v programu GEN5, ki izmeri čistost in koncentracijo vzorcev. Vsi vzorci so bili v optimalni koncentraciji, pod 100  $\mu\text{L}$  zato vzorcev ni bilo potrebno redčiti. Rezultati koncentracij in absorbance so prikazani v Prilogi A.

## 2.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda pomnožitve majhne koncentracije DNA s selektivnim pomnoževanjem dela DNA na katerega se vežejo začetni oligonukleotidi (Griffiths in sod. 2008; Mills 2013). Za PCR reakcijo potrebujemo izolirano DNA, *Taq* polimerazo, ki v procesu podaljševanje DNA verige dodaja deoksiribonukleotid trifosfate na 3' konec nastajajoče verige, par začetnih oligonukleotidov (so kratke sekvence, dolge 20-30 nukleotidov) in deoksiribonukleotide (dNTP) (Brown 2007).

PCR reakcija je sestavljena iz treh korakov (Avisé 2004; Mills 2013):

1. Denaturacija dvojne vijačnice (angl. denaturation) pri visoki temperaturi (okrog 94°C), kjer se dvojna vijačnica denaturira v dve enojni verigi.
2. Prileganje začetnih oligonukleotidov (angl. annealing) na obeh straneh verige poteka pri temperaturi od 55 do 65°C.
3. Podaljšanje verige (angl. extension) poteka pri nekoliko višji temperaturi, okrog 72°C ki je optimalna temperatura za delovaje *Taq* polimeraze. *Taq* polimeraza podaljšuje nastajajočo DNA verigo z dodajanjem deoksiribonukleotidov.

V eni PCR reakciji dobimo dve dvoverižni DNA molekuli. PCR reakcija se ponovi približno 30 krat, število molekul pa s cikli eksponentno narašča. Tako po 30 ciklih dobimo več ko 250 milijonov kopij DNA (Brown 2007).

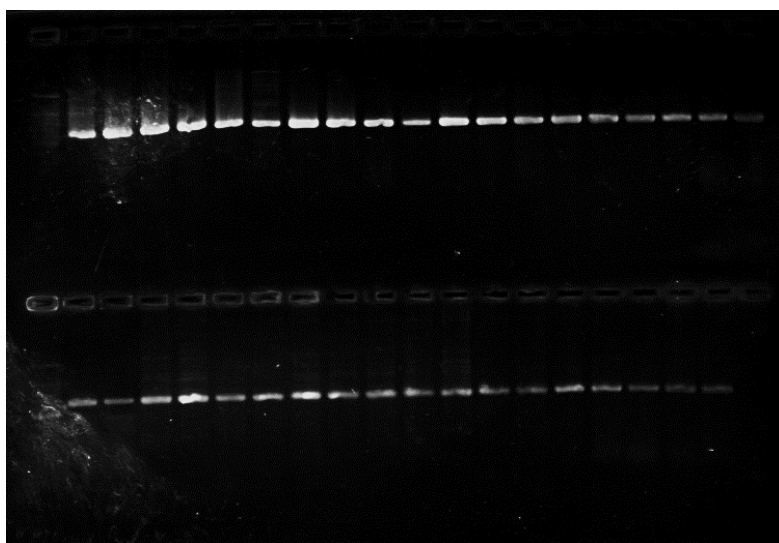
## 2.5 Določanje nukleotidnega zaporedja: Citokrom b

### 2.5.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Pomnoževanje zaporedja dela gena za citokrom b smo izvedli na 64 izoliranih vzorcih. Uporabili smo okoli 580 bp dolgi odsek gena za citokrom b. Za pomnoževanje smo uporabili začetna nukleotida Tr\_cyb2F (5' ACAGCAGACACACAATCGGCAT 3') in Tr\_cyb2R (5' GGTA ACTAAGGAGTTTGCTGGG 3') (Maletzky in sod. 2008). Reakcijska mešanica s končnim volumnom 15  $\mu\text{L}$  je vsebovala 3  $\mu\text{L}$  DNA, 5  $\mu\text{L}$  Kappa multiplex (Biosystem), 4,1  $\mu\text{L}$  deionizirane vode, 0,3  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  in 0,3  $\mu\text{L}$  vsakega začetnega oligonukleotida. PCR reakcija je potekala po naslednjem temperaturnem profilu: Po začetni 5 minutni denaturaciji na 94°C je sledilo 30 ciklov s 45 sekund denaturacije na 94°C, 45 sekund prileganja začetnih oligonukleotidov na 60°C in 45 sekund podaljševanje verige na 72°C. Po 30 ciklih je sledilo še podaljševanje verige za 3 minute na 72°C. Uspešnost PCR reakcije smo preverili z gelsko elektroforezo.

### 2.5.2 Gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza je tehnika, ki uporablja razliko v električnem toku za ločevanje molekul v vzorcu. Ker so DNA molekule negativno nabite migrirajo v električnem polju proti pozitivnemu polu. Za gelsko elektroforezo se uporablja gel, ki je po navadi narejen iz agaroze ali poliakrilamida. Gel je sestavljen iz velikega števila por skozi katere potujejo DNA molekule proti pozitivnemu polu. Manjše DNA molekule potujejo hitreje po gelu kot večje molekule, zaradi tega lahko ločimo DNA molekule glede na velikost. Za vizualizacijo DNA molekul na agaroznem gelu se uporabljajo barvila kot so etidijev bromid (EtBr) in SYBR green ki so vidna pod UV svetlobo (Brown 2010). Pripravili smo 1,5% gel, iz 1,9 g agaroze in 125 ml 0,5 x TBE (Tris boratni pufer z EDTA). Agarozo in TBE smo zmešali v erlenmajerici ter segreti 1 do 2 minuti v mikrovalovni pečici do vrenja. Zmes smo ohladili pod tekočo mrzlo vodo, da se je gel ohladil na približno 60°C. Gel smo nato vlili v kalup, v katerega smo položili glavničke, ki ob strjevanju v gelu ustvarijo majhne žepke kamor prepipetiramo vzorce. Odstranili smo morebitne mehurčke in gel pustili ohlajati. Nato smo pripravili parafilm na katerem smo za vsak vzorec zmešali nanašalno barvilo (angl. loading dye, Fermentas) in 3 µL PCR produkta. Posebej pa smo nanесли tudi t.i. molekularni standard (angl. gene ladder). Nanašalno barvilo dodamo vzorcem zato, da imajo vzorci večjo gostoto in ostanejo v luknjici gela, molekularni standard pa, da lahko na gelu ločimo dolžine fragmentov vzorcev. Vzorce smo prenesli v sobo za gel, kjer, smo gel položili v elektroforezo z 0,5 x TBE pufrom. V prvo luknjico smo nanесли molekularni standard, v ostale luknjice pa vzorce. Elektroforezo smo nastavili na 90 V ter pustili teči gel 60 minut. Po 60 minutah smo preložili gel iz elektroforeze v posodo z etidijevim bromidom in TBE. Etidijev bromid se zrine med bazne pare in fluorescira pod UV lučjo (Brown 2007). Po 5 minutah smo gel sprali v banjici vode. Po spiranju smo gel položili pod UV luč in ga slikali s pomočjo kamere Unitec miniBIS v računalniškem programu Gel capture. Primer gela slikanega pod UV lučjo je prikazan na Sliki 5.



**Slika 5:** Slika gela pod UV lučjo, prikazanih je 37 uspešno pomnoženih fragmentov gena za citokrom b.

### 2.5.3 Direktno čiščenje PCR produktov

Za čiščenje vzorcev smo uporabili alkalno fosfatazo (Fermentas) in eksonukleazo I (Fermentas). Alkalna fosfataza odstranjuje 5' fosfate skupine iz DNA molekule, eksonukleaza I pa cepi verige DNA na njihovih koncih (Brown 2010). Reakcijska zmes s končnim volumnom 2  $\mu\text{L}$  je vsebovala 0,1  $\mu\text{L}$  Exonukleaze I, 0,5  $\mu\text{L}$  alkalne fosfataze in 1,4  $\mu\text{L}$  1xPCR pufra. V stripe smo razdeli po 2  $\mu\text{L}$  reakcijske zmesi ter dodali 5  $\mu\text{L}$  PCR produkta. Stripe smo na kratko centrifugirali ter položili v ciklični termostat za 45 minut pri 37°C, da smo razgradili začetne oligonukleotide in odvečne nukleotide v mešanici ter nato za 15 minut pri 80°C, da smo deaktivirali uporabljena encima.

### 2.5.4 Sekvenčna reakcija

Direktnemu čiščenju PCR produktov je sledila sekvenčna reakcija. Zmešali smo dve reakcijski zmesi s končnim volumnom 7  $\mu\text{L}$ , sestavljeni iz 4,3  $\mu\text{L}$  vode, 2  $\mu\text{L}$  Big Dye buffer (Fermentas), 0,5  $\mu\text{L}$  Big dye (BigDye Terminator v3.1 Cycle, Fermentas), ter 0,2  $\mu\text{L}$  začetnega oligonukleotida (Tr\_Cyt2F). Druga mešanica je bila enaka s tem, da smo primešali drug začetni oligonukleotid (Tr\_Cyt2R). Reakcijsko zmes smo razdelili na ploščo po 7  $\mu\text{L}$  ter dodali 3  $\mu\text{L}$  očiščenega PCR produkta. Ploščo smo prekrili s folijo zaradi občutljivosti barvila Big dye na svetlobo. Nato smo jo prenesli na ciklični termostat, kjer smo nastavili protokol na 96°C za tri minute (1 cikel), nato 96°C za 10 sekund, 49°C za 10 sekund, 60°C za 4 minute (50 ciklov), ter 7 minut na 72°C (1 cikel).

### 2.5.5 Čiščenje s precipitacijo z etanol/EDTA

Ploščo z vzorci smo najprej na kratko centrifugirali tako, da so se vse kapljice usedle na dno plošče. V vzorce smo nato dodali 2,5  $\mu\text{L}$  125 mM EDTA (pH 8.0) ter jih na kratko centrifugirali, da je EDTA prišel v stik s sekvenčno reakcijo. Zatem smo vsakemu vzorcu dodali 30  $\mu\text{L}$  absolutnega etanola ter jih pokrili s folijo in 5-10 na hitro obrnili, da so se reagenti med seboj dobro premešali. Vzorce smo pustili pokrite in jih inkubirali 15 minut na sobni temperaturi. Po 15 minutah smo vzorce centrifugirali pri maksimalni hitrosti (14000 obratov/minuto) za 55 minut pri 4°C. Po končanem centrifugiranju smo izlili etanol s hitrim gibom navzdol tako, da je v plošči ostal samo pelet brez etanola. Ploščo smo osušili tako, da smo jo obrnjeno navzdol centrifugirali na papirnati brisački pri 190x g 2 minuti. Nato smo jo inkubirali na sobni temperaturi za 5 minut ter pazili, da je zaščitena pred svetlobo. Na koncu smo vzorcem dodali 12  $\mu\text{L}$  formamida, da se je v DNA v peletu raztopila. Vzorce smo nato sekvencirali na sekvenatorju (genetski analizator ABI Prism 3130) in jim določili nukleotidno zaporedje.

### 2.5.6 Obdelava podatkov nukleotidnega zaporedja

Rezultate, ki smo jih pridobili s sekvenciranjem smo uporabili za analize nukleotidnega zaporedja. Pridobljena zaporedja 63 vzorcev (vzorec TCAR006 se ni uspešno pomnožil) smo obdelali s programom CodonCode Aligner 6.0.2 (Ewing in sod. 1998). Pregledali smo kvaliteto

sekvenc ter jim odrezali začetke in konce, ki so bili slabo berljivi. Nato smo jih poravnali, očistili in popravili nepravilnosti v branju zaporedja. Pri čiščenju sekvenc smo si pomagali s tem, da smo primerjali več vzorcev med seboj. Očiščene sekvence smo shranili kot .fasta format, ki smo ga uporabili za nadalje analize v programu MEGA 7.0.

Z uporabo orodja BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) smo primerjali naše sekvence s sekvencami v bazi GenBank (Altschul in sod. 1990). BLAST je orodje, ki primerja proteinska in nukleotidna zaporedja v bazi in izračuna statistično podobnost med zaporedji (Frankham in sod. 2009). Z njegovo uporabo smo vzorcem določili pripadnost vrsti in preverili morebitno kontaminacijo.

Vsa zaporedja smo uvozili v program MEGA 7.0 (Kumar in sod. 2015). Sekvence smo poravnali s pomočjo algoritma Clustal W (Thompson in sod. 1997). Sledil je izračun najboljšega modela za izračun filogenetskega drevesa. Model smo določili po BIC (Bayesian information criterion) in AIC (Akaike information criterion). Filogenetsko drevo smo izrisali po metodi največjega verjetja (angl. maximum likelihood) in za izris uporabili 1000 ponovitev. Za outgroup smo uporabili vrsto *Tritutus pygmaeus* številka vzorca (angl. accession number): DQ821261.1), ki smo jo pridobili iz banke nukleotidnih zaporedij (NCBI GenBank).

V programu DNAsp (Librado in Rozas 2009) smo osebke uvrstili v haplotipe in izvozili datoteko s formatom .rdf, ki smo jo uporabili v programu Network 5 (Bandel in sod. 1999) za izris mreže haplotipov s pomočjo združevanja sredin (angl. median joining).

## **2.6 Določanje mikrosatelitnih lokusov**

### **2.6.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)**

Za analizo mikrosatelitnih lokusov smo uporabili 8 lokusov, ki so bili razviti za *T. cristatus* (Krupa in sod. 2002) in že uspešno uporabljeni na velikem in panonskem pupku (Mikuliček in sod. 2007; Maletzky in sod. 2008; Maletzky in sod. 2010; Mikuliček in sod. 2012). Lokuse smo pomnožili na istih 64 vzorcih kot za gen za citokrom b. Značilnosti lokusov so opisane v Preglednici 4.

**Preglednica 4:** Lastnosti 8 mikrosatelitnih lokusov, ki so bili uporabljeni na 64 vzorcih. Za vsak lokus je prikazan njegov ponovitveni motiv, začetno oligonukleotidno zaporedje, barva, količina uporabljenega primerja v reakciji in temperatura prileganja. Lokusi s prekinjenim vzorcem so označeni z oznako Inter., lokusi s padajočo temperaturo prileganja pa so označeni s kratico TD.

Ime lokusa	Primer (5'-3')	Temperatura prileganja	Količina primerja ( $\mu\text{L}$ )	Ponovljen motiv	Barvilo
<b>Tcri13</b>	F: GTGATGGTTGCCAAGC	53°C	0.1	(GT) <sub>36</sub> Inter.	NED
	R: GATCCAAGACACAGAATATTTAG				
<b>Tcri27</b>	F: GATCCACTATAGTGAAAATAAATAAT AAG	53°C	0.1	(GAAA) <sub>27</sub>	FAM
	R: CAAGTTAGTATATGATATGCCTTTG				
<b>Tcri29</b>	F: CGAGTTGCCAGACAAG	TD/55°C	0.2	(TTTC) <sub>22</sub> (CA) <sub>11</sub>	HEX
	R: GATCACATGCCATGGA				
<b>Tcri32</b>	F: GAAACTCGTAATCCAGCCCTAA	TD/53°C	0.2	(TTTC) <sub>28</sub> Inter.	NED
	R: CAAGCCTCTGCCTTTGAGT				
<b>Tcri35</b>	F: CCAACTGGTATGGCATTG	TD/56°C	0.05	(GAAA) <sub>32</sub> Inter.	NED
	R: GATCACAGAACTCTGAATATAAGC				
<b>Tcri36</b>	F: GATCATCTGAATCCCTCTG	TD/55°C	0.2	(GAAA) <sub>36</sub> Inter.	HEX
	R: ATACATTCATGACGTTTGG				
<b>Tcri43</b>	F: GAAGTAACTGAAAGATAACATGTAG	53°C	0.2	(GAAA) <sub>30</sub>	HEX
	R: <u>GTTTC</u> -TATTCATTTTTGTTACGCAC				
<b>Tcri46</b>	F: CAAGTTTCCTCTGAAGCCAG R: <u>GTTTC</u> - TTGCCTGACAAAGTAATGCTTC	55°C	0.1	(TTTC) <sub>23</sub>	FAM

Reakcijska mešanica s končnim volumnom 10  $\mu\text{L}$  je vsebovala 1  $\mu\text{L}$  DNA, 5  $\mu\text{L}$  Kappa multiplex (Biosystem), par začetnih oligonukleotidov (volumni za posamezen lokus so zapisani v preglednici 4), in ddH<sub>2</sub>O. PCR reakcija je potekala po dveh različnih temperaturnih protokolih, 4 lokusi so potekali po navadnem, preostali štirje pa po profilu s padajočo temperaturo prileganja (angl. touchdown).

Pri lokusih z navadnim protokolom je potekala reakcija takole:

Po 15 minutni denaturaciji na 95°C je sledilo 35 ciklov z 30 sekund denaturacije na 94°C, 90 sekund prileganja začetnih oligonukleotidov (temperatura odvisna od lokusa, preglednici 4) in 60 sekund podaljševanja verige na 72°C. Po 35 ciklih je sledil še en cikel podaljševanja verige za 30 minut na 60°C.

Pri lokusih s padajočo temperaturo prileganja je potekala reakcija takole:

Začetna denaturacija na 94°C, 2 minute

2 cikla na vsaki temperaturi:

94°C, 30 sekund

64-56°C, vsaka dva cikla se je temperature spustila za 2°C

72°C, 30 sekund

29 ciklov:

94°C, 30 sekund

55°C, 30 sekund (lokus 35 je imel temperature prileganja 56°C, lokus 32 pa 53°C)

72°C, 30 sekund

Sledilo je še končno podaljševanje na 60°C, 30 minut.

## 2.6.2 Fragmentna analiza

Verižni reakciji s polimerazo je sledila fragmentna analiza. Za fragmentno analizo smo zmešali reakcijsko zmes s končnim volumnom 12,3 µL, ki je bila sestavljena iz 0,3 µL LIZ-a 500 (dolžinski standard) in 12 µL formamida, ki je močan denaturant DNA vijačnice. Reakcijsko zmes smo zmešali na vorteksu. Nato smo na ploščo nanegli 12,3 µL reakcijske zmesi in 1 µL vzorca ter jo pokrili s septo in jo položili na ciklični termostat za 5 minut na 95°C, da je potekla denaturacija. Po potekli denaturaciji smo preložili ploščo z vzorci na zmrznjeno ploščo, da so se vzorci ohladili. Ko se je plošča ohladila, smo jo na hitro scentrifugirali ter položili na sekvenator (genetski analizator ABI Prism 3130).

