

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

POPULACIJSKA STRUKTURA INVAZIVNEGA
JAPONSKEGA KOMARJA *Aedes japonicus japonicus*
(DIPTERA: CULICIDAE) V SLOVENIJI

URŠKA GERIČ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

Populacijska struktura invazivnega japonskega komarja *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) v Sloveniji

(Population structure of invasive Asian bush mosquito *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Slovenia)

Ime in priimek: Urška Gerič
Študijski program: Bioinformatika
Mentor: izr. prof. dr. Elena Bužan
Somentor: asist. Katja Kalan

Koper, avgust 2018

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Urška GERIČ

Naslov zaključne naloge: Populacijska struktura invazivnega japonskega komarja *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) v Sloveniji

Kraj: Koper

Leto: 2018

Število listov: 40

Število slik: 15

Število tabel: 8

Število prilog: 1

Št. strani prilog: 7

Število referenc: 66

Mentor: izr. prof. dr. Elena Bužan

Somentor: asist. Katja Kalan

Ključne besede: japonski komar, Slovenija, genotipiziranje, mikrosatelitni lokusi

Izvleček:

Japonski komar, *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae), je invazivna vrsta komarjev, ki izvira iz Azije. V Sloveniji je bil prvič odkrit leta 2011 v okolici Maribora, v le nekaj letih pa se je razširil po skoraj celotni državi. Zaradi nerazjasnjene poti vnosa vrste v Slovenijo, načina njenega širjenja ter izredno hitrega širjenja po državi smo želeli preučiti genetsko populacijsko strukturo japonskega komarja v Sloveniji. Raziskava je potekala v laboratoriju za molekularno ekologijo Fakultete za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije Univerze na Primorskem. Raziskovalna metoda je temeljila na genotipiziranju sedmih mikrosatelitnih lokusov japonskega komarja. DNA smo izolirali iz 180-ih ličink četrte razvojne stopnje, ki so bile nabrane v okviru popisa tujerodnih vrst komarjev v letu 2015 v celi Sloveniji. Z genotipizacijo smo dobili podatke o dolžini alelov. Te smo analizirali s prosto dostopnimi računalniškimi programi, ki podatke obdelajo z različnimi matematično-statističnimi algoritmi. Za analizo populacijske strukture smo uporabili naslednje parametre: fiksacijske indekse (F_{IT} , F_{IS} in F_{ST}), opaženo in pričakovano heterozigotnost, Hardy-Weinbergov test, Nei-jevo genetsko razdaljo, število alelov in bogastvo alelov. Naredili smo tudi sliko populacijske strukture, ki smo jo prikazali v prostoru. Ključne ugotovitve so pokazale, da se genetska diverziteteta vzdolž širjenja populacij počasi izgublja, vendar pa so populacije vseeno genetsko strukturirane. Japonski komar je prenašalec veliko patogenih organizmov, zato je poznavanje njene populacijske strukture izrednega pomena. To so namreč ključni podatki, ki nam pomagajo pri zatiranju eventuelnega izbruha bolezni.

Key words documentation

Name and SURNAME: Urška GERIČ

Title of the final project paper: Population structure of invasive Japanese mosquito *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Slovenia

Place: Koper

Year: 2018

Number of pages: 40

Number of figures: 16

Number of tables: 8

Number of appendix: 1

Number of appendix pages: 7

Number of references: 66

Mentor: Assoc. Prof. Elena Bužan, PhD

Co-Mentor: Assist. Katja Kalan

Key words: Asian bush mosquito, Slovenia, population structure genotyping, microsatellites loci

Abstract:

The bush mosquito, *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae), is an invasive mosquito species, originally native to Asia. In Slovenia, it was first discovered in 2011, near the city of Maribor, and only in a few years it spread throughout the whole country. Due to unexplained introduction pathway of the species in Slovenia, its way of colonisation and its very fast spreading in almost the entire country, we have examined the genetic population structure of this invasive mosquito in Slovenia. The research took place in the laboratory for molecular ecology at the Faculty of Mathematics, Natural Sciences and Information Technologies of the University of Primorska. The research method was based on genotyping seven microsatellite loci of 180 fourth instar larvae of Asian bush mosquito. The larvae were caught in the population monitoring of alien mosquito species in 2015, throughout Slovenia. By genotyping we gained the data on the length of alleles. These were analysed by freely accessible computer programmes, which process data by various mathematical-statistical algorithms. For the analysis of the population structure we used different parameters, as follows: fixation indexes (F_{IT} , F_{IS} and F_{ST}), the observed and expected heterozygosity, Hardy-Weinberg test, Nei's genetic distance, number of alleles and the allelic richness. We also created figure of the population structure, shown on the map. The key findings showed that the genetic diversity is slowly decreasing along the dispersal pathway. Nevertheless the populations are genetically structured and rather stable. Asian bush mosquitoes is a vector of various pathogens, therefore the knowledge of its population structure is of significant importance. These data are crucial in exterminating the diseases.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Eleni Bužan za vso spodbudo, podporo in pomoč pri izdelavi zaključne naloge tekom celotnega študija.

Iskreno se zahvaljujem somentorici asist.. Katji Kalan za pomoč pri laboratorijskem delu, pri izdelavi zaključne naloge in predvsem hiter in temeljit pregled naloge.

Zahvala gre tudi koordinatorju dr. Petru Roglju za vso pomoč in spodbudo tekom študija in v zaključnih fazah študija.

Zahvala gre tudi profesoricama iz gimnazije Marti Lukanec in Sonji Artač za pomoč in podporo pri iskanju primerne študija in spodbudo tekom študija.

Hvala prijateljicama Marini in Juliji in sošolcem Katji, Damjanu in Martinu za podporo in spodbudo pri študiju in za nasvete pri zaključni nalogi.