## 2.6.3 Analiza mikrosatelitnih lokusov

### 2.6.3.1 Vizualizacija alelov in preverjanje kvalitete podatkov mikrosatelitnih lokusov

Rezultate, ki smo pridobili s sekvenatorjem smo analizirali v programu GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems) kjer smo preverili uspešnost pomnoževanja vzorcev ter določili pozicije alelov na lokusih. Pri vzorcih, kjer pomnoževanje določenega lokusa ni bilo uspešno, smo pod rezultate zapisali 000 (nulti alel). Podatke smo zaokrožili na cela števila in jih shranili v Excel tabeli za nadaljnje analize. S programom Microchecker (Oosterhout in sod. 2004) smo preverili napake genotipiziranja in prisotnost nultih alelov v vzorcih, ki lahko nastanejo kot posledica degradacije DNA, majhne koncentracije DNA in mutacije mest primerjev, kar lahko vodi v napačno določanje mikrosatelitnih genotipov (Oosterhout in sod. 2004).

### 2.6.3.2 Analize genetske diverzitete

Analizo genetske diverzitete smo opravili na štirih populacijah od sedmih, populacije Razkrižje, Petišovci in Šentjur so bile iz analize izključene zaradi premajhnega števila vzorcev (št. vzorcev <5). Tako je bilo v analizo vključenih 58 vzorcev od skupno 64.

Za izračun števila alelov (NA), bogastva alelov (AR) in koeficienta  $F_{IS}$  smo uporabili program FSTAT 2.9.3.2. (Goudet 2001). Pri izračunu bogastva alelov je bila zmanjšana napaka računanja zaradi različnih velikosti vzorca z metodo angl. rarefaction, ki primerja populacije glede na velikost najmanjšega vzorca.

V programu Genepop (Raymond in Rousset 1995) smo opravili Hardy-Weinbergov test ravnotežja (HWE) za vsak lokus in populacijo posebej. Program izračuna odklon od HWE ravnotežja po metodi Markove verige (angl. Markov chain model). Za izračun smo uporabili 1000 ponovitev. Prav tako smo v programu Genepop preverili vezano neravnovesje (angl. linkage disequilibrium, LD) lokusov. Vezano neravnovesje smo izračunali za vse kombinacije lokusov vseh populacij. Znotraj populacij neravnovesja nismo računali zaradi premajhne populacijske velikosti. Za izračun smo uporabili 1000 ponovitev.

V programu GanAIEx 6.5 (Peakall in Smouse 2006) smo izračunali število privatnih alelov in Nei-jevo genetsko razdaljo.

Pričakovano heterozigotnost ( $H_e$ ) in opaženo heterozigotnost ( $H_o$ ) smo izračunali v programu Genetix 4.05 (Belkhir in sod. 2004).

### 2.6.3.3 Analize genetske strukture in hibridizacije med panonskim in velikim pupkom

V analizo genetske strukture in hibridizacije je bilo vključenih vseh 64 vzorcev. Rezultate analize smo prikazali glede na lokacije vzorčenj.

Genetsko strukturo smo analizirali v programu STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard in sod. 2000). Program določi populacijsko strukturo z uporabo podatkov genotipiziranja za  $K$  populacij (klastrov), od katerih je vsaka populacija karakterizirana z nizom alelnih frekvenc na vsakem lokusu (Pritchard in sod. 2000). Posamezniki so dodeljeni eni populaciji ali v primeru mešanega porekla več populacijam. Program analizira razlike v distribuciji genetskih variant med populacijami z Bayesonovim algoritmom (Poras – Hurtado in sod. 2013). V primeru analize hibridizacije med dvema vrstama je naša predpostavka, da je število populacij/klastrov  $K = 2$ , pri čemer vsak  $K$  predstavlja genski bazen ene od starševskih vrst. Pri tem predvidevamo, da h genskemu bazenu vzorca prispevata dve populaciji. Predvidevamo, da je osebek  $i$  podedoval del genoma ( $q$ ) od prednikov v populaciji  $K$  (Pritchard in sod. 2000). Hibridne osebkke lahko določimo na podlagi vrednosti  $q$ , pri kateri hibridni osebki predstavljajo srednjo vrednost. Vrednosti  $q$  se gibljejo od 0 do 1, pri čemer 0 pomeni, da osebek nima nobene podobnosti s starševsko populacijo, 1 pa da je identičen starševski populaciji. Hibridni osebki prve generacije



imajo vrednost  $q = 0,5$  (Vaha in Primmer 2006). Mejna vrednost  $q$  za določitev čistih osebkov starševskih skupin je v raziskavah različna (Vaha in Primmer 2006). V naši raziskavi smo izbrali mejno vrednost  $q > 0,8$ ; kot so jo določili tudi v raziskavi Maletzky in sod. (2008). Analizo smo opravili po dveh metodah, pri prvi metodi smo uporabili samo 64 vzorcev iz naše raziskave, medtem ko smo pri drugi metodi dodali še 31 referenčnih vzorcev panonskega in velikega pupka iz območjih, kjer ne prihaja do kontakta z drugimi vrstami, in zato predstavljajo čiste starševske populacije. Referenčni vzorci velikega pupka prihajajo iz slovenskega Primorja in Hrvaške Istre (Pavliha 2014), vzorci panonskega pupka pa iz Madžarske (Voros in sod. 2016). Natančnejše lokacije in drugi podatki o referenčnih vzorcih so predstavljeni v Preglednici 5 in Sliki 6.

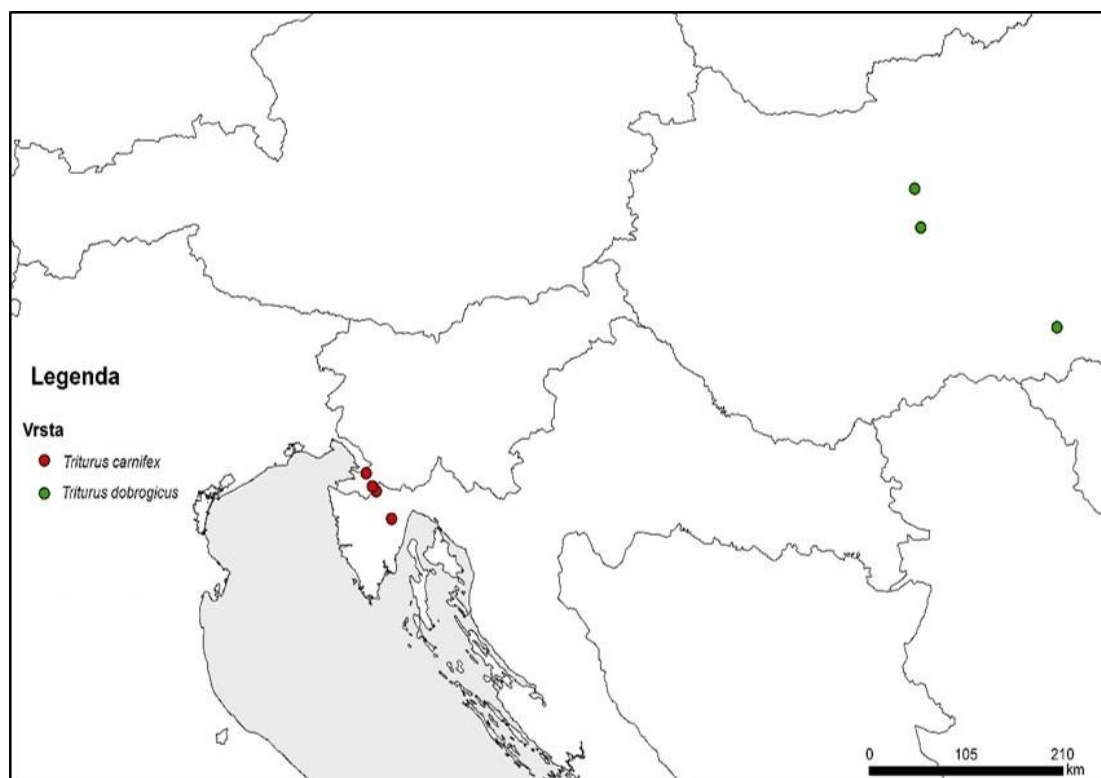
Pri prvi metodi smo izvedli analizo na 64 vzorcih iz vzhodne Slovenije na sedmih lokusih, pri kateri smo uporabili model mešanja (angl. admixture model) in korelirane alelne frekvence med populacijami (angl. correlated allele frequencies). MCMC (Markov chain Monte Carlo) veriga je tekla 1.000.000 generacij, pri čemer smo začetnih 100.000 generacij zavrgli. Število skupin (K) smo določili od 1 do 10, za vsako skupino smo naredili pet ponovitev. Nato smo najverjetnejše število skupin določili s programom STRUCTURE HARVESTER Web v0.6.94 (Earl in von Holdt 2012) z metodo Evanno (Evanno in sod. 2005). Rezultate genetske strukture, ki smo jih pridobili s programom Structure smo grafično prikazali v programu CLUMPAK (Kopelman in sod. 2015).

Pri metodi z referenčnimi vzorci panonskega in velikega pupka smo analizirali šest lokusov, saj referenčni vzorci za panonskega pupka niso vsebovali podatkov za lokus Tcr1 43. Zato smo ta lokus izločili iz analize. Skupaj z referenčnimi vzorci smo analizirali 95 osebkov. Uporabili smo model mešanja in korelirane alelne frekvence med populacijami. V vhodno tabelo smo vključili podatek o populacijah in uporabili POPFLAG model. Vključili smo opcijo USEPOPINFO, ki uporablja podatke o populacijah za računanje verjetnosti, da vsak osebek izvira iz ene od predvidenih populacij. Pri dobljenih nizkih vrednostih lahko predvidevamo, da je osebek hibrid ali migrant (Poras – Hurtado in sod. 2013). Prav tako smo uporabili POPFLAG model, za referenčne vzorce smo nastavili vrednost (POPFLAG = 1), pri vzorcih iz vzhodne Slovenije pa smo pustili vrednost (POPFLAG = 0). Program ignorira populacijske podatke za vzorce pri katerih je POPFLAG nastavljen na 0 in uporabi informacije vzorcev z določenim poreklom (POPFLAG = 1), za uvrstitev vzorcev brez znanega porekla v pravilni klaster (Porras-Hurtado in sod. 2013). MCMC (Markov chain Monte Carlo) veriga je tekla 1.000.000 generacij, pri čemer smo začetnih 100.000 generacij zavrgli. Število skupin (K) smo določili od 1 do 10, za vsako skupino smo naredili pet ponovitev. Nato smo najverjetnejše število skupin določili s programom STRUCTURE HARVESTER Web v0.6.94 (Earl in von Holdt 2012) z metodo Evanno (Evanno in sod. 2005). Rezultate genetske strukture, ki smo jih pridobili s programom Structure smo grafično prikazali v programu CLUMPAK (Kopelman in sod. 2015).

Za določitev hibridizacije osebkov smo ponovili obe metodi s tem, da smo nastavili število možnih skupin na  $K = 2$ . S tem smo predvidevali, da vsak hibridni genotip pripada več kot enemu klastru, medtem ko čisti osebki pripadajo samo enemu klastru, bodisi panonskemu pupku ali velikemu pupku. MCMC veriga je tekla 1.000.000 generacij, pri čemer smo začetnih 100.000 generacij zavrgli. Analizo smo ponovili petkrat. Osebkke smo klasificirali kot čiste osebkke ene od vrst, če so pripadali klastru z verjetnostjo  $q > 0,8$ . Osebkke, ki so pripadali klastru z verjetnostjo  $q < 0,8$  smo določili kot hibridne osebkke.

**Preglednica 5:** Referenčni vzorci za panonskega (*T. dobrogicus*) in velikega (*T. carnifex*) pupka.

Populacija	Vrsta	Lokacija	Država	Koordinate		Število vzorcev
				x	y	
1	<i>T. dobrogicus</i>	Kunpeszer	Madžarska	47.07	19.29	5
2	<i>T. dobrogicus</i>	Kardoskut	Madžarska	46.47	20.62	5
3	<i>T. dobrogicus</i>	Felso-Babad	Madžarska	47.3	19.23	8
4	<i>T. carnifex</i>	Kastelec	Slovenija	46.40	13.87	3
5	<i>T. carnifex</i>	Rakitovec	Slovenija	46.40	13.97	4
6	<i>T. carnifex</i>	Boljun	Hrvaška	46.40	14.12	1
7	<i>T. carnifex</i>	Zazid	Slovenija	46.40	13.93	5



**Slika 6:** Referenčni vzorci velikega (*T. carnifex*) in panonskega (*T. dobrogicus*) pupka.

### 3 REZULTATI

#### 3.1 Izolacija DNA in rezultati masne koncentracije

Izolacija je bila uspešna pri vseh 64 izoliranih vzorcih iz severovzhodne Slovenije. Vrednosti koncentracije so bile med 1,89 ng/ $\mu$ L in 97,60 ng/ $\mu$ L na vzorec. Vrednosti absorbance pa med 1,27 in 2,83 na vzorec. Kljub nekaterim nižjim koncentracijam in neoptimalni absorbanci pri nekaterih vzorcih, so bile nadaljnje analize vzorcev uspešne. Le 1 vzorec (TCAR006) od 64 ni bil uspešen pri analizi mitohondrijskega zaporedja, kljub temu pa se je uspešno pomnožil pri mikrosatelitnih lokusih. Rezultati koncentracije in absorbance za posamezen vzorec so prikazani v Prilogi A.

#### 3.2 Analiza mitohondrijskega zaporedja

Uspešno smo pomnožili del gena za citokrom b pri 63 od skupno 64 osebkov. Gena nismo uspešno pomnožili pri osebku z oznako TCAR006 iz lokacije Petanjci-Tišina kljub večkratni ponovitvi. Pri uspešno pomnoženih vzorcih smo pridobili okrog 550 bp parov dolg fragment nukleotidnega zaporedja gena za citokrom b. Z uporabo orodja BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) smo vzorcem določili vrstno pripadnost. Rezultati so prikazani v Preglednici 6. Od 64 izoliranih osebkov je bilo na podlagi citokroma b, 38 osebkov določenih kot panonski pupek in 25 osebkov kot veliki pupek. Od 38 osebkov panonskega pupka sta bila le dva najdena na desnem bregu Mure in sicer na lokaciji Rihtarovci in Razkrižje. Uspešno pomnoženim vzorcem smo z uporabo programa DNAsp določili pripadajoče haplotipe. Prepoznali smo 9 različnih haplotipov, od tega je le en haplotip (H1) pripadal panonskemu, ostalih osem pa velikemu pupku. Za izris drevesa smo uporabili model Tamura – 3 parameter (T92), ki je bil po BIC in AIC kriterijih najboljši model ta izris. Razporeditev haplotipov je prikazana s filogenetskim drevesom (Slika 10) in z mrežo haplotipov (Slika 9). Haplotipi velikega pupka se med seboj razlikujejo za 1 do 2 mutaciji, medtem ko se haplotip panonskega pupka od haplotipa velikega pupka (H2) razlikuje za 28 mutacijskih mest (Slika 9). Geografska razporejenost haplotipov glede na lokacije vzorčenj je prikazana na Sliki 7, glede na populacije pa na Sliki 8. Najpogostejši je bil haplotip 1 (H1), ki je predstavljal edini haplotip panonskega pupka (najden pri 38 osebkih). Drugi najpogostejši je bil haplotip 4 velikega pupka (H4), ki je bil najden pri 11 vzorcih na petih različnih lokacijah. Haplotip je bil pogostejši na desnem bregu Mure, na levem bregu je bil najden le na eni lokaciji. Pet haplotipov je bilo takšnih, ki so se pojavili pri samo enem vzorcu (H5, H6, H7 in H9).

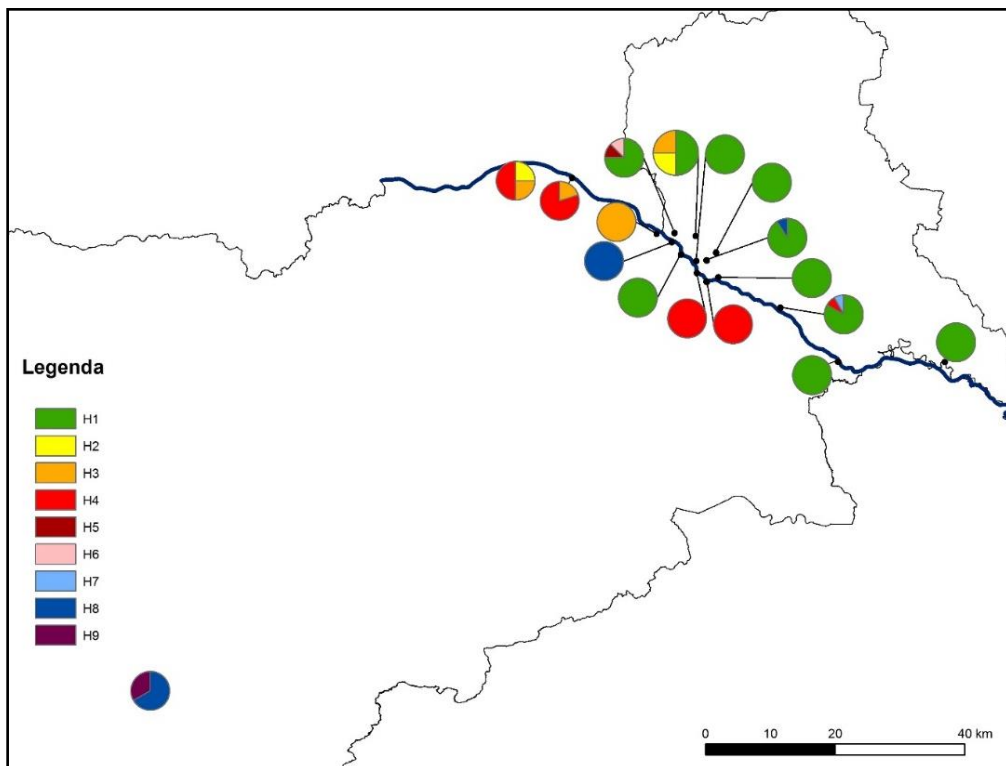
**Preglednica 6:** Rezultati določitve vrste izoliranih osebkov iz Reke Mure na podlagi citokroma b s pripadajočimi haplotipi. *dob* (panonski pupek, *Triturus dobrogicus*), *car* (veliki pupek, *Triturus carnifex*), n/a (ni podatkov).

<b>Vzorec</b>	<b>Lokacija</b>	<b>Populacija</b>	<b>Vrsta (BLAST)</b>	<b>Haplotip</b>
<b>Tcar001</b>	Murski Črnci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar002</b>	Petanjci-Tišina	3	<i>car</i>	H2
<b>Tcar006</b>	Petanjci-Tišina	3	n/a	n/a
<b>Tcar007</b>	Petanjci-Tišina	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar008</b>	Petanjci-Tišina	3	<i>car</i>	H3
<b>Tcar009</b>	Petanjci-Tišina	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar017</b>	Tropovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar018</b>	Tropovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar019</b>	Šentjur	/	<i>car</i>	H9
<b>Tcar020</b>	Šentjur	/	<i>car</i>	H8
<b>Tcar021</b>	Šentjur	/	<i>car</i>	H8
<b>Tcar033</b>	Krog	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar034</b>	Krog	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar035</b>	Krog	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar043</b>	Petanjci-Zaton	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar044</b>	Petanjci-Zaton	3	<i>car</i>	H5
<b>Tcar045</b>	Petanjci-Zaton	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar047</b>	Petanjci-Zaton	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar048</b>	Petanjci-Zaton	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar049</b>	Petanjci-Zaton	3	<i>car</i>	H6
<b>Tcar057</b>	Petanjci-Zaton	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar058</b>	Petanjci-Zaton	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar107</b>	Hrastje-Mota	3	<i>car</i>	H4
<b>Tcar064</b>	Hrastje-Mota	3	<i>car</i>	H4
<b>Tcar065</b>	Rihtarovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar042</b>	Apače	1	<i>car</i>	H4
<b>Tcar066</b>	Apače	1	<i>car</i>	H4
<b>Tcar067</b>	Apače	1	<i>car</i>	H4
<b>Tcar068</b>	Apače	1	<i>car</i>	H3
<b>Tcar069</b>	Apače	1	<i>car</i>	H4
<b>Tcar070</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar071</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar072</b>	Ižakovci	4	<i>car</i>	H4
<b>Tcar073</b>	Ižakovci	4	<i>car</i>	H7
<b>Tcar074</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar075</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1

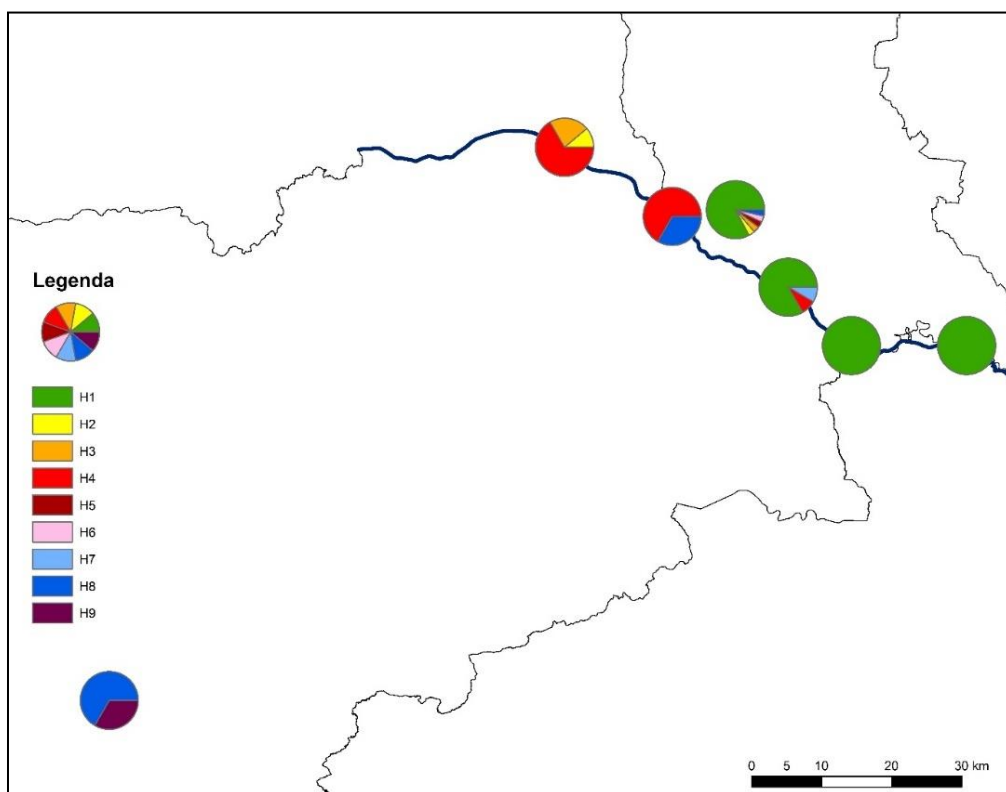
---

<b>Tcar076</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar077</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar078</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar079</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar080</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar081</b>	Ižakovci	4	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar082</b>	Konjišče	1	<i>car</i>	H3
<b>Tcar083</b>	Konjišče	1	<i>car</i>	H4
<b>Tcar084</b>	Konjišče	1	<i>car</i>	H2
<b>Tcar085</b>	Konjišče	1	<i>car</i>	H4
<b>Tcar086</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar087</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar088</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar089</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar090</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar091</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar092</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar093</b>	Krog-Satahovci	3	<i>car</i>	H8
<b>Tcar100</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar101</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar102</b>	Krog-Satahovci	3	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar096</b>	Petišovci	/	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar097</b>	Petišovci	/	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar098</b>	Radenci	2	<i>car</i>	H8
<b>Tcar099</b>	Razkrižje	/	<i>dob</i>	H1
<b>Tcar106</b>	Šratovci	2	<i>car</i>	H3
<b>Tcar108</b>	Vučja vas	2	<i>car</i>	H4
<b>Tcar109</b>	Vučja vas	2	<i>car</i>	H4

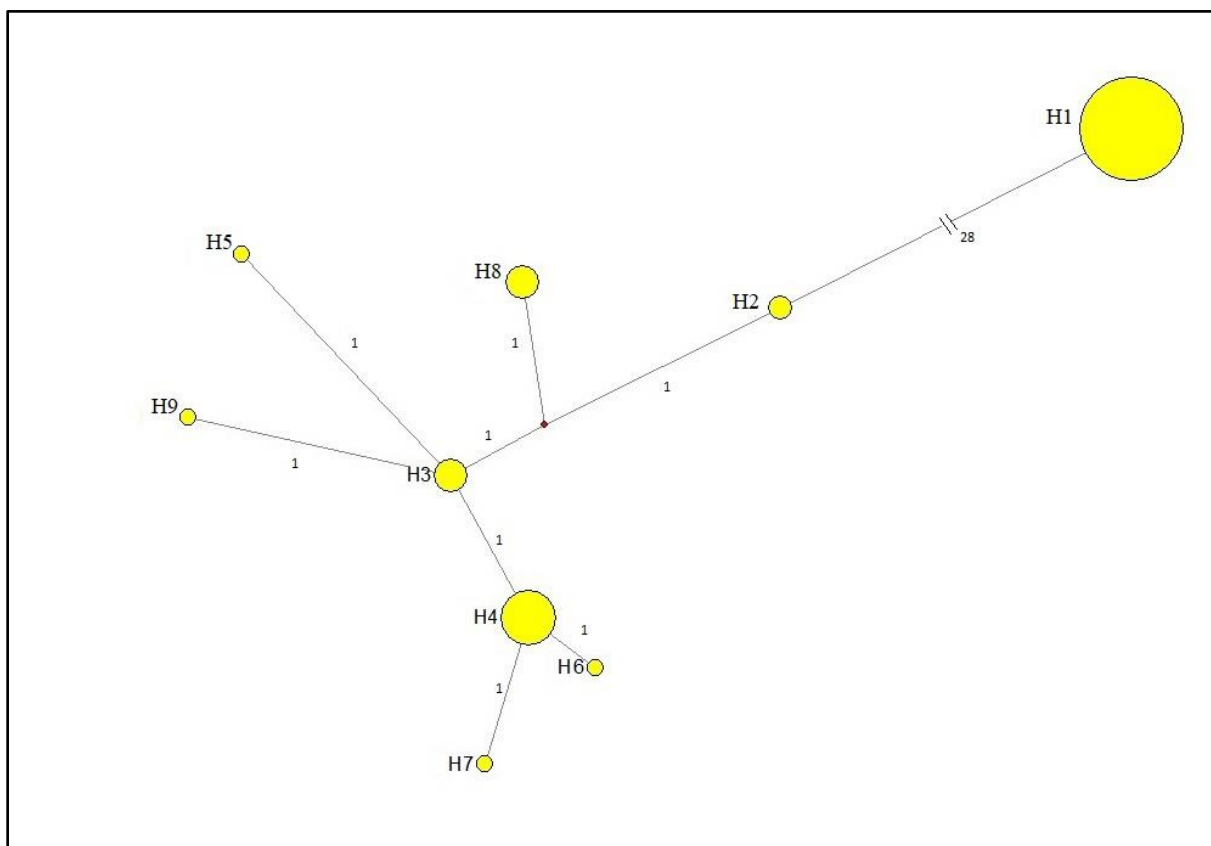
---



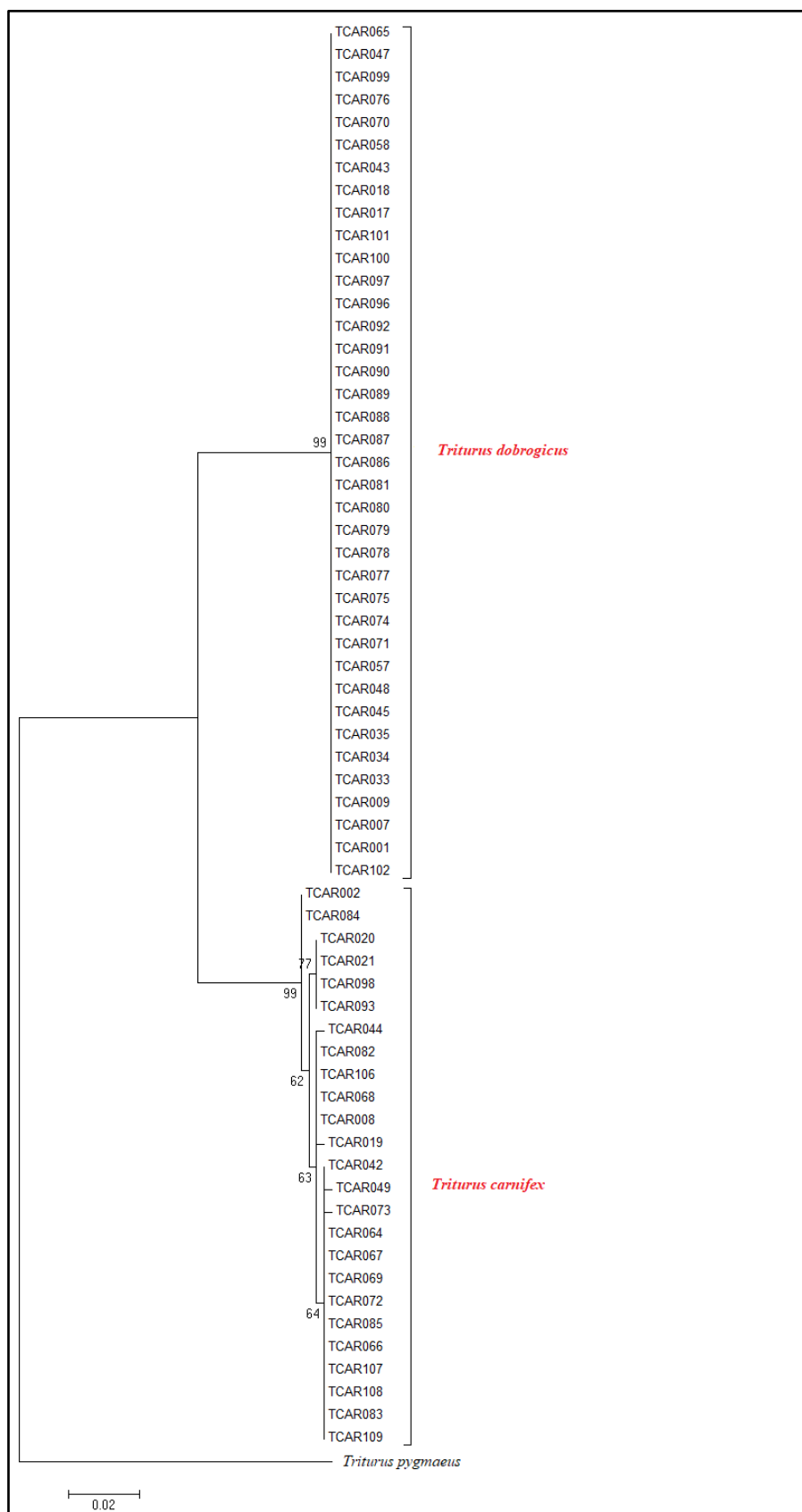
**Slika 7:** Razporeditev haplotipov gena za citokrom b glede na geografsko lokacijo vzorcev. Haplotip 1 (H1) predstavlja edini haplotip panonskega pupka. Ostali haplotipi predstavljajo haplotipe velikega pupka.



**Slika 8:** Razporeditev haplotipov znotraj populacij. Haplotip 1 (H1) predstavlja edini haplotip panonskega pupka. Ostali haplotipi predstavljajo haplotipe velikega pupka.



**Slika 9:** Mreža haplotipov panonskega in velikega pupka. Velikost krogov je sorazmerna s številom vzorcev. Haplotip 1 (H1) predstavlja edini haplotip panonskega pupka. Ostali haplotipi predstavljajo haplotipe velikega pupka.



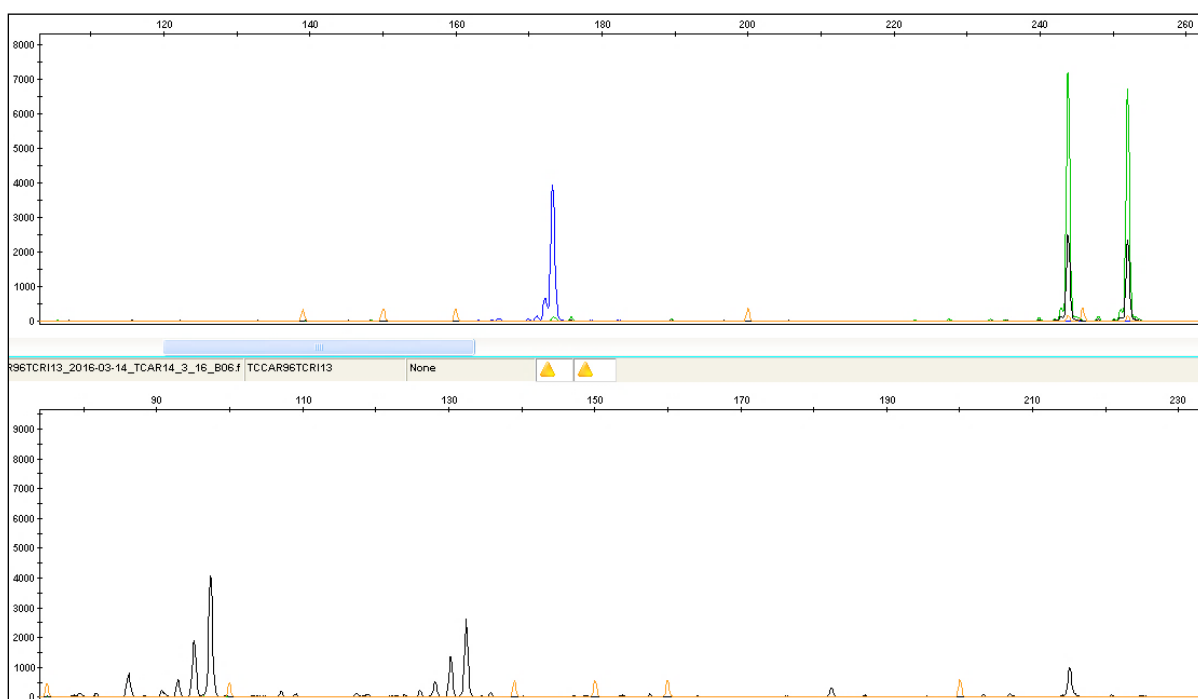
**Slika 10:** Drevo največjega verjetja (angl. maximum likelihood) vzorcev velikega in navadnega pupka iz SV Slovenije.



### 3.3 Analiza mikrosatelitnih lokusov

#### 3.3.1 Vizualizacija alelov in preverjanje kvalitete analize mikrosatelitnih lokusov

Uspešno smo analizirali velikost alelov ter heterozigotnost alelov na sedmih lokusih pri 64 vzorcih. Lokus Tcri32 se je pomnožil le pri nekaj vzorcih, zato smo podatke za ta lokus zavrgli in za nadaljnje analize uporabili podatke sedmih lokusov (Tcri13, Tcri27, Tcri29, Tcri35, Tcri36, Tcri43 in Tcri46). Rezultate smo zapisali v tabelo in jih zaokrožili na celo število. Pri lokusih, kjer se alel ni pomnožil, smo ga označili kot 000 (nulti alel). Na sliki 11 je prikazan primer vizualizacije alelov dveh vzorcev na 3 lokusih (Tcri13, Tcri27 in Tcri29).



**Slika 11:** Prikaz izrisa alelov v programu Genemapper 4.1v. Prikazan je primer izrisa za dva osebka (Tcar006 in Tcar096). Zgoraj je prikazan izris za dva lokusa, Tcri27 (moder alel) in Tcri29 (zelen alel). Spodaj pa je prikaz izrisa za lokus Tcri13 (črn alel). Z oranžnimi vrhovi so označeni velikostni standardi (angl. size standard).

S programom Microchecker smo odkrili potencialne nulte alele na lokusih Tcri35, Tcri36, Tcri43, Tcri27 in Tcri46. Za lokus Tcri13 in Tcri29 nismo odkrili nultih alelov.

Rezultati vezanega neravnovesja so pokazali, da so lokusi nepovezani in se prosto rekombinirajo (Priloga B).