Nazadnje pa gre posebna zahvala očetu Rajku, mami Nataši, bratoma Jaki in Maticu in partnerju Vedranu za razumevanje, vzpodbudo in pomoč pri slovničnem pregledu zaključne naloge.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Pregled objav	2
1.1.1	Japonski komar <i>Aedes japonicus japonicus</i> (Theobald, 1901).....	2
1.1.2	Populacijska struktura vrst	4
1.1.2.1	Genetska variabilnost vrst.....	4
1.1.2.2	Mikrosateliti.....	5
1.1.2.3	Parametri populacijske genetike	7
1.2.3	Računalniški programi za analizo populacijske strukture	12
1.2.3.1	GenAIEx	12
1.2.3.3	Mikrochecker.....	12
1.2.3.4	Genepop.....	12
1.2.3.5	Genetix	13
1.2.3.6	FSTAT	13
1.2.3.7	STRUCTURE.....	13
1.2.3.8	Structure Harvester	14
1.2.3.9	CLUMPP	14
1.2.3.10	Distruct	15
1.2.3.11	BAPS	15
2	METODE DELA	16
2.1	Molekularne metode	17
2.1.1	Izolacija DNA.....	17
2.1.2	Pomnoževanje določenih fragmentov s pomočjo PCR reakcije.....	17
2.1.3	Fragmentna analiza.....	19
2.1.3.1	Obdelava rezultatov frgmentne analize	21
2.2	Statistične metode.....	21
2.2.1	GenAIEx	22
2.2.2	FreeNA	22
2.2.3	Mikrochecker.....	22
2.2.4.	Genepop.....	22
2.2.5	Genetix	22
2.2.6	FSTAT	22
2.2.7	STRUCTURE.....	22
2.2.8	Structure Harvester	23
2.2.9	CLUMPP	23
2.2.10	Distruct	23
2.2.11	BAPS	23
3	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	24

3.1	Ničelni aleli	24
3.2	Parametri populacijske strukture	25
3.3	HW test heterozigotnosti	26
3.4	Pričakovana in opažena heterozigotnost.....	26
3.5	Fiksacijski indeksi	27
3.5.1	F _{IS}	27
3.6	Bogastvo alelov	28
3.7	Genetska razdalja.....	29
3.7	Populacijska struktura.....	30
3.8	Populacijska struktura v prostoru	32
4	ZAKLJUČKI	34
5	LITERATURA IN VIRI.....	36

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uvrstitev japonskega komarja v sistem (ADW – Animal Diversity Web). 2	
Preglednica 2: Podatki o lokacijah vzorčenja ličink <i>Ae. j. japonicus</i> 16	
Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi za mikrosatelite japonskega komarja (Zielke sod. 2014)..... 18	
Preglednica 4: Povprečne verjetnosti prisotnosti ničelnih alelov glede na lokuse v programih FreeNA, Mikrochecker, Genepop. Rumeno je označen lokus, pri katerem obstaja verjetnost pojava ničelega alela. 24	
Preglednica 5: Povprečne verjetnosti prisotnosti ničelnih alelov glede na lokuse v programih FreeNA, Mikrochecker, Genepop. Rumeno je označen lokus, pri katerem obstaja verjetnost pojava ničelega alela. 25	
Preglednica 6: V spodnji preglednici so zbrani rezultati za a) N – število vzorcev, b) He – pričakovana heterozigotnost, c) Ho – opažena heterozigotnost, d) HW – Hardy-Weinbergovo ravnotežje (p-vrednosti), e) Fis – koeficient parjenja v sorodstvu, f) NA – število alelov, g) AR – bogastvo alelov za posamezno populacijo japonskega komarja. Zelena barva prikazuje populacije, pri katerih je He večja od Ho, rumena barva pa prikazuje populacijo, ki odstopa od HW ravnotežja. Poudarjen Fis prikazuje populacije pri katerih ni prisotno parjenje v sorodstvu..... 26	
Preglednica 7: F_{ST} med populacijami. Rumeno je označen najvišji F_{ST} , zeleno je označeno najnižji F_{ST} 28	
Preglednica 8: Q vrednosti za $K = 2$, ki nam nakazujejo kateremu klastru pripada posamezna populacija. Podatki so pridobljeni s programom STRUCTURE 2.3.4..... 32	

KAZALO SLIK IN GRAFIKONOV

Slika 1: Trenutna razširitev japonskega komarja v Evropi, podatki za junij 2018. (ECDC, 2018).....	3
Slika 2: Prikaz nastanka mikrosatelita (Štajner, 2010).....	6
Slika 3: Prikaz pojava ničelnega alela na naših vzorcih.....	8
Slika 4: Razmerje med fiksacijskimi indeksi.....	10
Slika 5: Prikazuje potek poravnave v ozadju programa Clumpp.....	14
Slika 6: Prikaz lokacij vzorčenja na zemljevidu Slovenije.....	17
Slika 7: Primer homozigotnega organizma.....	20
Slika 8: Primer heterozigotnega organizma.....	20
Slika 9: Razmerje med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo.....	27
Slika 10: Genetska razdalja na podlagi Nei-jeve genetske razdalje med posameznimi osebk. Os x ima varianco 7,21% in os y ima varianco 5,38%.....	29
Slika 11: Genetska razdalja na podlagi Nei-jeve genetske razdalje med populacijami. Os x ima varianco 25,46% in os y ima varianco 13,52%.	29
Slika 12: Slika populacijske strukture iz programa Distruct. Modra = genotip 1 in rdeča = genotip 2.	30
Slika 13: Prikaz PCoA med populacijami (označene s številko) v programu GenAIEx 6.5.: 1 – Bohinjska Bela, 2 – Bistrica on Sotli, 3 – Črna na Koroškem, 4 – Grosuplje, 5 – Hodoš, 6 – Ilirska Bistrica, 7 - Idrija, 8 – Kočevje, 9 – Lendava, 10 – Ptuj, 11 – Slovenska Bistrica, 12 – Šentilj, 13 – Solčava, 14 – Vransko.....	31
Slika 14: Slika populacijske strukture v programu BAPS6. 1 – Bohinjska Bela, 2 – Bistrica on Sotli, 3 – Črna na Koroškem, 4 – Grosuplje, 5 – Hodoš, 6 – Ilirska Bistrica, 7 - Idrija, 8 – Kočevje, 9 – Lendava, 10 – Ptuj, 11 – Slovenska Bistrica, 12 – Šentilj, 13 – Solčava, 14 - Vransko.....	33
Slika 15: Slika populacijske strukture prostoru v programu BAPS6. 1 – Bohinjska Bela, 2 – Bistrica on Sotli, 3 – Črna na Koroškem, 4 – Grosuplje, 5 – Hodoš, 6 – Ilirska Bistrica, 7 - Idrija, 8 – Kočevje, 9 – Lendava, 10 – Ptuj, 11 – Slovenska Bistrica, 12 – Šentilj, 13 – Solčava, 14 - Vransko.....	33