### 3.3.2 Analiza genetske diverzitete

Populacije Razkrižje, Petišovci in Šentjur so bile iz analize genetske diverzitete izključene zaradi premajhne velikosti vzorca. Vsi uspešno pomnoženi lokusi so bili visoko polimorfni z 10 do 20 alelov na lokus. Najvišje število alelov je imel lokus Tcri36 (20), najnižje pa lokus Tcri13 (10) (Preglednica 7 in 8). Na vseh sedmih lokusih skupaj je bilo 95 alelov (13,57 alelov na lokus). Panonski pupek je imel višje število alelov (82 alelov, povprečno 11,71 alelov na lokus) kot veliki pupek (57 alelov, povprečno 8,14 alelov na lokus). Prav tako je imel panonski pupek višje število privatnih alelov (30) kot veliki pupek (18). Lokus Tcri36 je imel največje število privatnih alelov pri obeh vrstah, najmanjše pa lokus Tcri13. Rezultati razpona alelov, števila alelov in števila privatnih alelov za posamezen lokus so prikazani v Preglednici 6. Vrednosti bogastva alelov so med 1 in 7,262. Najnižja povprečna vrednost je bila na lokusu Tcri27 (3,917), najvišja pa na lokusu Tcri29 (5,907) (Preglednica 10). Največje alelno bogastvo je bilo najdeno v populaciji 4, najmanjše pa v populaciji 1 (Preglednica 8).

**Preglednica 7:** Razpon alelov, število alelov in število privatnih alelov na lokus. Vrsta osebkov je bila določena glede na rezultate mtDNA.

Lokus	Razpon alelov (bp)	Število alelov		
		Skupaj	<i>T. carnifex</i>	<i>T. dobrogicus</i>
<b>Tcri13</b>	91-137	10	9 (1)	8 (1)
<b>Tcri27</b>	173-285	11	5 (3)	11 (5)
<b>Tcri29</b>	244-345	13	8 (2)	12 (2)
<b>Tcri35</b>	194-311	16	11 (5)	12 (6)
<b>Tcri36</b>	188-449	20	10 (6)	16 (9)
<b>Tcri43</b>	246-288	12	8 (0)	10 (4)
<b>Tcri46</b>	232-345	13	6 (1)	13 (3)
<b>Sum</b>		95	57 (18)	82 (30)
<b>Povprečno</b>		13.57	8.14	11.71

Vrednosti opažene heterozigotnosti so bile od 0,4286 do 0,5619 na populacijo. Najvišja  $H_e$  in  $H_o$  je bila pri populaciji označeni s številko 3, najmanjša pa pri populaciji označeni s številko 1. Največja razlika med pričakovano in opaženo heterozigotnostjo je bila v populaciji št. 4, najmanjša pa pri populaciji št. 1. Pri vseh populacijah je bila opažena heterozigotnost nižja od pričakovane (Preglednica 8, Slika 12). Izrazit deficit heterozigotnosti je bil opažen na lokusih Tcri36, Tcri43 in Tcri46 (pozitivne vrednosti  $F_{IS}$ ). Največji deficit je bilo opaziti na lokusu Tcri46, največji porast heterozigotnosti pa na lokusu Tcri13. Rezultati za posamezen lokus so prikazani v Preglednici 11. Največji deficit heterozigotnosti je bilo opaziti pri populaciji št. 4,

najmanjši pa pri populaciji št.1. Pri nobeni populaciji ni bilo opaziti porasta heterozigotnosti (Preglednica 8).

**Preglednica 8:** Genetska diverziteteta velikega in panonskega pupka v vzhodni Sloveniji. Pričakovana heterozigotnost ( $H_e$ ), opažena heterozigotnost ( $H_o$ ), koeficient inbreedinga (FIS), Hardy-Weinbergovo ravnotežje (HW) in bogastvo alelov (AR) glede na populacijo. **v.s.z.**-visoko statistično značilno ( $HW < 0,01$ ).

POP.	Št. vzorci v	$H_e \pm SD$	$H_o \pm SD$	FIS	HW	AR
1	9	$0.5194 \pm 0.2759$	$0.4286 \pm 0.3420$	0.231	0.1085	3.52
2	7	$0.5339 \pm 0.2001$	$0.4354 \pm 0.1590$	0.261	0.0725	4.34
3	30	$0.7323 \pm 0.1010$	$0.5619 \pm 0.1508$	0.249	<b>v.s.z.</b>	5.43
4	12	$0.7197 \pm 0.1394$	$0.5119 \pm 0.3278$	0.328	<b>v.s.z.</b>	5.56

**Preglednica 9:** Število alelov (NA) glede na lokus in populacijo.

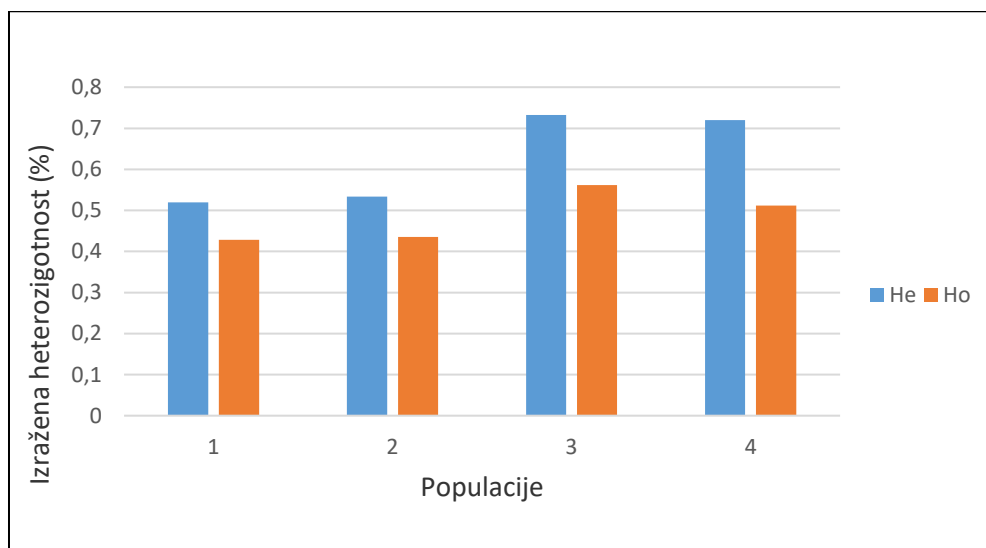
Lokus/ Populacija	Tcri 13	Tcri 27	Tcri 29	Tcri 35	Tcri 36	Tcri 43	Tcri 46
1	5	1	2	6	3	7	3
2	5	3	4	5	6	6	4
3	9	10	12	14	15	9	10
4	6	7	11	5	7	9	9
<b>SKUPAJ</b>	10	11	13	16	20	12	13

**Preglednica 10:** Bogastvo alelov (AR) glede na lokus in populacijo.

Lokus/ Populacija	Tcri 13	Tcri 27	Tcri 29	Tcri 35	Tcri 36	Tcri 43	Tcri 46
1	4.779	1.000	2.000	4.897	2.897	6.161	2.877
2	4.429	2.714	3.703	5.000	5.286	5.560	3.703
3	4.594	4.268	6.661	6.091	5.790	4.768	5.809
4	4.407	5.043	7.262	4.474	4.261	6.960	6.496
<b>SKUPAJ</b>	5.055	3.917	5.907	5.837	5.102	5.782	5.401

**Preglednica 11:** Vrednosti FIS glede na lokus in populacijo.

Populacija/	1	2	3	4
<b>Lokus</b>				
<b>Tcri 13</b>	0.034	0.163	-0.054	-0.250
<b>Tcri 27</b>	N/A	-0.043	0.115	0.286
<b>Tcri 29</b>	0.543	0.143	0.084	-0.148
<b>Tcri 35</b>	-0.087	0.630	0.360	1.000
<b>Tcri 36</b>	0.377	0.059	0.296	0.179
<b>Tcri 43</b>	0.111	0.130	0.354	0.636
<b>Tcri 46</b>	0.771	0.442	0.533	0.424
<b>Skupaj</b>	0.231	0.261	0.249	0.328



**Slika 12:** Pričakovana (He) in opažena heterozigotnost (Ho) glede na populacijo.

Rezultati Hardy-Weinbergovega testa ravnotežja na lokus in na populacijo so prikazani v Preglednici 12. Visoko statistično značilni ( $p < 0,01$ ) so štirje lokusi Tcri35, Tcri36, Tcri43 in Tcri46. Lokusi Tcri13, Tcri27 in Tcri29 niso statistično značilni. Dve populaciji nista v Hardy Weinbergovem ravnotežju, to sta populaciji 3 in 4. Obe populaciji imata velik delež osebkov panonskega pupka (določenih po mtDNA).

**Preglednica 12:** Hardy-Weinbergov test ravnotežja glede na lokus in populacijo. Odebeljeni so statistično značilni rezultati ( $p < 0,05$ ). **v.s.z.** označeni rezultati, ki so visoko signifikantni ( $p < 0,01$ ).

Lokusi/ Populacije	Tcri1	Tcri27	Tcri29	Tcri35	Tcri36	Tcri43	Tcri46
1	0.5694	-	0.1681	0.7435	0.1998	0.7257	<b>0.0106</b>
2	0.4532	1.0000	0.4550	0.0145	0.6492	0.3098	<b>0.0237</b>
3	0.9873	0.5620	0.5576	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
4	1.0000	<b>0.0216</b>	0.3096	<b>0.0000</b>	0.2207	<b>0.0000</b>	<b>0.0069</b>
<b>Skupaj</b>	0.9499	0.1837	0.3723	<b>v.s.z.</b>	<b>v.s.z.</b>	<b>v.s.z.</b>	<b>v.s.z.</b>

Genetske razdalje med pari populacij, ki smo jih določili v programu GenAlEx 6.5 so prikazane v Preglednici 13. Populaciji, ki imata vrednost bližje 1, sta si bolj različni kot populaciji, ki imata vrednost bližje 0. Razdalje med pari populacij so bile od 0,104 do 0,268. Najnižja razdalja je bila med populacijo 3 in 4 (0,104), najvišja pa med populacijama 2 in 4 (0,268). Največja genetska razdalja je med Populacijo 1 in vsemi ostalimi populacijami (od 0,203 do 0,231). Populacija 2 je pretežno sestavljena osebkov velikega pupka (po mtDNA), medtem ko je populacija 4 sestavljena pretežno iz osebkov panonskega pupka.

**Preglednica 13:** Niejeva genetska razdalja med populacijami.

	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4
Pop1	0.000			
Pop2	0.231	0.000		
Pop3	0.205	0.124	0.000	
Pop4	0.203	0.268	0.104	0.000

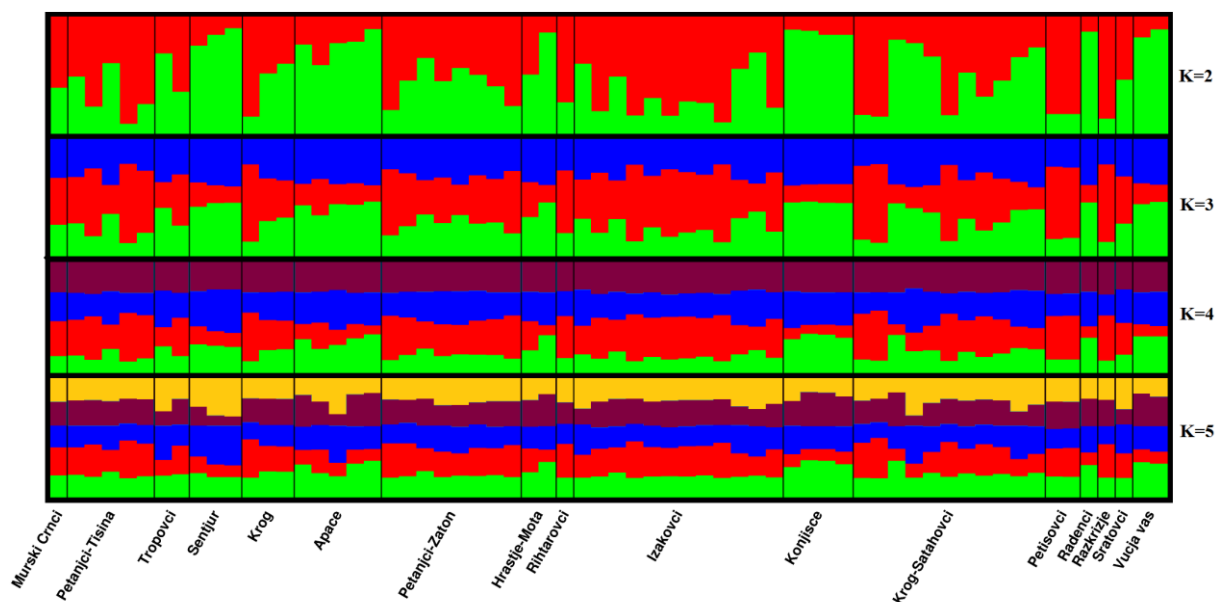
### 3.4 Analiza populacijske strukture in hibridizacije med velikim (*Triturus carnifex*) in panonskim (*Triturus dobrogicus*) pupkom

#### 1. Metoda

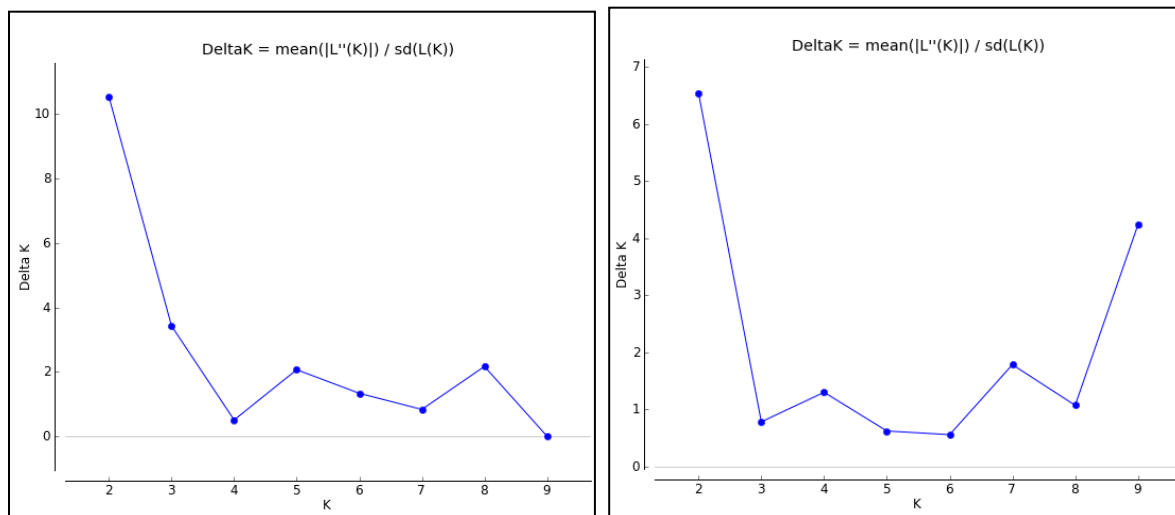
Structure harvester je z metodo Evanno za najprimernejše število klastrov določil dve skupini ( $K = 2$ ;  $\Delta K = 10,52$ ;  $\ln P(D) = -1642,00$ ), ki ločita velikega in panonskega pupka (Slika 13 in 14). Populacijska struktura je prikazana za  $K = 2$  do  $K = 5$ , glede na lokacije vzorčenj na Sliki 13. Iz strukturiranosti je vidna ločitev lokacij, kjer so bili določeni le osebki velikega pupka, to so lokacije Šentjur, Apače, Konjišče, Radenci in Vučja vas. Te lokacije imajo višji delež *qcar* od ostalih lokacij. Rezultati mešanja so pokazali, da je 21 vzorcev uvrščenih v enega od klastrov

z verjetnostjo  $q > 0,8$ , ostalih 43 vzorcev je kazalo mešano poreklo med obema vrstama. Razvrstitev vzorcev v klaster glede na  $q$  je prikazana v Preglednici 14. Dva vzorca sta bila uvrščena v klaster z verjetnostjo  $q > 0,8$  kljub temu, da ju je analiza mtDNA uvrstila v drugo vrsto. To sta vzorca TCAR008 ( $q = 0.900$ , *dob* klaster; *car* mtDNA, lokacija Petanjci-Tišina) in TCAR088 ( $q = 0.813$ , *car* klaster; *dob* mtDNA, lokacija Krog-Satahovci).