KAZALO PRILOG

Priloga A: Zaokrožene dolžine mikrosatelitnih lokusov

SEZNAM KRATIC

- AFC – analiza faktorske korespondence (angl. factorial correspondence analysis)
AR – bogastvo alelov (angl. allelic richness)
ddH₂O – dvojno destilirana voda brez prisotnosti RNA in DNA
DNA - deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
EM – pričakovan maksimum (angl. expectation maximum)
F_{IS} – koeficient parjenja v sorodstvu (angl. inbreeding coefficient)
F_{IT} – populacijski fiksacijski indeks
F_{ST} – fiksacijski indeks (angl. fixation index)
H – heterozigotnost
HW – Hardy-Weinbergovo ravnotežje
He – pričakovana heterozigotnost (angl. expected heterozygosity)
Ho – opažena heterozigotnost (angl. observed heterozygosity)
K – klaster
MCMC – metoda markovske verige (angl. Monte Carlo Chain Method)
NA – število alelov (angl. number of alleles)
PCoA – analiza glavnih koordinat (angl. principal coordinate analysis)
PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
Pop – populacija / populacije
RNA – ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
STR – kratke tandemske ponovitve (angl. short tandem repeats)
WHO – svetovna zdravstvena organizacija (angl. World health organisation)

1 UVOD

Komarji veljajo za najsmrtonosnejše živali na svetu, saj prenašajo mnoge patogene organizme, ki povzročajo huda obolenja pri ljudeh (WHO, 2018). Posebno grožnjo za javno zdravje nedvomno predstavljajo invazivni tujerodni komarji. Med te spada med drugimi tudi japonski komar, *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901), vrsta, ki se hitro širi po svetu (Kaufmann in Fonseca., 2014). V Evropi je bil prvič zabeležen v Franciji leta 2000 (Schaffer in sod., 2003), v Sloveniji pa leta 2011 (Seidel in sod., 2012). V Evropi so do sedaj opisali šest populacij japonskega komarja, ki večinoma kažejo visoko heterozigotnost in genetsko diverziteto. Mednje spada tudi slovenska populacija (Zielke in sod., 2015). Z analizami populacijske strukture so v Evropi do sedaj odkrili dva genotipa in devet haplotipov japonskega komarja. To naj bi nakazovalo dve različni poti širjenja v Evropo. V raziskavo Zielke in sod. (2015) so bili vključeni tudi japonski komarji iz Slovenije, vendar pa takrat niso zajeli populacij po vsej Sloveniji, zato populacijska struktura na ravni države pred pričetkom tega dela ni bila popolnoma jasna.

Pot širitve japonskega komarja v Slovenijo še ni povsem znana (Kalan in sod., 2017), zato smo z zaključno nalogo želeli analizirati populacijsko strukturo slovenskih populacij. Pred pričetkom dela smo si zastavili naslednji hipotezi:

H1 - genetska pestrost japonskega komarja v Sloveniji upada v smeri širjenja

H2 - populacije japonskega komarja v Sloveniji so genetsko strukturirane

CILJI NALOGE:

1. Spoznati se z delom v laboratoriju in osnovnimi genetskimi metodami (izolacija DNA, PCR, fragmentna analiza...)
2. Naučiti se tehnik (programov), ki se uporabljajo pri fragmentih analizah
3. Narediti podrobno statistično analizo populacijske strukture japonskega komarja v Sloveniji

1.1 Pregled objav

1.1.1 Japonski komar *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901)

Taksonomija japonskega komarja

Znanstveno ime: *Aedes japonicus japonicus*

Poljudno angl. ime: Asian bush mosquito ali Asian rock pool mosquito

Poljudno slovensko ime: japonski komar

Druga imena oz. sinonimi: *Ochlerotatus japonicus japonicus* in *Hulecoeteomyia japonica japonica*

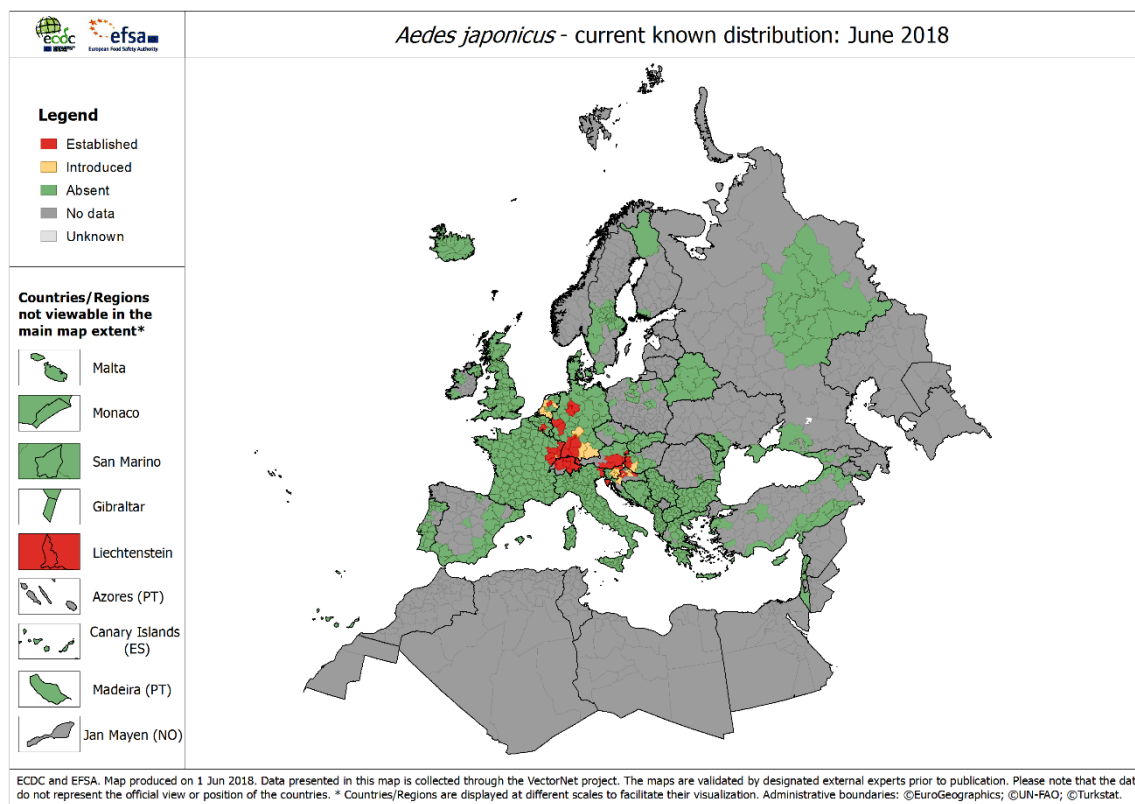
Preglednica 1: Uvrstitev japonskega komarja v sistem (ADW – Animal Diversity Web).

Kraljestvo	Animalia
Deblo	Arthropoda
Razred	Insecta
Red	Diptera
Družina	Culicidae
Rod	<i>Aedes</i>
Podrod	<i>Finlaya</i>
Vrsta	<i>japonicus</i>
Podvrsta	<i>japonicus japonicus</i>

Japonski komar, *Aedes japonicus japonicus*, izvira iz vzhodne Azije, natančneje iz Japonske, Koreje in njenih otokov (Tanaka in sod., 1979). Prva najdba japonskega komarja izven svojega izvornega območja prihaja iz Nove Zelandije iz leta 1993 (Laird in sod., 1994), vendar so uspeli omejiti njegovo širjenje (Derraik, 2004). Leta 1998 se je prvič pojavil v Združenih državah Amerike (Peyton in sod., 1999), kjer se je do danes razširil v kar 33 držav (Kaufmann in Fonseca, 2014) in celo v južno Kanado (Thielman in Hunter, 2016).

V Evropi so ga prvič zasledili okoli leta 2000 v Franciji (Schaffner in sod., 2003), in kasneje še leta 2002 v Belgiji (Versteirt in sod., 2009). V tistem času znanstveniki na to vrsto niso dali posebnega poudarka, saj jim ga je uspelo delno iztrebiti (Schaffner in sod., 2009). Leta 2013 so ga ponovno zasledili v Franciji (Krebs in sod., 2013) in v večjem delu Nemčije (Zielke in sod., 2015) in tako so začeli s podrobnejšimi študijami širjenja vrste. Do sedaj so opisali populacije v Švici (Schaffner in sod., 2009), Avstriji (Seidel in sod., 2012), Nemčiji (Kampen in sod., 2012), Franciji, Belgiji na Nizozemskem (Ibanez-Justica in sod., 2014), v Lihtenštajnu in na Madžarskem (Seidel in sod., 2016a), v Italiji (Seidel in sod., 2016b) in na Hrvaškem (ECDC, 2018). Trenutno razširjenost v Evropi prikazuje Slika 1. V Sloveniji so vrsto prvič zasledili leta 2011 v okolici Maribora, blizu avstrijske meje (Seidel in sod., 2012). Leta 2013 in 2015 so Kalan in sod.(2017) popisovali pojavljanje japonskega komarja v

Sloveniji. Ugotovili so, da se je populacija japonskega komarja širila od severovzhoda države proti jugovzhodu.



Slika 1: Trenutna razširitev japonskega komarja v Evropi, podatki za junij 2018. (ECDC, 2018).

Na izvornem območju v Aziji se japonski komar razmnožuje od spomladi pa vse do jeseni in svoja jajčeca odlaga v luknjice dreves, kamor se steka voda. Odloži jih tik nad vodno gladino in ko ta naraste in prekrije jajčeca, se iz njih izležejo ličinke. V kolikor se to ne zgodi, so jajčeca odporna na izsuševanje in nizke temperature, zato lahko preživijo do naslednje sezone (Tanaka in sod., 1979). Naravni habitat japonskega komarja je gozd, vendar pa se je zaradi vpliva človeka in ugodnih življenjskih razmer naselil tudi v območja večjih naselij. Tam svoja jajčeca najpogosteje odlaga v cvetlične lončke, vaze, zalivalke in druge manjše vodne zadrževalnike na vrtovih in pokopališčih. Zelo ugoden prostor so tudi rabljene pnevmatike, saj se v njih zlahka nabere voda (Beier in sod. 1983). Prav s transportom pnevmatik, v katerih so jajčeca japonskega komarja, se ta vrsta širi na dolge razdalje in naj bi tako prišla v Ameriko in kasneje v Evropo (Sardelis in Turell 2001, Schaffner in sod., 2003). Na krajše razdalje se vrsta širi s transportom odraslih osebkov v avtomobilih in drugih prevoznih sredstvih. Odrasel komar povprečno preleti radij 500 metrov, kar predstavlja radij manjšega mesta, če pa ne najde žrtve pa lahko leti tudi do nekaj kilometrov.

Japonski komar ni glavni prenašalec nobenega patogenega organizma, nevarnega za ljudi. Kljub temu pa je potencialno prenašalec naslednjih arbovirusov: virus japonskega encefalitisa in virus zahodnega Nila. Laboratorijske študije so pokazale, da lahko prenaša tudi virus vzhodnega konjskega encefalitisa kopitarjev, La Crosse virus, viruse denga, virus čikungunja, virus vzhodnoafriškega jarka, in virus encefalitisa St. Luis (ECDC, 2018).

1.1.2 Populacijska struktura vrst

Preučevanje populacijske strukture temelji na ugotavljanju heterozigotnosti prisotne v populaciji in na Fisherjevi statistiki. Te podatke pridobimo iz dolžin mikrosatelitov. S pomočjo analize populacijske strukture ugotavljamo, ali je populacija stabilna, ali pa je prisotno parjenje v sorodstvu (angl. inbreeding). (Kryštufek, 1999). Izrazi in potek analize populacijske strukture so navedeni v nadaljnjem besedilu.

1.1.2.1 Genetska variabilnost vrst

Molekula DNA je nosilka genetske informacije vseh živih bitij. Genetska informacija je pri vsakem posamezniku edinstvena in nam pove njegovo barvo, velikost, vedenje. Gen je zaporedje DNA, ki kodira RNA ali protein, ki določata lastnosti osebkov. Mestu, kjer je gen nameščen, pravimo lokus. Kromosom je sestavljen iz dveh kromatid, eno podedujemo od matere, eno pa od očeta in zato imamo dva zapisa, ki sta lahko identična ali pa ne. Gen tako lahko nastopi v različnih oblikah, ki jih imenujemo aleli, in ti povečujejo genetsko raznolikost, saj povzročijo različne fenotipske lastnosti med osebki. Set alelov na določenem lokusu pri posameznem osebku je genotip osebka. Fenotip pa je izražen genotip kot neka lastnost, npr. morfološki ali biokemijski znaki, vedenje osebka.