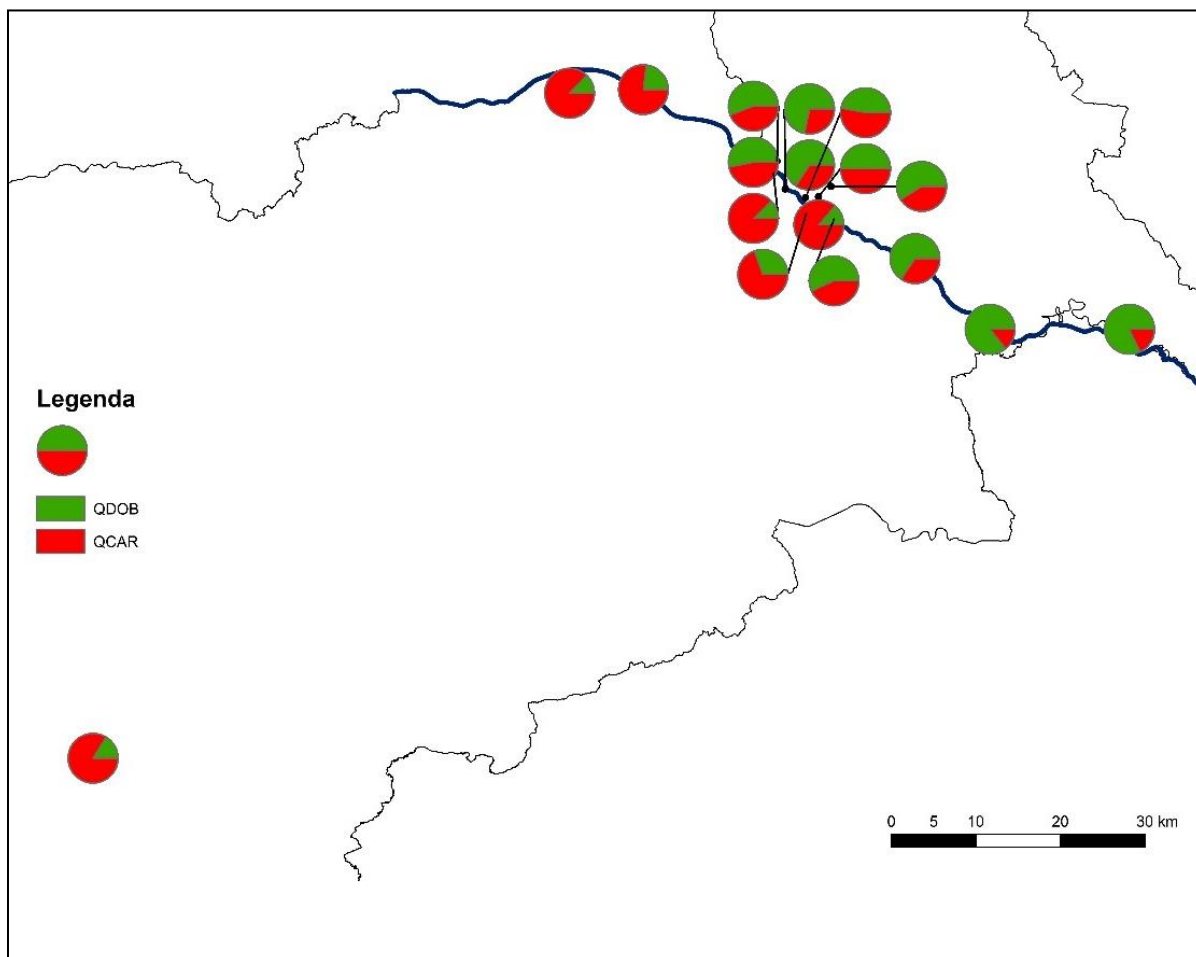
Lokaciji Petišovci in Razkrižje sta uvrščeni v klaster panonskega pupka. Lokacije Šentjur, Konjišče, Radenci in Vučja vas pa so uvrščene v klaster velikega pupka. Ostalih 11 lokacij kaže mešano poreklo obeh vrst (Slika 15, Preglednica 15). Iz rezultatov mešanja je razvidno, da je večji delež  $q_{car}$  na desnem bregu reke Mure, kot je pokazala tudi analiza mtDNA. Prav tako je vidno povečevanje deleža  $q_{dob}$  dolvodno proti jugovzhodu.



**Slika 13:** Strukturiranost vzorčenih lokacij za K2 - K5. Strukturiranost lokacij je izrisana na podlagi programa STRUCTURE. Najverjetnejše število je  $K = 2$ . Izris je rezultat prve metode pri kateri smo uporabili 64 vzorcev iz vzhodne Slovenije brez referenčnih vzorcev.



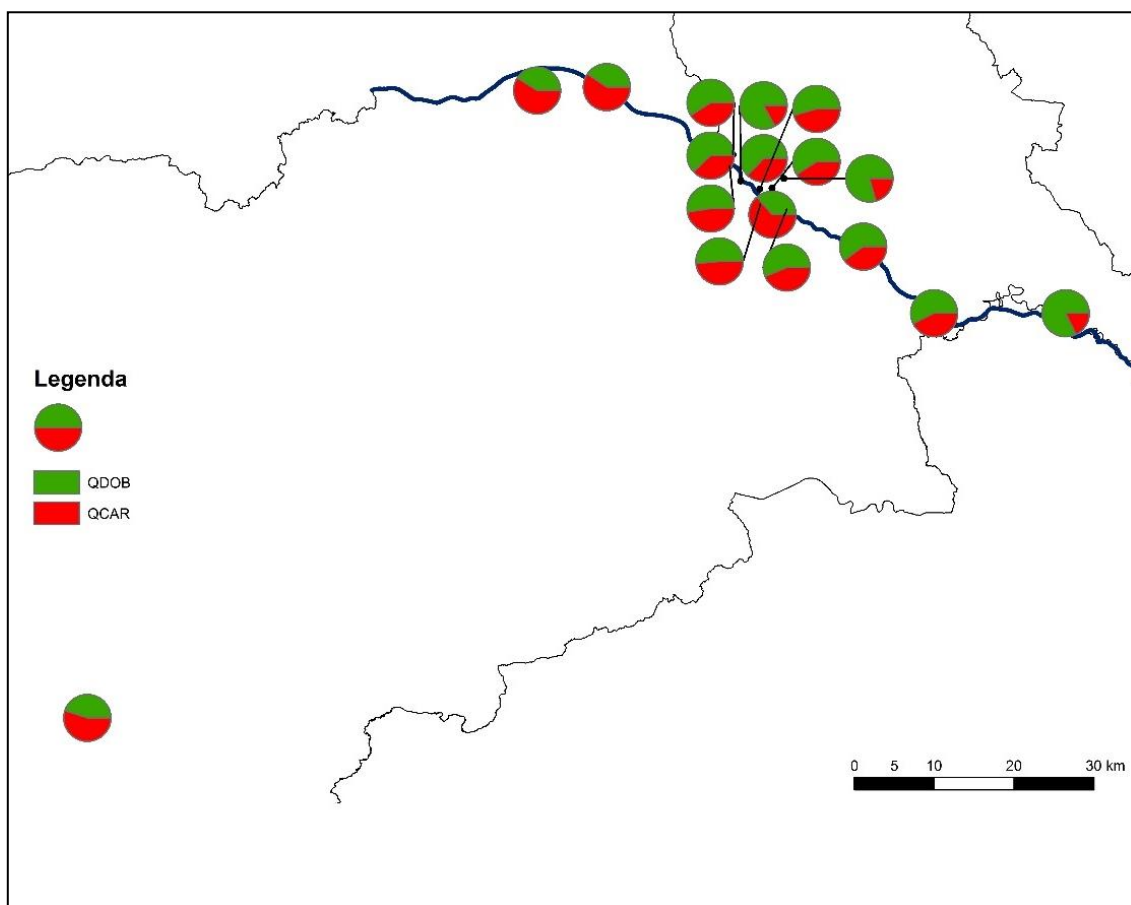
**Slika 14:** Izbira najbolj verjetnega števila skupin z metodo  $\Delta K$  (Evano in sod. 2006). Prva slika prikazuje  $\Delta K$  za metodo 1, druga slika pa za metodo 2.



**Slika 15:** Delež mešanja ( $q$ ) med velikim in panonskim pupkom v vzhodni Sloveniji na podlagi rezultatov programa STRUCTURE po prvi metodi.

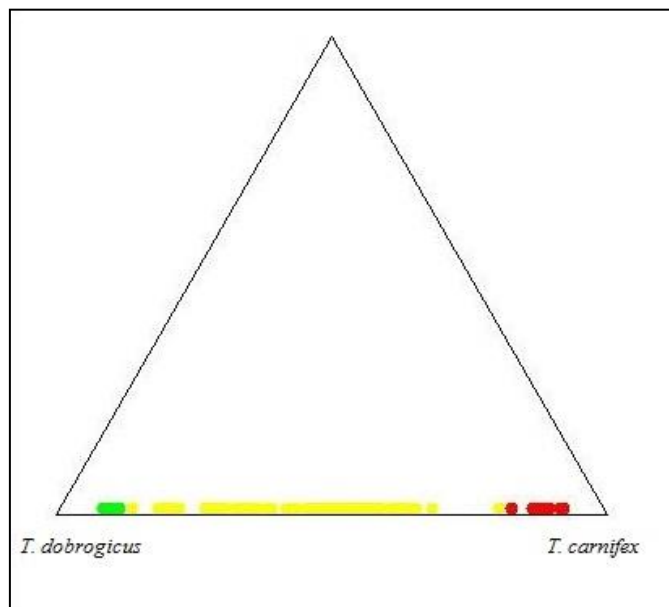
## 2. Metoda

Structure harvester je z metodo Evanno za najprimernejšo število klastrov določil dve skupini ( $K = 2$ ;  $\Delta K = 6,54$ ;  $\text{Ln } P(D) = -441299,45$ ) ki ločita panonskega in velikega pupka (Slika 13). Populacijska struktura je prikazana na Sliki 18 za  $K = 2$  do  $K = 5$ . Strukturiranost glede na lokacije je bolj homogena kot pri prvi metodi. Nobena lokacije ne izstopa bistveno. Pupki iz referenčnih populacij so bili uvrščeni v pravi Structure klaster z verjetnostjo  $q$  0.838-0.941. Vzorci iz vzhodne Slovenije so bili uvrščeni v enega od starševskih klastrov ali pa so kazali mešano poreklo med obema vrstama (Priloga C). Le devet osebkov je pripadalo enemu klastru ( $q > 0,8$ ), ostalih 55 osebkov je kazalo mešano poreklo med obema vrstama. Razvrstitev vzorcev glede na  $q$  je prikazana v Prilogi C. Po tej metodi je bil le 1 vzorec uvrščen v klaster z verjetnostjo  $q > 0,8$  kljub temu, da ga je mtDNA uvrstila v drugo vrsto. To je vzorec TCAR008 ( $q = 0.835$ , *dob* klaster; *car* mtDNA, lokacija Petanjci-Tišina), vzorec TCAR088, ki je bil po prvi metodi uvrščen v klaster velikega pupka, je pri tej metodi kazal mešano poreklo. Lokaciji Rihtarovci in Petišovci sta uvrščeni v klaster panonskega pupka ( $q > 0,8$ ), vse ostale lokacije kažejo mešan izvor. Razvrstitev lokacij glede na  $q$  je prikazana na Sliki 16 in Preglednici 14. Tudi pri tej metodi je viden večji delež  $q_{car}$  na desnem bregu, vendar je manj opazno kot pri prvi metodi.



**Slika 16:** Delež mešanja ( $q$ ) med velikim in panonskim pupkom v vzhodni Sloveniji na podlagi rezultatov programa STRUCTURE po drugi metodi. Referenčni vzorci niso vključeni v grafični prikaz.

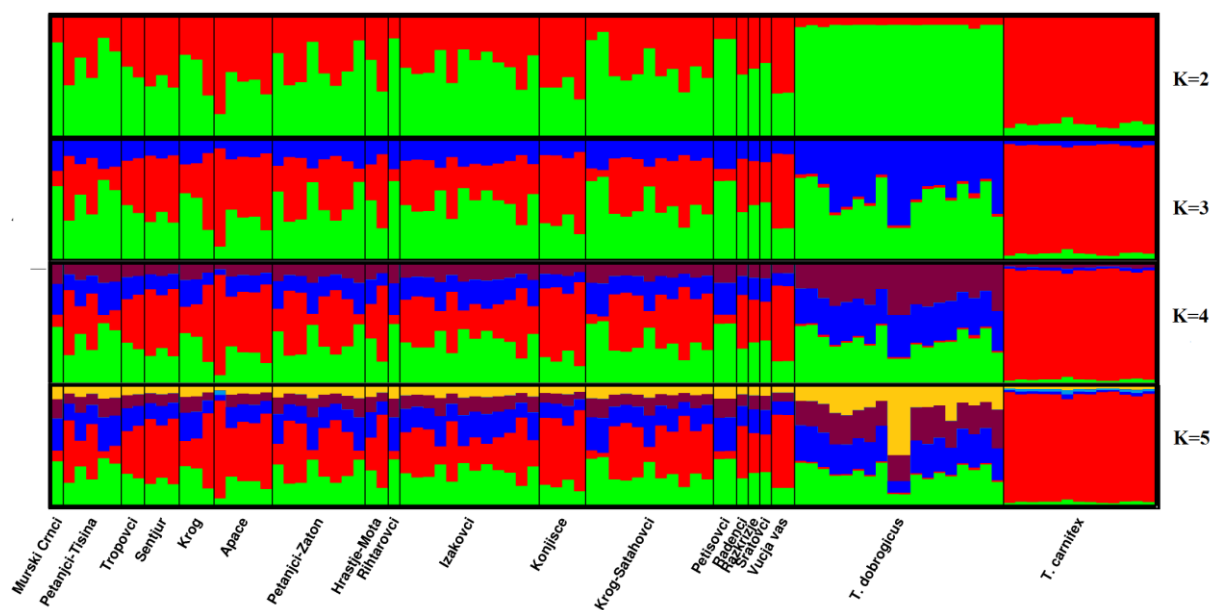




**Slika 17:** Grafični prikaz razvrstitve vzorcev glede na parameter mešanja  $q$  (Structure) z uporabo mikrosatelitnih podatkov. Referenčni vzorci panonskega pupka so označeni z zeleno barvo in predstavljajo klaster 1, referenčni vzorci velikega pupka pa so rdeče obarvani in predstavljajo klaster 2. Vzorci iz vzhodne Slovenije so označeni z rumeno barvo. Vsaka točka predstavlja en vzorec.

**Preglednica 14:** Rezultati koeficienta mešanja ( $q$ ) glede na lokacije vzorčenja. Lokacije, ki so uvrščene v klaster z verjetnostjo ( $q > 0,8$ ) so krepko označene. Prikazani so rezultati za obe metodi.

	Lokacija	Brez referenčnih v.		Z referenčnimi v.		mtDNA
		$q_{dob}$	$q_{car}$	$q_{dob}$	$q_{car}$	
1	Murski Črnci	0.590	0.410	0.795	0.205	<i>dob</i>
2	Petanjci-Tišina	0.658	0.342	0.630	0.370	<i>dob, car</i>
3	Tropovci	0.471	0.529	0.544	0.456	<i>dob</i>
4	<b>Šentjur</b>	0.163	<b>0.837</b>	0.451	0.549	<i>car</i>
5	Krog	0.570	0.430	0.563	0.437	<i>dob</i>
6	Apače	0.231	0.769	0.407	0.593	<i>dob</i>
7	Petanjci-Zaton	0.559	0.441	0.591	0.409	<i>dob, car</i>
8	Hrastje-Mota	0.305	0.695	0.514	0.486	<i>car</i>
9	<b>Rihtarovci</b>	0.719	0.281	<b>0.829</b>	0.171	<i>dob</i>
10	Ižakovci	0.656	0.344	0.601	0.399	<i>dob, car</i>
11	<b>Konjišče</b>	0.130	<b>0.870</b>	0.411	0.589	<i>car</i>
12	Krog-Satahovci	0.500	0.500	0.590	0.410	<i>dob, car</i>
13	<b>Petišovci</b>	<b>0.820</b>	0.180	<b>0.824</b>	0.176	<i>dob</i>
14	<b>Radenci</b>	0.122	<b>0.878</b>	0.524	0.476	<i>car</i>
15	<b>Razkrižje</b>	<b>0.858</b>	0.142	0.574	0.426	<i>dob</i>
16	Šratovci	0.531	0.469	0.620	0.380	<i>car</i>
17	<b>Vučja vas</b>	0.139	<b>0.861</b>	0.366	0.634	<i>car</i>



**Slika 18:** Strukturiranost vzorčenih lokacij za K2 - K5. Strukturiranost lokacij je izrisana na podlagi programa STRUCTURE. Najverjetnejše število populacij je  $K = 2$ . Izris je rezultat druge metode pri kateri smo uporabili 64 vzorcev iz vzhodne Slovenije z referenčni vzorci *T. dobrogicus* in *T. carnifex*.

## 4 DISKUSIJA

### 4.1 Analiza mtDNA

Z analizo mitohondrijske DNA smo potrdili prisotnost panonskega pupka v vzhodni Sloveniji, s čimer smo podkrepili predhodne morfološke raziskave na tem območju (Stanković in Delić 2012, Cipot in sod. 2015; Lužnik in sod. 2015). Večji delež pupkov z *T. dobrogicus* mtDNA je prisoten na levem bregu Mure kot tudi dolvodno po reki Muri proti tromeji s Hrvaško in Madžarsko. Takšni rezultati so bili pričakovani, saj je do zdaj znana kontaktna cona obeh vrst prav na skrajnem vzhodu Slovenije (Slika 19). Pupki z *T. carnifex* mtDNA so bili na levem bregu Mure redkejši kot na desnem bregu. Na levem bregu so bile vse lokacije mešane ali pa so vsebovale le *T. dobrogicus* mtDNA. Vse lokacije, kjer smo našli le osebke z mtDNA velikega pupka, so bile na desnem bregu. Od 17 vzorčnih lokacij so 4 lokacije vsebovale tako *T. carnifex* kot *T. dobrogicus* mtDNA. To so bile lokacije Petanjci-Tišina, Petanjci-Zaton, Ižakovci, in Krog-Satahovci. Domnevamo da je eden od razlogov zakaj so panonski pupki pogostejši na levem bregu to, da so tam za njega primernejši habitati. V zgornjem delu toka reke Mure v Sloveniji so v 40 letih prejšnjega stoletja izvajali regulacijske posege, kar je povzročilo poglobitev rečne struge in spremenjeno rečno dinamiko vse od mejne Mure do Veržeja (Kikec 2007). Na samo poplavno dinamiko reke je močno vplivala tudi izgradnja nasipov, ki preprečujejo poplavljanje reke (Kaligarič in Beltram 2016). Od Veržeja dalje proti tromeji s Hrvaško in Madžarsko je reka ohranila svoje prvotne značilnosti (meandričen nižinski tok), dolvodno so pogostejše mrtvice, kar predstavlja ugoden habitat za panonskega pupka (Kaligarič in Beltram 2016). To je lahko eden od razlogov, da panonskega pupka najdemo pogosteje na levem bregu in dolvodno po reki proti tromeji. Prav tako je možno, da je panonski pupek v preteklosti naseljeval nižinski pas od Mure vse do reke Drave. Vendar je iz tega območja izginil zaradi regulacij in melioracij, ki so povzročila izginotje mokrišč in ostalih primernih habitatov. Podobno sklepajo tudi za razširjenost nižinskega urha (*Bombina bombina*), ki je nekoč verjetno poseljeval območje vse do Drave, danes pa ga v vmesnem območju med Dravo in Muro več ne najdemo, domnevno zaradi pomanjkanja primernih habitatov (Cipot in sod. 2011).

Za panonskega pupka smo določili en haplotip, za velikega pupka pa 8 različnih haplotipov. Rezultati analize polimorfizma gena za citokrom b kažejo na nizko mtDNA diverziteto panonskega pupka. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Wallis in Arntzen (1989) in Wielstra in sod. (2013b). Wielstra in sod. (2013b) razlagajo nizko diverziteto mtDNA z demografsko ekspanzijo po učinku ozkega grla. V Evropi je imela zadnja ledena doba močan vpliv na distribucijo vrst in njihovo znotraj vrstno diverziteto (Wielstra in sod. 2013b). V času Pleistocenske poledenitve so populacije v južnih refugijih akumulirale visoko genetsko bogastvo, medtem ko so severne populacije genetsko uniformne zaradi učinka ozkega grla, ki se je pojavil pri ekspanziji populacij iz refugijev proti severu po koncu poledenitve (Maletzky

in sod. 2008). Za velikega pupka je znano, da je imel refugije v času zadnje poledenitve na območju Italije, južne Slovenije in Hrvaške, od koder se je po ledeni dobi širil proti severu (Wielstra in sod. 2013b). Panonski pupek pa je zadnjo ledeno dobo preživel na delu svoje zdajšnje razširjenosti, na območju severozahodne in južne Panonske nižine, od koder se je po zadnji ledeni dobi razširil vzdolž reke Mure in Tise (Voros in sod. 2016).