Genetska variabilnost oz. genetska diverziteteta je raznolikost osebkov na genetski ravni. To pomeni, da je to mera raznolikosti genotipov osebkov v neki populaciji. Ta je ključna za vsa živa bitja, saj se tako lahko prilagajajo na spreminjajoče življenjske razmere v njihovem okolju. Variabilnost jim omogoča preživetje v stalno se spreminjajočem okolju, kar pa je pomembno za prilagajanje vrst skozi generacije. Velike učinkovite populacije, ki se uspešno parijo in imajo zdrave potomce, so zelo pomembne za ohranjanje genetske pestrosti. Učinkovna populacija je tista, ki ima dovolj osebkov, ki se uspešno parijo in imajo plodne potomce. Pri tem upoštevamo, da je taka populacija dovolj velika in pestra, da ne prihaja do parjenja v sorodstvu (Kryštufek, 1999).

Poznamo tri ravni genetske variabilnosti:

- Variabilnost osebka
- Variabilnost populacije
- Variabilnost med populacijami

Variabilnost osebkov

Vsak osebek, ki ima za vsak lokus dva alela, je diploiden osebek. Lokus je monomorfen, ko sta alela pri vseh osebkih v populaciji enaka, in polimorfen, kadar sta različna. Monomorfen lokus je vedno homozigoten, medtem ko je polimorfen lahko heterozigoten ali pa homozigoten. Homozigoten je takrat, ko sta alela enaka in heterozigoten je takrat, ko sta alela različna. Če ima populacija veliko heterozigotnih osebkov, ima veliko genetsko diverziteto in je zato bolj stabilna (Hughes in sod., 2008).

Variabilnost populacije

Število genetskih diverzitet posameznih osebkov predstavlja genetsko raznolikost znotraj populacije. Določimo jo s številom alelov in frekvenco njihovega ponavljanja. Genetski sklad je celoten nabor alelov v populaciji.

Genetska raznolikost populacije se stalno spreminja, saj na populacijo stalno delujejo selekcijski pritiski iz okolja. Ti so: a) migracije, kjer se zmanjša ali poveča genski pretok (angl. gene flow), b) genetski zdrs (angl. genetic drift), ki se pojavi, ko en alel absolutno prevlada in se zato drugi alel eliminira, c) mutacije, ki so dedne spremembe v molekuli DNA, d) parjenje v sorodstvu (angl. inbreeding), ki povzroči homozigotnost in s tem kopičenje škodljivih recesivnih genov. Genetska raznolikost je višja pri populacijah, ki imajo za isti lokus večje število alelov in pri katerih so aleli enakomerneje razporejeni (Hughes in sod., 2008).

Variabilnost med populacijami

Variabilnost med populacijami nam poda celotno genetsko diverziteto vrste. Ta je sestavljena iz povprečne genetske raznolikosti posamezne populacije in povprečne divergencije med populacijami določene vrste. Če se vrsta uspešno širi, je genetska diverziteta med populacijami manjša kot znotraj populacije, saj med populacijami poteka uspešno razmnoževanje (Hughes in sod., 2008).

1.1.2.2 Mikrosateliti

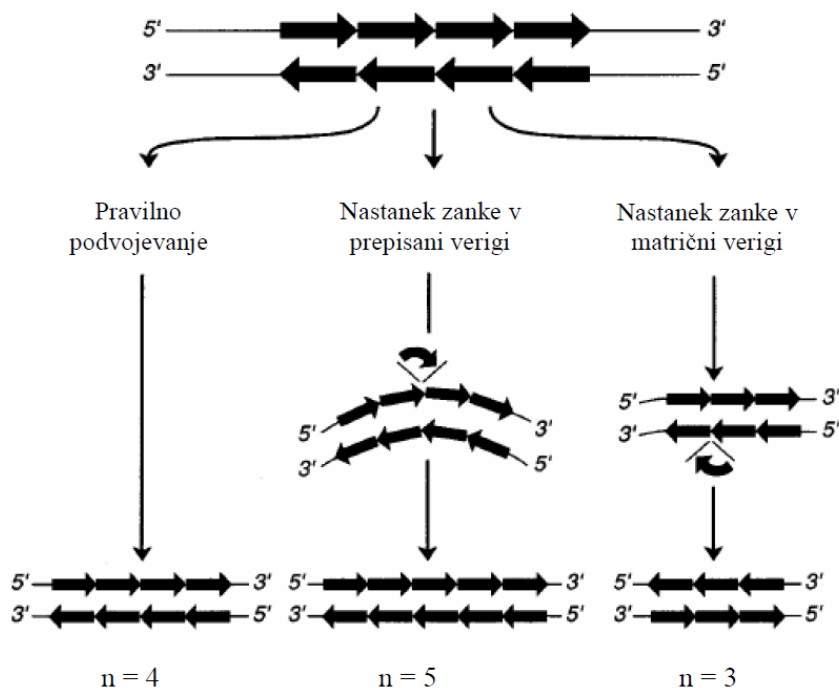
Mikrosateliti ali STR (angl. short tandem repeats) so kratke in enostavne tandemske ponovitve zaporedja DNA, ki so prisotne vzdolž celotnega genoma organizmov. Najpogosteje so to nekodirajoči deli genoma in zato so v genomu zelo pogosto prisotni (tudi do 1000 mest). Zaradi različnega števila ponovitev motiva, kar je posledica številnih mutacij, so te regije visoko polimorfne. Mikrosateliti so sestavljeni iz zaporednih ponovitev motiva dolgih od enega do šestih baznih parov in obrobni regij. Obrobne regije so za razliko od motivov zelo ohranjene regije in zato nanje lahko nalegamo začetne oligonukleotide za pomnoževanje mikrosatelitnih regij. Ponavljajoči se motivi mikrosatelita se ponovijo od pet do 50-krat in zaradi tega se na teh mestih kopičijo mutacije, predvsem insercije in delecije. Zaradi velikega števila mutacij so torej te regije visoko polimorfne in pomembne za

določanje genetske diverzitete vrst. Pri mikrosatelitih je težko določiti mutacijsko stopnjo, saj se ta spreminja med lokusi, aleli in vrstami. Mikrosateliti, ki imajo večje število ponovitev, imajo več možnosti za kopičenje mutacij, saj je večja verjetnost, da pride do zdrsa verig, to pa pripelje do večjega polimorfizma daljših verig (Štajner, 2010).