## 4.2 Analiza mikrosatelitnih lokusov

Uspešno smo pomnožili sedem lokusov od skupno osmih, kljub temu, da so bili vsi uporabljeni lokusi so bili prvotno razviti za vrsto *T. cristatus* (Krupa in sod. 2002), zato niso nujno univerzalni za vse vrste *Triturus*. Lokus Tcri32 se je pomnožil le pri nekaj vzorcih, tudi v raziskavi Mikuliček in sod. (2007) se ni pomnožil pri vzorcih velikega in panonskega, temveč le pri vrstah *T. cristatus* in *T. karelinii*.

Vsi lokusi so bili visoko polimorfni tako kot v drugih predhodnih raziskavah (Krupa in sod. 2002; Mikuliček in sod. 2007, Maletzky in sod. 2010; Mikuliček in sod. 2012). Določili smo od 10 do 20 različnih alelov na lokus. Vzorci, ki so bili po mtDNA določeni kot osebk velikega pupka, so imeli skupno 57 alelov (povprečno 8,14 alela na lokus), vzorci panonskega pupka pa skupno 82 alelov (povprečno 11,71 alela na lokus). Primerjava med različnimi raziskavami je prikazana v Preglednici 15. Panonski pupek je imel največje število alelov od raziskanih vrst *Triturus* tudi pri drugih raziskavah (Mikuliček in sod. 2007; Mikuliček in sod. 2012). Pri velikem pupku so tudi v drugih raziskavah dobili podobne vrednosti, kot smo jih dobili v naši raziskavi. Pri panonskem pupku pa so bile vrednosti v drugih raziskavah še višje (Mikuliček in sod. 2007; Mikuliček in sod. 2012). Vzrok za to je lahko tudi manjše število vzorcev kot pri ostalih dveh raziskavah ali pa posledica hibridizacije v našem primeru.

**Preglednica 15:** Primerjava števila alelov na lokus z drugimi raziskavami.

<i>Triturus carnifex</i>	Tcri13	Tcri27	Tcri29	Tcri35	Tcri36	Tcri43	Tcri46
<b>Naša raziskava</b>	9	5	8	11	10	8	6
<b>Mikuliček in sod. 2007</b>	9	/	9	9	7	14	6
<b>Mikuliček in sod. 2012</b>	9	/	3	11	7	13	6
<i>Triturus dobrogicus</i>	Tcri13	Tcri27	Tcri29	Tcri35	Tcri36	Tcri43	Tcri46
<b>Naša raziskava</b>	8	11	12	12	16	10	13
<b>Mikuliček in sod. 2007</b>	12	/	18	34	43	40	25
<b>Mikuliček in sod. 2012</b>	13	/	19	36	43	24	25

Rezultati naše raziskave kažejo visoko genetsko diverzitetu panonskega pupka na podlagi jedrne DNA (mikrosatelitnih lokusov), kljub nizki diverziteti mtDNA. Do podobnih rezultatov so prišli tudi v drugih raziskavah z uporabo mikrosatelitnih lokusov in alocimov (Mikuliček in

sod. 2007; Voros in Arntzen 2010; Mikuliček in sod. 2012). Wielstra in sod (2013b) predvidevajo dva možna vzroka za to: visoka genetska diverziteta jedrnih markerjev je morda posledica tega, da ima panonski pupek širšo ekološko nišo kot jo poznamo do zdaj. Druga možnost je, da se je niša panonskega pupka razvila v kratkem časovnem obdobju zaradi prilagoditve okoljskim spremembam.

Opažena heterozigotnost je bila v vseh populacijah manjša od pričakovane. Do podobnih rezultatov so prišli tudi v različnih raziskavah rodu *Triturus* (Maletzky in sod. 2008; Maletzky in sod. 2010; Mikuliček in sod. 2012). Heterozigotnost je pomembno merilo genetske diverzitete. Visoka heterozigotnost pomeni, da je v populaciji velika genetska variabilnost, nizke vrednosti pa kažejo na nizko variabilnost populacij (Frankham in sod. 2009). V naši raziskavi smo opazili največji deficit heterozigotnosti v populaciji 4, ki je v večji meri vsebovala osebke panonskega pupka (2 osebka velikega in 10 osebkov panonskega pupka). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v raziskavi Mikuliček in sod. (2008) in Mikuliček in sod. (2012) kjer je bil opažen največji deficit heterozigotnosti v populacijah panonskega pupka. Deficit heterozigotnosti je bilo opaziti v vseh populacijah, najmanjši deficit je bilo opaziti v populaciji 1, v kateri smo ugotovili najmanjši odstotek hibridizacije. Nizka heterozigotnost je lahko pokazatelj izgube genetske raznolikosti, lahko pa je tudi posledica nultih alelov, to so aleli, ki se tekom PCR reakcije ne pomnožijo (Frankham in sod. 2009; Freeland in sod. 2011). Izguba genetske variabilnosti je značilna za izolirane populacije in za parjenje v sorodstvu (Frankham in sod. 2009). Poleg tega, selekcija v hibridnih cona deluje proti heterozigotom (Maletzky in sod. 2010). Predvidevamo, da so nulti aleli najverjetnejši vzrok zmanjšane heterozigotnosti v naši raziskavi, saj smo s programom Microchecker detektirali nulte alele kar na petih od sedmih lokusov (Lokus Tcri27, Tcri35, Tcri36, Tcri43, in Tcri46). Izrazit deficit heterozigotnosti je bil opažen na lokusih Tcri36, Tcri43 in Tcri46. Deficit heterozigotnosti so opazili tudi Maletzky in sod. (2010), ki so opazili deficit na lokusih Tcri29, Tcri32, Tcri35 in Tcri46.

Dve populaciji od štirih nista bili v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. To sta populaciji 3 in 4. Obe populaciji se nahajata na levem bregu Mure in sta sestavljeni večinoma iz osebkov panonskega pupka. Glede na lokuse je opaziti visoko statistično značilno odstopanje ( $p < 0,01$ ) od H-W ravnotežja pri lokusih Tcri35, Tcri36, Tcri43 in Tcri46. To lahko, prav tako kot deficit heterozigotnosti, pripisujemo nultim alelom na teh lokusih. Odstopanje od H-W ravnotežja so odkrili tudi v drugih raziskav pupkov z uporabo enakih lokusov. V raziskavi Maletzky in sod. (2010) so odkrili statistično značilno odstopanje ( $p < 0,01$ ) v šestih populacijah od trinajstih.

### 4.3 Hibridizacija med panonskim in velikim pupkom

Hibridizacija in introgresija sta pri pupkih iz rodu *Triturus* zaradi njihove sorodnosti pogosta na območjih, kjer se areali dveh ali več vrst stikajo. V Evropi je več znanih hibridnih con med različnimi vrstami pupkov (Arntzen in sod. 2014). V Avstriji sobivajo tri vrste (*T. carnifex*, *T.*

*cristatus* in *T. dobrogicus*), med katerimi prihaja na stičnih območjih do hibridizacije (Wallis in Arntzen leto; Maletzky in sod. 2008; Maletzky in sod. 2010). Hibridizacijo so odkrili na podlagi morfoloških in molekularnih podatkov v več regijah. Na Slovaškem sobivata dve vrsti (*T. cristatus* in *T. dobrogicus*). Z uporabo jedrnih markerjev so Mikuliček in sod. (2012) odkrili hibridne cone med obema vrstama na območju Karpatov v južni Slovaški. Na Češkem sta prisotni dve vrsti (*T. cristatus* in *T. carnifex*). Med obema vrstama prihaja do križanja v južnem delu Češke (Mikuliček in sod. 2012). Prav tako prihaja do introgresije med avtohtono vrsto *T. cristatus* in vneseno vrsto *T. carnifex* na območju Švice (Dufresnes in sod. 2016).

Predhodne morfološke raziskave z uporabo Wolterstorffovega indeksa (Stanković in Delić 2012, Lužnik in sod. 2015), so tudi v Sloveniji pokazale prisotnost hibridizacije med panonskim in velikim pupkom v severovzhodni Sloveniji. Stanković in Delić (2012) sta na območju Dolinskega polja zabeležila dva možna hibrida z uporabo Wolterstorffovega indeksa (vrednosti WI so bile 54,06 pri samcu in 46,39 pri samici) in ostalih morfoloških znakov. Ostalih 13 vzorčenih osebkov je bilo glede na WI določenih kot vrsta panonski pupek. V naši raziskavi nismo vzorčili v bližini Dolinskega polja, najbližja lokacija je Petišovci, kjer smo glede na mtDNA in jedrne markerje določili dva čista osebka panonskega pupka.

Prav tako so že v preteklosti na območju Turjancev ob reki Muri našli populacijo pupkov, ki je imela morfološke značilnosti (RBV in WI) hibridov *T. carnifex* x *T. dobrogicus* oziroma vrste *T. cristatus* (Crnobrnja-Isalović in sod. 1997; Kalezić in sod. 1997). Stanković in Delić (2012) menita, da je prisotnost slednje vrste malo verjetna, glede nato, da je najbližji areal razširjenosti te vrste na severu Avstrije. Menita, da je deviacija v RBV in WI na območju Turjancev posledica hibridizacije med velikim in panonskim pupkom ali pa je posledica intraspecifičnih bioloških variacij. Vas Turjanci je v bližini treh naših vzorčnih lokacij: Radenci, Rihtarovci in Hrastje-Mota. Glede na rezultate mtDNA smo na teh lokacijah našli tako osebke obeh vrst. Glede na analizo mikrosatelitnih lokusov smo na teh lokacijah našli 1 čist osebek velikega pupka, 1 čist osebek panonskega pupka in dva hibridna osebka *T. carnifex* x *T. dobrogicus*.

Na območju Mure so v letu 2013 potekale morfološke (WI indeks) raziskave hibridizacije med panonskim in velikim pupkom (Cipot in sod. 2015; Lužnik in sod. 2015). Meritve so potekale na 112 osebkih iz 9 različnih lokacij. Od tega 6 lokacij in 20 vzorcev sovпада z našimi vzorčnimi lokacijami in vzorci (Preglednica 14). Meritve WI so bile opravljene na 20 istih vzorcih kot naše molekularne raziskave, ostali vzorci so se razlikovali. Morfološka raziskava je pokazala 5 čistih populacij panonskega pupka in 4 hibridne populacije obeh vrst. Nobena populacija se ni izkazala za čisto populacija velikih pupkov (Cipot in sod. 2015). Pri primerjavi 6 lokacij, kjer so bile opravljene tako morfološke kot molekularne analize, prihaja do razhajanj v rezultatih obeh analiz (Preglednica 16). Obe metodi pa sta pokazali, da so na levem bregu v večji meri prisotni panonski pupki ali križanci obeh vrst.

Vrste iz skupine velikih pupkov imajo visoko stopnjo fenotipskih variacij, predvsem v hibridnih conah, zato lahko vodi uporaba morfoloških markerjev do visoke stopnje nepravilne določitve

vrst (Maletzky in sod. 2008). Ugotovili so, da uporaba Wolterstorffovega indeksa vodi do kar 31% napačno določenih osebkov, zato so za pravilno določitev nujno potrebne molekularne raziskave ali štetje vretenc (RBV) (Jehle in sod. 2011).

**Preglednica 16:** Primerjava rezultatov morfoloških in molekularnih metod iz območja Mure. Rezultati WI so povzeti po Lužnik in sod. 2015. Meritve WI niso bile opravljene na enakih vzorcih kot molekularne analize, vendar so opravljene na istem območju. Rezultati mikrosatelitnih lokusov so iz 1. metode programa Structure.

Lokacija	N (WI)	WI	N (DNA)	mtDNA	mikrosateliti
<b>2. Petanjci Tišina</b>	30	<i>dob</i>	4	<i>car, dob</i>	<i>dob, car x dob</i>
<b>3. Tropovci</b>	6	<i>dob</i>	2	<i>dob</i>	<i>car x dob</i>
<b>5. Krog</b>	9	<i>dob</i>	3	<i>dob</i>	<i>dob, car x dob</i>
<b>6. Apače</b>	6	<i>car x dob</i>	1	<i>car</i>	<i>car x dob</i>
<b>7. Petanjci - Zaton</b>	49	<i>dob, car x dob</i>	8	<i>car, dob</i>	<i>car x dob</i>
<b>8. Hrastje - Mota</b>	5	<i>car x dob</i>	2	<i>car</i>	<i>car</i>

V naši raziskavi smo z analizo molekularnih markerjev rezultate predhodnih morfoloških raziskav potrdili. Hibridizacijo smo analizirali po dveh metodah v programu Structure. Pri prvi metodi smo uporabili 7 lokusov in 64 vzorcev iz vzhodne Slovenije, medtem ko smo pri drugi metodi vključili tudi referenčne vzorce starševskih vrst iz območij, kjer ne prihaja do hibridizacije. Metodi sta nam dali nekoliko drugačne rezultate. V obeh metodah je zaznati visoko stopnjo hibridizacije pri vzorčnih osebkih, vendar je ta še bistveno večja pri metodi z uporabo referenčnih vzorcev. Tako smo s prvo metodo določili 6 čistih lokacij od 17 ( $q > 0,8$ ), z drugo metodo pa le 2 čisti lokaciji od 17 ( $q > 0,8$ ) (Preglednica 14). Prav tako je bila razlika v določanju posameznih vzorcev v starševski klaster. Pri prvi metodi je bilo določenih 43 hibridnih osebkov, pri drugi metodi pa se je ta številka povečala na kar 55 osebkov od skupno 64 (Priloga C). Zanimivo je, da je pri drugi metodi bila lokacija Šentjur določena kot mešana populacija obeh vrst. Domnevamo, da je to malo verjetno, saj je lokacija od reke Mure, kjer je kontaktno območje obeh vrst, oddaljena okrog 80 km zračne razdalje.

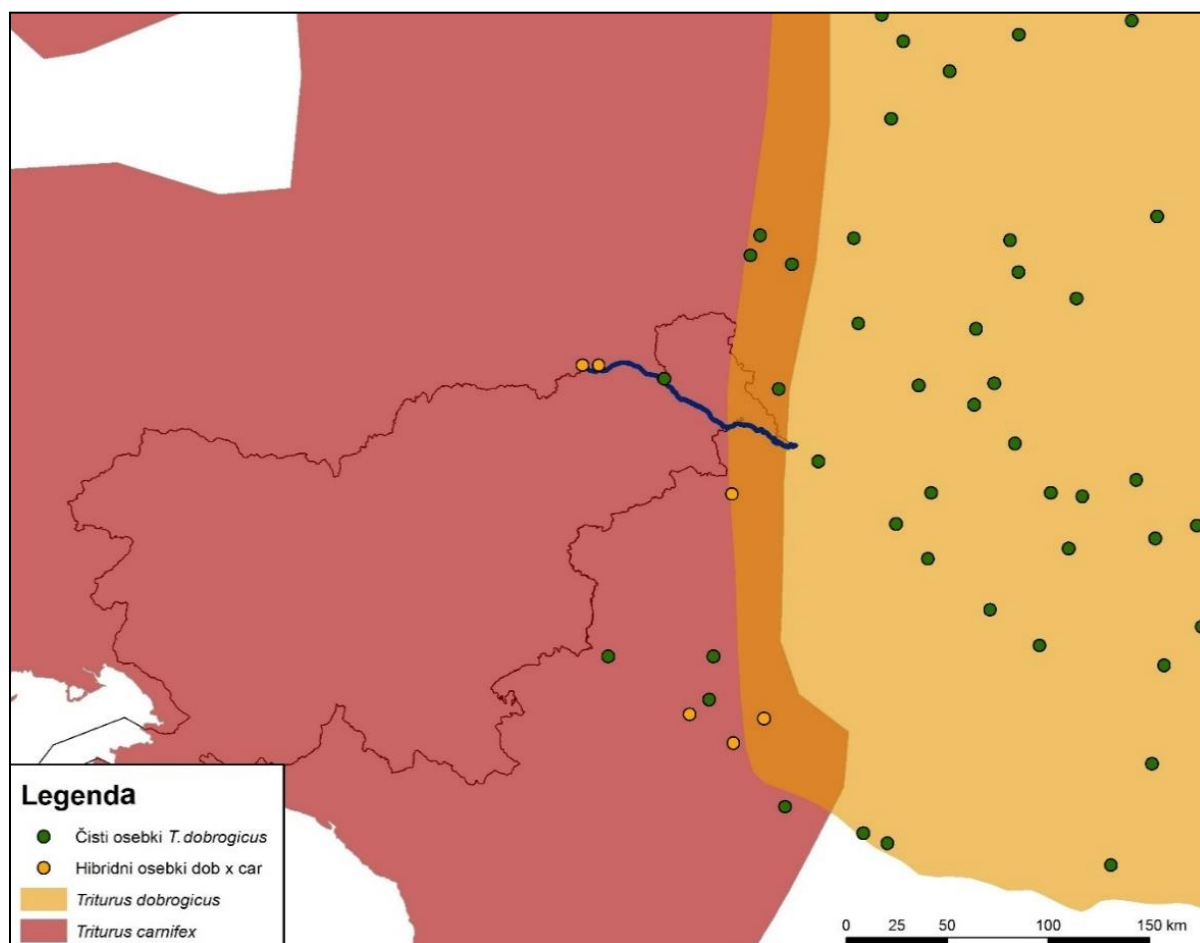
Najverjetneje je razlika v rezultatih med obema metoda posledica uporabe različnega števila lokusov. Pri prvi metodi smo uporabili 7 lokusov, medtem ko smo pri drugi metodi uporabili le 6 lokusov, saj referenčni vzorci panonskega pupka podatkov za ta lokus (Tcr1 43) niso vsebovali podatkov. Ta lokus je bil pri naših vzorcih visoko polimorfen zato smo z njegovo izločitvijo iz analiz izgubili veliko pomembnih podatkov kar je lahko razlog za neskladnost obeh metod. Vaha in Primmer (2006) sta ugotovila, da uporaba referenčnih vzorcev pri analizi hibridizacije ne vpliva bistveno na rezultate. Velik vpliv na pravilno določitev hibridov pa ima število uporabljenih markerjev. Tako je za pravilno določitev hibridov F1 potrebnih 12-24 lokusov, za določitev povratnega križanja pa še veliko večje število lokusov. V našem primeru

pravilnejše rezultate najverjetneje kaže prva metoda, pri kateri smo uporabili 7 lokusov brez referenčnih vzorcev. V naši raziskavi imamo dokaj majhno število uporabljenih lokusov, kar lahko bistveno vpliva na pravilno določitev hibridnih osebkov.