Mikrosatelite delimo na:

- Popolne: ti so sestavljeni iz enega ponavljajočega se motiva brez prekinitve
Npr. GTGTGTGTGTGTGTGTGTG
- Nepopolne: ponavljajoči se motiv je prekinjen s parom baz, ki nista del motiva
Npr. GTGTGTGTGTCAGTGTGTG
- Prekinjene: ponavljajoči se motiv vsebuje krajše zaporedje, ki ni del motiva
Npr. GTGTGTGTGTAAAAAGTGT
- Sestavljene: mikrosatelit je sestavljen iz dveh ali več različnih ponavljajočih se motivov
Npr. GTGTGTGTGTACGACGACG

Med mejozo, kjer se kromosomi podvajajo, lahko pride do številnih napak. Lahko se zgodi, da nastane zanka v prepisani verigi in tako pride do insercije in s tem se veriga podaljša. Lahko pa pride do nastanka zanke v matrični verigi in pride do delecije, kjer se veriga skrajša. Podrobnejši mehanizem je prikazan na spodnji sliki (Štajner, 2010).



Slika 2: Prikaz nastanka mikrosatelita (Štajner, 2010).

Mikrosateliti služijo kot kodominantni DNA markerji in se na široko uporabljajo v populacijski in evolucijski genetiki ter za forenzične preiskave. Zaradi kopičenja velikega števila mutacij ohranjajo genetsko diverziteto populacij in zato so uporabni za preučevanje stabilnosti populacij.

Prednosti uporabe mikrosatelitov so naslednje:

- metode so relativno poceni
- pri analizi potrebujemo relativno majhno količino DNA, ki pa je lahko tudi degradirana, saj se pri analizi uporablja krajše fragmente mikrosatelitnih lokusov.
- organizmu se zelo pogosto pojavljajo in zato jih lahko uporabimo pri študijah številnih lokusov
- njihova analiza je relativno preprosta in cenovno ugodnejša od ostalih markerskih sistemov.

Slabosti uporabe mikrosatelitov pa so:

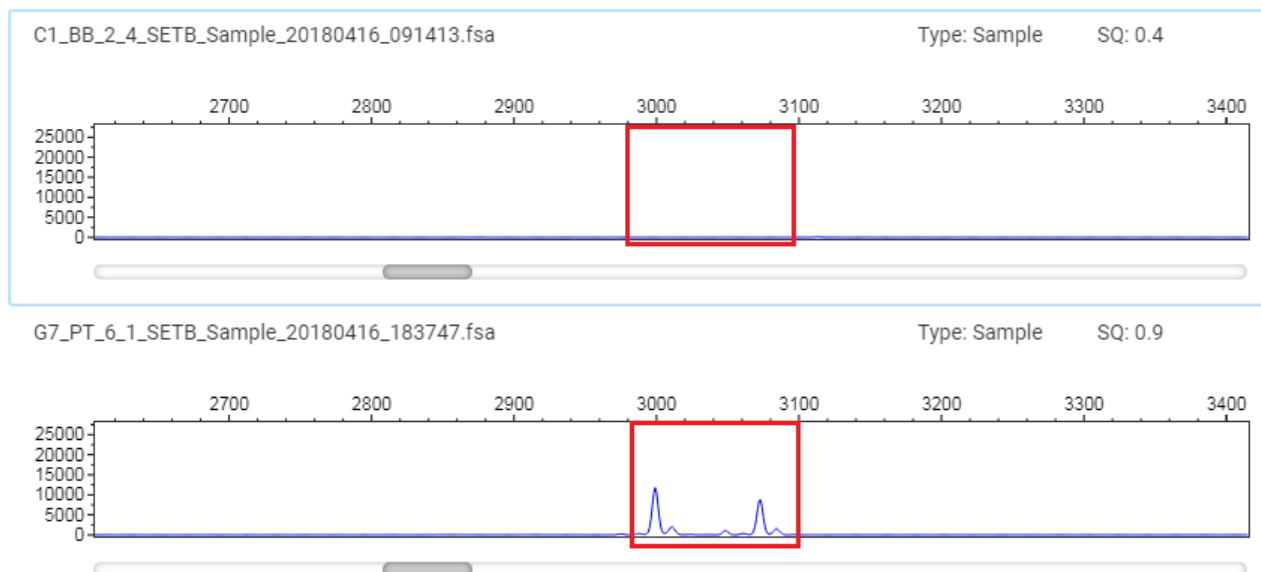
- če mikrosatelitne regije še ne poznamo, je določitev regije dolgotrajen in drag proces, saj vključuje iskanje mikrosatelitne regije in načrtovanje začetnih oligonukleotidov
- lahko se pojavijo napake pri postopku fragmentne analize. Do teh prihaja zaradi napak pri določanju alelov, homoplazije (navidezna enakost alelov glede na dolžino ne pa tudi na izvor) in ničelnih alelov (napake pri pomnoževanju DNA s PCR reakcijo (Štajner, 2010).

1.1.2.3 Parametri populacijske genetike

Ničelni aleli

Pri mikrosatelitih so mutacije zelo pogoste in zato še niso razjasnjeni vsi mehanizmi, ki do mutacij pripeljejo. Med fragmentno analizo in pri branju dolžin alelov lahko pride do napak, ki se pokažejo v obliki ničelnih alelov. To so nepomnoženi fragmenti, saj je prišlo do mutacije ali delecije obrobne regije mikrosatelita, kamor bi se moral prilegati začetni oligonukleotid. To lahko privede do napačnega določanja števila heterozigotov in napačnega določanja frekvence alelov. Taki aleli so glavni razlog za odstopanja med pričakovano in opaženo heterozigotnostjo (op. glej razlago v nadaljnjem besedilu).

Slika 3 prikazuje sliko ničelnega alela. Torej tam, kjer naj bi se alel pojavil, ga ni, kar pomeni, da se med PCR reakcijo ni pomnožil (Štajner, 2010, Chapuis in Estoup 2006).



Slika 3: Prikaz pojava ničelnega alela na naših vzorcih.

Hardy-Weinbergovo ravnotežje

V ozadju Hardy-Weinbergovega (HW) ravnotežja veljajo matematični zakoni. HW ravnotežje pokaže, da razmerje med dominantnim in recesivnim alelom iz generacije v generacijo ostaja enako (se ne spreminja). Prav tako se ne spreminja razmerje med genotipi med generacijami. Taka populacija je v Hardy-Weinbergovem ravnotežju in se ne spreminja. V naravi take populacije ne poznamo, saj na populacije vplivajo številni okoljski in evolucijski dejavniki (npr. selektivno parjenje, mutacije, migracije, genetski zdrs...) in zato računamo le odstopanje od tega ravnotežja. Če je odstopanje manjše od $p < 0,05$, potem populacija ni v HW ravnovesju, kar pomeni, da je prišlo v populaciji do nenaključnega parjenja v sorodstvu. HW načelo velja za velike populacije. Odstopanje od HW ravnotežja lahko izračunamo s koeficientom parjenja v sorodstvu (angl. inbreeding) (F_{IS}). Računalniški programi za izračun uporabljajo »Monte Carlo Chain method« ali krajše MCMC matematični algoritem (metoda markovske verige) (Fred, 2007).

Enačba prikazuje izračun HW ravnotežja.

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

$rr = p^2$ → frekvenca homozigotnega genotipa

$Rr = 2pq$ → frekvenca heterozigotnega genotipa

$RR = q^2$ → frekvenca homozigotnega genotipa

p, q (r, R) → frekvenca alelov v populaciji

$$p + q = 1$$

Heterozigotnost

Diploidni osebki imajo za vsak lokus dva alela, ki sta lahko enaka ali pa različna. En alel osebek dobi od matere in drugega od očeta. Če se ta dva alela razlikujeta, to pomeni, da imamo heterozigotni osebek. Heterozigotnost je parameter, ki meri frekvenco vseh heterozigotov v neki populaciji. Merimo jo kot pričakovano in opaženo heterozigotnost. Posledice zmanjšane heterozigotnosti so lahko: genetski zdrs, selekcija, genski pretok...

Heterozigotnost se izračuna po naslednji formuli:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

n = število alelov

p_i = frekvenca i -tega alela od n alelov na lokusu

(Frankham in sod., 2004)

Pričakovana heterozigotnost (H_e) temelji na Hardy-Weinbergovem ravnotežju, ki nam pove delež heterozigotov v neki populaciji, če med osebki ne bi bilo naključnega parjenja.

Pričakovana heterozigotnost se izračuna po naslednji formuli (Fred, 2007):

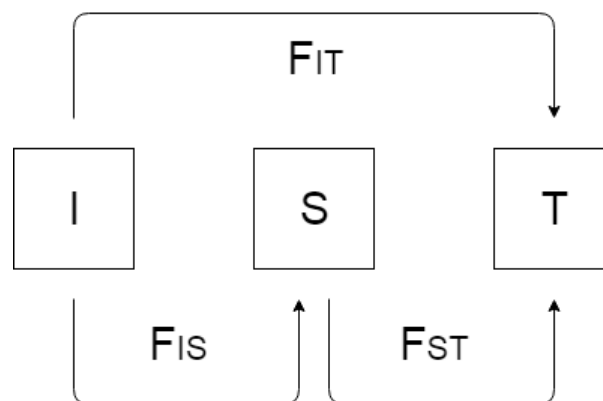
$$H_e = \frac{\text{število heterozigotov na lokusu}}{\text{število osebkov}}$$

Opažena heterozigotnost (H_o) nam pove dejanski delež heterozigotov, ki so prisotni v neki populaciji. Do razlik med pričakovano in opaženo heterozigotnostjo nastane zaradi pojava ničelnih alelov. Po navadi je opažena heterozigotnost večja od pričakovane. Če pa je obratno, to pomeni, da je prisotno parjenje v sorodstvu (inbriding). Ta parameter se uporablja večinoma za kodominantne podatke (lokuse) diploidnih organizmov, saj je pri dominantnih podatkih (lokusih) heterozigotne osebkke težje določiti. Opažena heterozigotnost se izračuna po naslednji formuli (Fred, 2007):

$$H_o = \frac{\text{število heterozigotnih osebkov}}{\text{število vseh heterozigotnih osebkov v populaciji}}$$

Fiksacijski indeksi – F statistika

F statistika temelji na fiksacijskem indeksu, ki ga je zasnoval Sewall Wright. Fiksacijski indeks meri parjenje v sorodstvu, ki povečuje homozigotnost osebkov, kar vodi v manjšo populacijsko variabilnost. Do parjenja v sorodstvu najpogosteje pride zaradi nastanka subpopulacij, ki so posledica geografske ali druge bariere v populaciji. Definirani so trije fiksacijski indeksi: I, S in T (Kent, 2014). Na Sliki 4 je prikazano razmerje med njimi.



Slika 4: Razmerje med fiksacijskimi indeksi.

I – posamezni osebek (ang. individual)

S – subpopulacija (angl. subpopulation)

T – celotna populacija (angl. total)

 F_{IT} – populacijski fiksacijski indeks

Populacijski fiksacijski indeks je razmerje med individualnim in populacijskim koeficientom parjenja v sorodstvu. Zelo redko se uporablja, saj imamo ponavadi več populacij in gledamo razmerje med populacijami in nas zato posamezniki ne zanimajo toliko (Kent, 2014).

 F_{IS} - individualni fiksacijski indeks oz. koeficient parjenja v sorodstvu (angl. Inbreeding coefficient)

Do parjenja v sorodstvu pride predvsem v manjših populacijah, kjer parjenje ni naključno. Take populacije imajo manj heterozigotnih osebkov, saj se med seboj pariyo ožji sorodniki, ki pa imajo podobne gene in zato imajo njihovi potomci iz generacije v generacijo več homozigotnih osebkov. Kadar število heterozigotov upada, ima F_{IS} pozitivno vrednost, in obratno, kadar število heterozigotov narašča, je F_{IS} negativen. F_{IS} nam torej pove razliko med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo, ki nastane zaradi nenaključnega parjenja osebkov v neki populaciji (Kent, 2014).

$$F_{IS} = \frac{H_{exp} - H_{obs}}{H_{exp}}$$

F_{ST} - povprečni oz. subpopulacijski fiksacijski indeks ali fiksacijski indeks

Večja genetska razdalja med populacijami se pojavi, ko med populacijami ne pride do parjenja, ker so med seboj bolj izolirane. Genetska razdalja med populacijami je podana s fiksacijskim indeksom F_{st} . Tameri razliko v frekvenci alelov med dvema populacijama. F_{st} zavzame vrednosti med 0 in 1 kjer vrednost 0 pomeni, da med populacijama poteka popoln genski pretok, medtem ko vrednost 1 pomeni, da med populacijami ni genskega pretoka. V naravi ni populacije, ki bi imela F_{st} enak 1, saj se ta indeks uporablja za merjenje parjenja med populacijami iste vrste, ki pa ne morejo biti tako izolirane ena od druge, da med njimi ne bi bilo nobenega genskega pretoka. (Kent, 2014)

$$F_{st} = \frac{H_t - H_s}{H_t}$$

H_t – heterozigotnost v populaciji

H_s – povprečna heterozigotnost znotraj podpopucije

Včasih računalniški programi za računanje F_{st} indeksa podajo tudi negativne vrednosti, ki pa kažejo na to, da se je pojavil Wahlundov efekt. Wahlundov efekt se pojavi, ko so si posamezniki med populacijami bolj sorodni kot posamezniki znotraj populacije. Med populacijami tako poteka nemoteno parjenje in povečanje heterozigotov. Obratno pa znotraj populacije pride do oteženega genetskega pretoka, ki povzroči genetski zdrs. Do teh razlik lahko npr. pride, če se pojavi neka geografska bariera znotraj populacije (Kent, 2014).