Vzorec TCAR008 je bil po obeh metodah na podlagi mikrosatelitnih markerjev določen kot čist osebek panonskega pupka kljub temu, da je po mtDNA določen kot veliki pupek. Vzorec TCAR088 pa je bil le po prvi metodi določen kot veliki, po mtDNA pa kot panonski pupek. Druga metoda tega ni potrdila in ga je določilo kot mešan osebek obeh vrst. Razhajanje v rezultatih jedrnih in mitohondrijskih markerjev pri teh dveh vzorcih je najverjetneje posledica introgresije mtDNA, ki je značilna za pupke iz rodu *Triturus*. Za mitohondrijsko DNA je značilna introgresija na velike razdalje iz ene vrste v drugo v kontaktnih conah. Do introgresije mtDNA mnogokrat pride v primeru, da na nekem območju ena vrsta zamenja drugo in pride do hibridizacije med obema vrstama. V takšnem primeru se lahko mtDNA asimetrično introgresira iz izključene vrste v vdorno vrsto. V času zadnje ledene dobe je prihajalo do spreminjanja distribucije vrst zaradi njihovega umika pred ledeno kapo proti južnim refugijem. Tako je prišlo na več območjih do stika ozko sorodnih vrst kar je omogočilo introgresijo mtDNA (Wielstra in Arntzen 2012). Prav zaradi tega je v kontaktnih conah nujna uporaba jedrnih markerjev za določitev vrst in za detekcijo hibridizacije (Maletzky in sod. 2008). Tudi Mikuliček in sod. (2012) so našli mtDNA panonskega pupka na območjih Češke, kjer se ta vrsta verjetno nikoli ni pojavljala. Predvidevajo, da je prišlo do introgresije mtDNA v regijah centralne Evrope, kjer je bil kontakt vrst v preteklosti.

V neposredni bližini Slovenije je bilo najdenih že več hibridnih osebkov. Na Hrvaškem je bil najden osebek s značilnostmi med *T. dobrogicus* x *T. carnifex* na območju Varaždina ob reki Dravi. Določen je bil na podlagi morfoloških znakov (Arntzen in sod. 1997). Hibridni osebki so bili najdeni tudi ob reki Muri na meji med Slovenijo in Avstrijo v bližini Šentilja (Herpetofavna.at) (Slika 19). V Sloveniji do zdaj še ni bil najden panonski pupek ali hibridi med obema vrsta izven ožjega območja reke Mure, kljub več obširnimi raziskavam na območju Slovenije (Poboljšaj in Lešnik 2003; Cipot in Lešnik 2007; Cipot in sod. 2011; Lužnik 2013; Mazej Grudnik in Triglav Brežnik 2015). To pa ne pomeni nujno, da panonskega pupka ali hibridov izven območja Mure ni. Odsotnost podatkov za to vrsto je lahko le posledica neuporabe morfoloških indeksov in molekularnih metod pri monitoringu ali pa posledica nepravilnega vzorčenja pupkov (Stanković in Delić 2012).





**Slika 19:** Vzorci panonskega pupka in hibridnih osebkov med velikim in panonskim pupkom na Hrvaškem, Avstriji in Madžarskem. Razširjenost velikega pupka je prikazana z rdečo barvo, panonskega pa z oranžno barvo. Območje prekrivanja areala razširjenosti je obarvano s temnejšo oranžno barvo. Vzorci čistih osebkov panonskega pupka so označeni z zeleno točko, hibridni osebki obeh vrst pa z oranžno točko. Povzeto po Wielstra in sod. 2014; Jelič 2015 in Herpetofauna.at.

Za določitev meje hibridne cone v Sloveniji bi bilo potrebno izvesti dodatno intenzivno in ciljno vzorčenje preko večjega dela vzhodne Slovenije, predvsem ob reki Dravi, kjer bi bilo za pričakovati osebke panonskega pupka ali hibride med obema vrstama glede na bližnje podatke te vrste na hrvaški strani. Analize vseh vzorcev bi morale biti tako morfološke kot tudi molekularne. Nadalje bi bili za uspešno varstvo obeh vrst in njihovih hibridov na tem območju, izjemno pomembni podatki o ekoloških potrebah, saj vrsti poseljujeta različne habitate. Cipot in sod. (2011) predlagajo, da se razišče kakšne habitate poseljujejo hibridi. Hibridi lahko morda poseljujejo le starševske habitate, vmesne ali oboje. To pa vodi v različne upravljalvske načrte za obe vrsti in križance. V končni fazi, ko bo hibridna cona dobro določena, bodo pomembni tudi podatki o številčnosti vrste panonskega pupka in njenih hibridov, predvsem na območju Nature 2000.

## 5 ZAKLJUČEK

Na podlagi dveh molekularnih markerjev smo potrdili prisotnost panonskega pupka (*Triturus dobrogicus*) v severovzhodni Sloveniji vzdolž reke Mure. S tem smo potrdili rezultate predhodno opravljenih morfoloških raziskav (WI indeks) v tem delu Slovenije. Na raziskovanem območju sta se pojavljale obe vrsti, tako veliki kot panonski pupek. Panonski pupek je bil pogosteje najden na levem bregu Mure in dolvodno po reki proti tromeji s Hrvaško in Madžarsko. Na desnem bregu sta bila zabeležena le 2 osebkoma od 38. Vzrok te porazdelitve je po vsej verjetnosti v sami izbiri habitata. Najprimernejši habitati za panonskega pupka so od Veržeja proti tromeji s Hrvaško in Madžarsko, kjer je reka Mura ohranila svoje prvotne značilnosti (meandričen nižinski tok) nižinske reke. Na tem območju so prisotne številne mrtvice, ki predstavljajo ugoden habitat za panonskega pupka. Medtem je bil veliki pupek v večini primerov najden na desnem bregu Mure, na levem bregu se je pojavil le nekajkrat. Na levem bregu ni bilo nobene čiste populacije velikega pupka, le mešane populacije obeh vrst.

Analiza genetske diverzitete je pokazala podobne rezultate kot so bili pridobljeni v drugih raziskavah. Največji deficit heterozigotnosti in odstopanje od H-W ravnotežja je bilo opaziti v populaciji 3 in 4, ki v večji meri vsebuje osebke panonskega pupka. Zmanjšana heterozigotnost je lahko posledica hibridizacije ali prisotnosti nultih alelov, ki smo jih zaznali v raziskavi.

Na podlagi molekularnih markerjev smo ugotovili visoko stopnjo hibridizacije med obema prisotnima vrstama na tem območju (*Triturus carnifex* x *Triturus dobrogicus*). Hibridizacijo smo analizirali po dveh metodah. V prvi metodi smo v analizo vključili samo vzorčene osebke iz območja Mure, medtem ko smo pri drugi metodi dodali še referenčne vzorce. Obe metodi sta pokazale visoko stopnjo hibridizacije, nekoliko večjo stopnjo je pokazala metoda z uporabo referenčnih vzorcev. Pravilnejšo sliko po vsej verjetnosti kaže prva metoda, pri kateri smo uporabili en lokus več, ki ga pri drugi metodi nismo morali uporabiti zaradi pomanjkanja podatkov za ta lokus pri referenčnih vzorcih. Raziskave kažejo na to, da ima število lokusov večji vpliv na rezultate kot uporaba referenčnih vzorcev (Vaha in Primmer 2006).

Prva metoda je tako določila 43 hibridnih osebkov med *T. dobrogicus* x *T. carnifex* in 21 osebkov kot čistih osebkov ene od starševskih skupin. Dve lokaciji sta bili uvrščeni v klaster panonskega (Razkrižje in Petišovci), štiri lokacije pa v klaster velikega pupka (Šentjur, Konjšiče, Radenci in Vučja vas). Ostalih 11 lokacij kaže mešano poreklo obeh vrst. Pri dveh vzorcih se je pokazala introgresija mtDNA, ki je pogost pojav pri ozko sorodnih vrstah kot je skupina velikih pupkov.

Devet osebkov panonskega pupka od 38 je bil določenih kot čistih, ostali so bili določeni kot hibridi obeh vrst. To potrjuje prisotnost čistih osebkov panonskega pupka v Sloveniji. To je pomemben podatek za varovanje obeh vrst v Sloveniji, saj vrsti poseljujeta različne habitate.

Z našo raziskavo smo odpravili mnogo nejasnosti glede prisotnosti panonskega pupka v Sloveniji in hibridizacije med *T. dobrogicus* x *T. carnifex* na območju reke Mure. Kljub temu pa so potrebne raziskave razširjenosti panonskega pupka v celotni vzhodni Sloveniji kot tudi raziskave obsega hibridne cone z molekularnimi markerji. Glede na to, da vrsti poseljujeta drugačne habitate in imata drugačne ekološke zahteve, so potrebne tudi ekološke raziskave panonskega pupka v Sloveniji. Le tako bomo učinkovito varovali in upravljali z obema prisotnima vrsta v Sloveniji kot tudi z njunimi hibridi.

## 6 LITERATURA IN VIRI

- Allenford F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. 2001. The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 613-622.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology*: 215: 403-410.
- Arntzen J.W., Wallis G. 1994. The 'Wolterstorff Index' and its value to the taxonomy of the Crested Newt superspecies. *Abhandlungen und Berichte für Naturkunde* 17: 57-66.
- Arntzen J.W., Bugter R.J.F., Cogalniceanu D., Wallis G.P. 1997. The distribution and conservation status of the Danube crested newt, *Triturus dobrogicus*. *Amphibia-Reptilia* 18: 133-142.
- Arntzen J.W., Espregueira Themudo G., Wielstra B. 2007. The phylogeny of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies): nuclear and mitochondrial genetic characters suggest a hard polytomy, in line with the paleogeography of the centre of origin. *Contributions to Zoology* 76: 261-278.
- Arntzen J.W., Kuzmin S., Jehle R., Denoël M., Anthony B., Miaud C., Babik W., Vogrin M., Tarkhnishvili D., Ishchenko V., Ananjeva N., Orlov N., Tuniyev B., Cogalniceanu D., Kovács T., Kiss I. 2009. *Triturus dobrogicus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (Datum dostopa: 23. 8. 2015).
- Arntzen J.W., Wielstra B., Wallis G.P. 2014. The modality of nine *Triturus* newt hybrid zones assessed with nuclear, mitochondrial and morphological data. *Biological journal of the Linnean society* 13: 604-622.
- Avise J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, second edition. Massachusetts, Sinauer Associates.
- Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Barton N.H., Hewitt G.M. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 113-148.
- Bhargava A., Fuentes F.F. 2009. Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular biotechnology* 44: 250-266.
- Brown T.A. 2007. *Genomes 3*. New York, Garland Science Publishing.

- Brown T.A. 2010. Gene Cloning and DNA Analysis: An introduction, sixth edition. Oxford, John Wiley & Sons.
- Castresana, J. 2001. "Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals". *Molecular Biology and Evolution* 18: 465–471.
- Castro J.A., Picornell A., Ramon M. 1998. Mitochondrial DNA: a toll for populational genetics studies. *International Microbiology* 1: 327-332.
- Chistiakov D.A., Hellemans B., Volckaert F.A.M. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1–29.
- Cipot M., Lešnik A. 2007. Dvoživke Krajinskega parka Goričko: razširjenost, ekologija, varstvo (Življenje okoli nas). Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju.
- Cipot M., Govedič M., Lešnik A., Pobjčaj K., Skaberne B., Sopotnik M., Stanković D. 2011. Vzpostavitev monitoringa velikega pupka (*Triturus carnifex*). Končno poročilo. Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju
- Crnobrnja-Isailović J., Džukić G., Krstić N., Kalezić M.L. 1997. Evolutionary and paleogeographical effects on the distribution of the *Triturus cristatus* superspecies in the central Balkans. *Amphibia-Reptilia* 18: 321-332.
- Direktiva Sveta 92/43/EGS o ohranjanju naravnih habitatov ter prostoživečih živalskih in rastlinskih vrst (OJ L 206, 22. 7. 1992).
- Dufresnes C., Pellet J., Bettinelli-Riccardi S., Thiebaud J., Perrin N., Fumagalli L. 2016. Massive genetic introgression in threatened northern crested newts (*Triturus cristatus*) by invasive congener (*T. carnifex*) in Western Switzerland. *Conservation Genetics* 17: 839-846.
- Esposti M.D., Devries S., Orimi M., Ghelli A. Patarnello T., Meyer A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et biophysica acta* 1143: 243-271.
- 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.
- Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185.

- Ferrière D., Dieckmann U., Couvet D. 2004. *Evolutionary Conservation Biology*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. 2009. *Introduction to conservation genetics*, second edition. Cambridge, Cambridge University Press.
- Freeland J.R., Kirk H., Petersen S.D. 2011. *Molecular ecology*, second edition. Oxford, Wiley-Blackwell.
- Genovart M. 2009. Natural hybridization and conservation. *Biodiversity and conservation* 18: 1435-1439.
- Goudet J. 2001. Fstat (version 2.9.3.2.): A program to estimate and test the gene diversities and fixation indices. Lausanne University, Lausanne, Switzerland.
- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll S.B. 2008. *Introduction to genetic analysis*. New York, W.H. Freeman and Company.
- Earl, D.A., von Holdt B.M. 2012 STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 2: 359-361.
- Hamilton M.B. 2009. *Population genetics*. New York, Blackwell-Wiley.
- Herpetofauna. <https://www.herpetofauna.at/index.php/listeamphibien/9-kategorie-amphibien/12-kammolch-artenkreis-triturus-cristatus-superspezies> (datum dostopa: 15.7.2017)
- Heyer W.R., Donnelly M.A., McDiarmid R.W., Hayek, L.A.C., Foster M.S. 1994. *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians*. Washington & London, Smithsonian Institution.
- Höglund J. 2009. *Evolutionary Conservation Genetics*. Oxford, Oxford University Press.
- Hoshino A.A., Bravo J.P., Macedo N.P., Morelli K.A. 2012. Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. *Genetic Diversity in Microorganisms* 6: 149-170.
- Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C. 1991. Evolution of the Cytochrome b Gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32: 128–144.
- Jehle R., Thiesmeier B., Foster J. 2011 *The crested newt: A dwindling pond-dweller*. Bielefeld, Laurenti-Verlag.
- Jelič D. 2015. Danube crested newt (*Triturus dobrogicus*). Državni zavod za zaščito prirode.

- Kalezić M.L., Džukić G., Mesaroš G., Crnobrnja-Isailović J. 1997. The crested newt (*Triturus cristatus* superspecies) in ex-Yugoslavia: Morphological structuring and distribution patterns. Univ. Thought, Nat. Sci. 4: 39-46.
- Kalia K.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. 2010. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica 177: 309–334.
- Kaligarič in Beltram. 2016. Mura. Proteus 78: 247-257.
- Kikec T. 2007. Reka Mura, skriti biser Evrope ga bomo ohranili? Geografski obzornik 54: 31-37.
- Konvencija o ohranjanju prostoživečega evropskega rastlinstva in živalstva ter njihovih naravnih življenjskih prostorov. 1999. Ur. l. RS 55/99, MP št. 17/99.
- Kopelman N., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N.A., Mayrose I. 2015. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Molecular Ecology Resources 15: 1179-91.
- Krupa A.P., Jehle R., Dawson D.A., Gentle L.K., Gibbs M., Arntzen J.W. Burke T. 2002. Microsatellite loci in the crested newt (*Triturus cristatus*) and their utility in other newt taxa. Conservation Genetics 3: 87-89.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2015. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution.
- Leberg P.L. 2002. Estimating allelic richness: effect of sample size and bottlenecks. Molecular Ecology 11: 2445-2449.
- Librado P., Rozas J. 2009. DnaSp v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 11: 1451-1452.
- Lowe A., Harris S., Ashton P. 2004. Ecological genetics: Design, Analysis and application. Oxford, Blackwell Publishing.
- Lužnik M. 2013. Ohranitveni status velikega (*Triturus carnifex*) in navadnega pupka (*Lissotriton vulgaris*) v sistemu izoliranih Kraških vodni teles. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani.
- Lužnik M., Cipot M., Govedič M., Lešnik A., Rašl D., Buzan E. 2015. Molecular markers confirm presence of Danube crested newt (*Triturus dobrogicus*, Salamandridae) in

- North-Eastern Slovenia. V: Živa Fišer P., Lužnik M., Urzi F. (ur). International workshop: Conservation biology. University of Primorska Press.
- Maletzky A., Mikulicek P., Franzen M., Goldschmid A., Gruber H.J., Horák A., Kyek M. 2008. Hybridization and introgression between two species of crested newts (*Triturus cristatus* and *T. carnifex*) along contact zones in Germany and Austria: morphological and molecular data. *Herpetological Journal* 18: 1-15.
- Maletzky A., Kaiser R., Mikuliček P. 2010. Conservation Genetics of Crested Newt Species *Triturus cristatus* and *T. carnifex* within a Contact Zone in Central Europe: Impact of Interspecific Introgression and Gene Flow. *Diversity* 2: 28-46.
- Marie Curie SPECIATION Network. 2012. What do we need to know about speciation? *Trends Ecol. Evol.* 27: 27–39.
- Mazej Grudnik Z., Brežnik Triglav G. 2015. Vzpostavitev in izvajanje monitoringa velikega pupka (*Triturus carnifex*) v letih 2014 in 2015. Končno poročilo. Erico Velenje.
- Mikuliček P., Crnobrnja-Isailović J., Piálek J. 2007. Can microsatellite markers resolve phylogenetic relationships between closely related crested newt species (*Triturus cristatus* superspecies)? *Amphibia-Reptilia* 28: 467–474.
- Mikuliček P., Horák A., Zavadil V., Kautman J., Piálek J. 2012. Hybridization between three Crested Newt species (*Triturus cristatus* superspecies) in the Czech Republic and Slovakia: comparison of nuclear markers and mitochondrial DNA. *Folia Zoologica* 61: 202–218.
- Mills L.S. 2013. Conservation of wildlife populations: Demography, Genetic and Management, second edition. Oxford., Wiley-Blackwell.
- Oliveira E.J., Padua J.G., Zucchi M.I., Vencovsky R., Vieira M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294–307.
- Oosterhout C.W., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Page D.M.R., Holmes C. E. 2009. *Molecular Evolution: A phylogenetic approach*. Oxford, Blackwell publishing.
- Pavliha G. 2014. Genotipizacija mikrosatelitnih lokusov pri velikem pupku *Triturus carnifex* (Amphibia: Urodela). Zaključna naloga, Univerza na Primorskem.



- Poboljšaj K., Lešnik A. 2003. Strokovna izhodišča za vzpostavljanje omrežja Natura 2000: Dvoživke (Amphibia). Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju.
- Porras-Hurtaso L., Ruiz Y., Santos C., Phillips C., Carracedo A., Lareu M.V. 2013. An overview of STRUCTURE: application, parameters, settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics* 4. DOI: 10.3389/fgene.2013.00098.
- Pritchard J.K.M., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst na rdeči seznam. 2002. Ur.l. RS, 82/02.
- Raymond M. in Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86: 248-249.
- Romano A., Arntzen J.W., Denoël M., Jehle R., Andreone F., Anthony B., Schmidt B., Babik W., Schabetsberger R., Vogrin M., Puky M., Lymberakis P., Isailovic J.C., Ajtic R., Corti C. 2009. *Triturus carnifex*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.2. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (Datum dostopa: 23. 8. 2015).
- Selkoe K.A., Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.
- Stanković D., Deliđ T. 2012. Morphological evidence for the presence of the Danube Crested Newt, *Triturus dobrogicus* (Kiritzescu, 1903), in Slovenia. *Natura Sloveniae* 14: 23-29.
- ThermoFisher: PureLink® Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA <http://www.thermofisher.com/si/en/home/references/protocols.html> (datum dostopa 31.3.2016)
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1997. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Uredba o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah. 2004. Ur. l. RS, 46/2004, 109/2004, 84/2005, 115/2007.
- Vaha J-P., Primmer C.R. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* 15: 63-72.

- Veenvliet P., Kus Veenvliet J. 2008. Dvoživke Slovenije: priročnik za določanje. Grahovo, Zavod Symbiosis.
- Voros J., Arntzen J.W. 2010. Weak population structuring in the Danube crested newt, *Triturus dobrogicus*, inferred from allozymes. *Amphibia – Reptilia* 31: 339-346.
- Voros J., Mikuliček P., Major A., Recuero E., Arntzen J.W. 2016. Phylogeographic analysis reveals northerly refugia for the riverine amphibian *Triturus dobrogicus* (Caudata: Salamandridae). *Biological Journal of the Linnean Society* 4: 974-991.
- Wallis G.P., Arntzen, J.W. 1989. Mitochondrial-DNA variation in the crested newt superspecies: limited cytoplasmic gene flow among species. *Evolution* 43: 88-104.
- Wan Q.H., Wu H., Fujihara T., Fang S.G. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25: 2165–2176.
- Wielstra B., Arntzen J.W. 2011. Unraveling the rapid radiation of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies) using complete mitogenomic sequences. *Evolutionary Biology* 11, 162.
- Wielstra B., Arntzen J.W. 2012. Postglacial species displacement in *Triturus* newts deduced from asymmetrically introgressed mitochondrial DNA and ecological niche models. *BMC Evolutionary Biology* 12: 161. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-12-161>.
- Wielstra B., Litvinchuk S.N., Naumov B., Tzankov N., Arntzen J.W. 2013a. A revised taxonomy of crested newts in the *Triturus karelinii* group (Amphibia: Caudata: Salamandridae), with the description of a new species. *Zootaxa* 3682: 441-453.
- Wielstra B., Crnobrnja-Isailovic J., Litvinchuk SN., Reijnen B.T., Skidmore A.K., Sotiropoulos K., Toxopeus A.G., Tzankov N., Vukov T., Arntzen J.W. 2013b. Tracing glacial refugia of *Triturus* newts based on mitochondrial DNA phylogeography and species distribution modeling. *Frontiers in Zoology* 10: 13.
- Wielstra B., Sillero N., Voros J., Arntzen J.W. 2014. The distribution of the crested and marbled newt species (Amphibia: Salamandridae: *Triturus*) – an addition to the New Atlas of Amphibians and Reptiles of Europe. *Amphibia-Reptila* 35: 376-381.
- Wielstra B. in Arntzen J.W. 2016. Description of a new species of crested newt, previously subsumed in *Triturus ivanbureschi* (Amphibia: Caudata: Salamandridae). *Zootaxa* 4109: 73-80.

Wielstra B., Burke T., Butlin R.K., Schaap O., Shaffer H.B. Vrieling K., Arntzen J.W. 2016. Efficient screening for »genetic pollution« in an anthropogenic crested newt hybrid zone. *Conservation Genetic Resources* 8: 553-560.

Wielstra B., Burke T., Butlin R.K., Avci A., Üzum N., Bozkurt E., Olgun K., Arntzen J.W. 2017. A genomic footprint of hybrid zone movement in crested newts. *Evolution Letters*. doi:10.1002/evl3.9

# PRILOGE

**Priloga A: Koncentracije molekule DNA izračunane iz absorbance izoliranih vzorcev**

<b>Oznaka</b>	<b>260/280</b>	<b>Koncentracija</b>	<b>Oznaka</b>	<b>260/281</b>	<b>Koncentracija</b>
<b>Tcar001</b>	1.74	44.02	<b>Tcar073</b>	1.94	7.38
<b>Tcar002</b>	1.80	22.03	<b>Tcar074</b>	1.56	8.51
<b>Tcar006</b>	1.50	36.37	<b>Tcar075</b>	2.08	5.70
<b>Tcar007</b>	1.60	59.37	<b>Tcar076</b>	1.72	8.94
<b>Tcar008</b>	1.31	54.85	<b>Tcar077</b>	1.75	11.65
<b>Tcar009</b>	1.94	52.82	<b>Tcar078</b>	1.97	63.21
<b>Tcar017</b>	1.36	33.22	<b>Tcar079</b>	1.90	6.62
<b>Tcar018</b>	1.27	42.38	<b>Tcar080</b>	1.80	12.34
<b>Tcar019</b>	1.31	74.60	<b>Tcar081</b>	1.77	11.75
<b>Tcar020</b>	1.44	62.50	<b>Tcar082</b>	1.75	11.50
<b>Tcar021</b>	1.35	97.60	<b>Tcar083</b>	1.88	8.53
<b>Tcar033</b>	1.68	44.27	<b>Tcar084</b>	1.78	12.16
<b>Tcar034</b>	1.61	23.35	<b>Tcar085</b>	1.72	12.76
<b>Tcar035</b>	1.67	43.68	<b>Tcar086</b>	1.76	22.61
<b>Tcar042</b>	1.92	23.96	<b>Tcar087</b>	1.67	11.22
<b>Tcar043</b>	1.85	36.59	<b>Tcar088</b>	1.62	8.70
<b>Tcar044</b>	1.81	22.65	<b>Tcar089</b>	2.83	1.89
<b>Tcar045</b>	1.88	45.13	<b>Tcar090</b>	1.78	8.63
<b>Tcar047</b>	1.44	44.25	<b>Tcar091</b>	1.80	22.03
<b>Tcar048</b>	1.30	29.30	<b>Tcar092</b>	1.85	15.16
<b>Tcar049</b>	1.27	49.18	<b>Tcar093</b>	1.72	14.36
<b>Tcar057</b>	1.86	40.00	<b>Tcar096</b>	1.41	9.00
<b>Tcar058</b>	1.49	50.11	<b>Tcar097</b>	1.97	24.39
<b>Tcar064</b>	1.31	45.15	<b>Tcar098</b>	1.91	27.12
<b>Tcar065</b>	1.36	62.10	<b>Tcar099</b>	1.68	14.37
<b>Tcar066</b>	1.62	10.76	<b>Tcar100</b>	1.65	11.32
<b>Tcar067</b>	1.74	10.50	<b>Tcar101</b>	1.81	12.51
<b>Tcar068</b>	1.80	32.89	<b>Tcar102</b>	1.82	16.50
<b>Tcar069</b>	1.84	47.46	<b>Tcar106</b>	1.64	12.82
<b>Tcar070</b>	1.87	7.59	<b>Tcar107</b>	1.44	6.51
<b>Tcar071</b>	2.00	6.02	<b>Tcar108</b>	1.64	5.04
<b>Tcar072</b>	1.92	5.40	<b>Tcar109</b>	1.95	15.24

**Priloga B: Rezultati vezanega neravnovesja (Linkage disequilibrium)**

<b>Lokus 1</b>		<b>Lokus 2</b>	<b>Chi2</b>	<b>df</b>	<b>P-vrednost</b>
<b>Tcri13</b>	&	<b>Tcri27</b>	3.504.090	6	0.743425
<b>Tcri13</b>	&	<b>Tcri29</b>	8.326.481	8	0.402246
<b>Tcri27</b>	&	<b>Tcri29</b>	11.660.831	6	0.069977
<b>Tcri13</b>	&	<b>Tcri35</b>	0.553939	6	0.997119
<b>Tcri27</b>	&	<b>Tcri35</b>	7.024.711	4	0.134588
<b>Tcri29</b>	&	<b>Tcri35</b>	6.730.906	6	0.346451
<b>Tcri13</b>	&	<b>Tcri36</b>	5.697.531	8	0.681071
<b>Tcri27</b>	&	<b>Tcri36</b>	4.407.792	6	0.621669
<b>Tcri29</b>	&	<b>Tcri36</b>	10.972.711	8	0.203250
<b>Tcri35</b>	&	<b>Tcri36</b>	6.833.527	6	0.336517
<b>Tcri13</b>	&	<b>Tcri43</b>	3.435.931	6	0.752473
<b>Tcri27</b>	&	<b>Tcri43</b>	1.574.000	6	0.954428
<b>Tcri29</b>	&	<b>Tcri43</b>	2.491.396	6	0.869429
<b>Tcri35</b>	&	<b>Tcri43</b>	3.200.266	4	0.524888
<b>Tcri36</b>	&	<b>Tcri43</b>	5.312.275	6	0.504430
<b>Tcri13</b>	&	<b>Tcri46</b>	9.143.596	8	0.330328
<b>Tcri27</b>	&	<b>Tcri46</b>	2.702.768	6	0.845120
<b>Tcri29</b>	&	<b>Tcri46</b>	4.270.633	8	0.831918
<b>Tcri35</b>	&	<b>Tcri46</b>	3.684.914	6	0.719227
<b>Tcri36</b>	&	<b>Tcri46</b>	2.821.622	8	0.945048
<b>Tcri43</b>	&	<b>Tcri46</b>	1.571.732	6	0.954588

**Priloga C:** Rezultati mešanja med *T. dobrogicus* in *T. carnifex* za vsak vzorec. Vzorci, ki so uvrščeni v klaster z verjetnostjo ( $q > 0,8$ ) so krepko označeni. Vzorci, ki so označeni krepko in poševno so uvrščeni v klaster, ki se razlikuje od rezultatov mtDNA.

Zaporedna št.	Vzorec	Lokacija	BREZ REFERENČNIH V.		Z REFERENČNIMI V.		VRSTA (mtDNA)	HAPLOTIP (mtDNA)
			<i>qdob</i>	<i>qcar</i>	<i>qdob</i>	<i>qcar</i>		
1	Tcar001	1	0.590	0.410	0.795	0.205	<i>dob</i>	H1
2	Tcar002	2	0.508	0.492	0.433	0.567	<i>car</i>	H2
3	Tcar006	2	0.760	0.240	0.668	0.332	<i>n/a</i>	N/A
4	Tcar007	2	0.384	0.616	0.492	0.508	<i>dob</i>	H1
5	<b><i>Tcar008</i></b>	2	<b>0.900</b>	0.100	<b>0.835</b>	0.165	<i>car</i>	H3
6	Tcar009	2	0.737	0.263	0.723	0.277	<i>dob</i>	H1
7	Tcar017	3	0.307	0.693	0.590	0.410	<i>dob</i>	H1
8	Tcar018	3	0.635	0.365	0.498	0.502	<i>dob</i>	H1
9	Tcar019	4	0.243	0.757	0.424	0.576	<i>car</i>	H9
10	<b>Tcar020</b>	4	0.149	<b>0.851</b>	0.518	0.482	<i>car</i>	H8
11	<b>Tcar021</b>	4	0.096	<b>0.904</b>	0.412	0.588	<i>car</i>	H8
12	<b>Tcar033</b>	5	<b>0.842</b>	0.158	0.691	0.309	<i>dob</i>	H1
13	Tcar034	5	0.475	0.525	0.652	0.348	<i>dob</i>	H1
14	Tcar035	5	0.393	0.607	0.345	0.655	<i>dob</i>	H1
15	<b>Tcar042</b>	6	0.233	0.767	0.187	<b>0.813</b>	<i>car</i>	H4
16	Tcar043	7	0.786	0.214	0.707	0.293	<i>dob</i>	H1
17	Tcar044	7	0.539	0.461	0.431	0.569	<i>car</i>	H5
18	Tcar045	7	0.347	0.653	0.459	0.541	<i>dob</i>	H1
19	<b>Tcar047</b>	7	0.542	0.458	<b>0.802</b>	0.198	<i>dob</i>	H1
20	Tcar048	7	0.428	0.572	0.534	0.466	<i>dob</i>	H1
21	Tcar049	7	0.492	0.508	0.427	0.573	<i>car</i>	H6

22	Tcar057	7	0.585	0.415	0.552	0.448	<i>dob</i>	H1
23	<b>Tcar058</b>	7	0.756	0.244	<b>0.813</b>	0.187	<i>dob</i>	H1
24	Tcar064	8	0.481	0.519	0.648	0.352	<i>car</i>	H4
25	<b>Tcar065</b>	9	0.719	0.281	<b>0.829</b>	0.171	<i>dob</i>	H1
26	Tcar066	6	0.399	0.601	0.545	0.455	<i>car</i>	H4
27	Tcar067	6	0.219	0.781	0.463	0.537	<i>car</i>	H4
28	Tcar068	6	0.206	0.794	0.482	0.518	<i>car</i>	H3
29	<b>Tcar069</b>	6	0.100	<b>0.900</b>	0.357	0.643	<i>car</i>	H4
30	Tcar070	10	0.395	0.605	0.581	0.419	<i>dob</i>	H1
31	Tcar071	10	0.795	0.205	0.526	0.474	<i>dob</i>	H1
32	Tcar072	10	0.501	0.499	0.539	0.461	<i>car</i>	H4
33	Tcar073	10	0.834	0.166	0.731	0.269	<i>car</i>	H7
34	Tcar074	10	0.683	0.317	0.449	0.551	<i>dob</i>	H1
35	Tcar075	10	0.834	0.166	0.737	0.263	<i>dob</i>	H1
36	Tcar076	10	0.715	0.285	0.644	0.356	<i>dob</i>	H1
37	Tcar077	10	0.720	0.280	0.716	0.284	<i>dob</i>	H1
38	<b>Tcar078</b>	10	<b>0.888</b>	0.112	0.626	0.374	<i>dob</i>	H1
39	Tcar079	10	0.439	0.561	0.587	0.413	<i>dob</i>	H1
40	Tcar080	10	0.303	0.697	0.394	0.606	<i>dob</i>	H1
41	Tcar081	10	0.771	0.229	0.685	0.315	<i>dob</i>	H1
42	<b>Tcar082</b>	11	0.105	<b>0.895</b>	0.412	0.588	<i>car</i>	H3
43	<b>Tcar083</b>	11	0.116	<b>0.884</b>	0.419	0.581	<i>car</i>	H4
44	<b>Tcar084</b>	11	0.148	<b>0.852</b>	0.503	0.497	<i>car</i>	H2
45	<b>Tcar085</b>	11	0.151	<b>0.849</b>	0.312	0.688	<i>car</i>	H4
46	<b>Tcar086</b>	12	<b>0.827</b>	0.173	<b>0.817</b>	0.183	<i>dob</i>	H1
47	<b>Tcar087</b>	12	<b>0.839</b>	0.161	<b>0.884</b>	0.116	<i>dob</i>	H1



<b>48</b>	<b>Tcar088</b>	12	0.187	<b>0.813</b>	0.511	0.489	<i>dob</i>	H1
<b>49</b>	Tcar089	12	0.218	0.782	0.471	0.529	<i>dob</i>	H1
<b>50</b>	Tcar090	12	0.334	0.666	0.527	0.473	<i>dob</i>	H1
<b>51</b>	<b>Tcar091</b>	12	<b>0.831</b>	0.169	0.746	0.254	<i>dob</i>	H1
<b>52</b>	Tcar092	12	0.465	0.535	0.507	0.493	<i>dob</i>	H1
<b>53</b>	Tcar093	12	0.675	0.325	0.571	0.429	<i>car</i>	H8
<b>54</b>	<b>Tcar096</b>	13	<b>0.820</b>	0.180	<b>0.824</b>	0.176	<i>dob</i>	H1
<b>55</b>	<b>Tcar097</b>	13	<b>0.820</b>	0.180	<b>0.824</b>	0.176	<i>dob</i>	H1
<b>56</b>	<b>Tcar098</b>	14	0.122	<b>0.878</b>	0.524	0.476	<i>car</i>	H8
<b>57</b>	<b>Tcar099</b>	15	<b>0.858</b>	0.142	0.574	0.426	<i>dob</i>	H1
<b>58</b>	Tcar100	12	0.535	0.465	0.372	0.628	<i>dob</i>	H1
<b>59</b>	Tcar101	12	0.338	0.662	0.590	0.410	<i>dob</i>	H1
<b>60</b>	Tcar102	12	0.254	0.746	0.492	0.508	<i>car</i>	H1
<b>61</b>	Tcar106	16	0.531	0.469	0.620	0.380	<i>car</i>	H3
<b>62</b>	<b>Tcar107</b>	8	0.129	<b>0.871</b>	0.380	0.620	<i>car</i>	H4
<b>63</b>	<b>Tcar108</b>	17	0.173	<b>0.827</b>	0.364	0.636	<i>car</i>	H4
<b>64</b>	<b>Tcar109</b>	17	0.105	<b>0.895</b>	0.368	0.632	<i>car</i>	H4