Število alelov (NA)

Posamezen lokus ima lahko več alelov. Število alelov na posameznem lokusu v neki populaciji nam pove koliko je ta lokus polimorfen. Če imamo večje število vzorcev, je posledično tudi večja možnost, da imamo več različnih alelov za en lokus. Mera, ki nam pove število alelov, je odvisna od velikosti vzorca, zato po navadi merimo bogastvo alelov (angl. allelic richness), ki nam poda razmerje med številom alelov in velikostjo vzorca (Leberg, 2002).

Bogastvo alelov (AR) (angl. allelic richness)

Ta parameter nam poda povprečno število alelov za posamezen lokus. Poda nam več informacij kot samo število alelov, saj se uporablja za manjše populacije kot tudi za primerjavo med populacijami z različnim številom osebkov. V populaciji se bogastvo alelov izgubi zaradi učinka ozkega grla (angl. bottleneck) ali pojava učinka osnoveatelja (angl. founder effect). Učinek ozkega grla se pojavi, kadar se v populaciji pojavi neka demografska ovira in se ohrani samo delni nabor alelov. Učinek osnoveatelja pa se pojavi, kadar neka nova populacija le iz nekaj osebkov in posledica je zmanjšan nabor alelov saj je v taki populaciji

prisotno parjenje v ožjem sorodstvu. Ta dva učinka bolj vplivata na izgubo bogastva alelov kot pa na samo heterozigotnost, saj le ta ni tako občutljiva na spremembe v frekvenci izgubljenih redkih alelov (Leberg, 2002).

Genetska razdalja

Je merilo za genetsko divergenco med vrstami ali med populacijami iste vrste. Temelji na podobnosti alelov. Ti so si bolj podobni, če imajo osebki med populacijami iste prednike, in obratno, če je razlik med aleli več, potem so si populacije med seboj manj sorodne in imajo večjo genetsko razdaljo. Za merjenje genetske razdalje uporabljamo več modelov in ena izmed najbolj uporabljenih je Nei-jeva genetska razdalja (Kent, 2014).

1.2.3 Računalniški programi za analizo populacijske strukture

1.2.3.1 GenAlEx

GenAlEx (Peakall in Smouse 2006, 2012) je vtičnik za Excel. Ta program izračuna številne parametre populacijske genetike, med njimi tudi graf PCoA (analiza glavnih koordinat), ki izriše graf na podlagi matrike genetske razdalje, ki jo pripravimo prej na podlagi Nei-jeve genetske razdalje.

1.2.3.2 FreeNA

FreeNA (Chapuis and Estoup, 2007) je računalniški program za preverjanje prisotnosti ničelnih alelov in izračun fiksacijskih indeksov. Ničelne alele preverja s pomočjo EM (Dempster, Laird and Rubin, 1977) algoritma.

1.2.3.3 Mikrochecker

Mikrochecker (Oosterhout, 2004) je računalniški program za preverjanje prisotnosti ničelnih alelov s pomočjo Brookfield algoritma (1996). Poda nam tudi grafe za frekvenco homozigotov in grafe za frekvenco razlik v baznih parih med aleli.

1.2.3.4 Genepop

Genepop (Rousset, 2008) je spletni prosto dostopen računalniški program. Izračuna nam naslednje parametre:

1. Hardy-Weinbergov test
2. LD – vezano neravnovesje (angl. linkage disequilibrium)
3. Populacijsko diferenciacijo
4. Število migrantov - N_m
5. Frekvenco alelov - F_{IS}
6. Fiksacijski indeks - F_{ST}
7. Prisotnost ničelnih alelov

Prisotnost ničelnih alelov izračuna na podlagi EM (Dempster, Laird and Rubin, 1977) algoritma in Brookfieldove metode (1996). Hardy-Weinbergov test izračuna na podlagi Markova veriga Monte Carlo metode ali krajše MCMC metode (angl. Monte Carlo Chain Method) (Guo and Thompson, 1992). Fiksacijske indekse izračuna s pomočjo algoritma Weir in Cockerham (1984), ki upošteva standardno analizo variance oz. ANOVA statistično primerjavo. Pri HW testu uporablja Fisherjevo metodo.

1.2.3.5 Genetix

Genetix (Belkhir in sod., 1996) je računalniški program za izračun naslednjih parametrov: opažena in pričakovana heterozigotnost, fiksacijska indeksa F_{IS} in F_{ST} . Izračuna nam tudi genetsko razdaljo na podlagi Nei-jeve definicije genetske razdalje (1978). Za izračun genetske razdalje uporablja algoritem faktorialne analize korespondance ali krajše AFC (angl. factorial correspondence analysis). Poda nam izhodno datoteko s koordinatami, s pomočjo katere lahko narišemo graf genetske razdalje. Izriše tudi 3D graf na podlagi AFC algoritma. S pomočjo tega programa lahko pripravimo tudi vhodno datoteko za program FSTAT.

1.2.3.6 FSTAT

FSTAT (Goudet, 2001) je računalniški program za izračun naslednjih parametrov: pričakovane in opažene heterozigotnosti H_{exp} in H_{obs} , fiksacijski indeks F_{IS} , in bogastvo alelov A in AR . Fiksacijske indekse izračuna po algoritmu, ki sta ga opisala Weir in Cockerham (1984). Program bogastvo alelov izračuna po (angl. rarefaction) metodi, ki prilagodi rezultate glede na populacijo z najmanjšim številom vzorcev (Leberg, 2002).

1.2.3.7 STRUCTURE

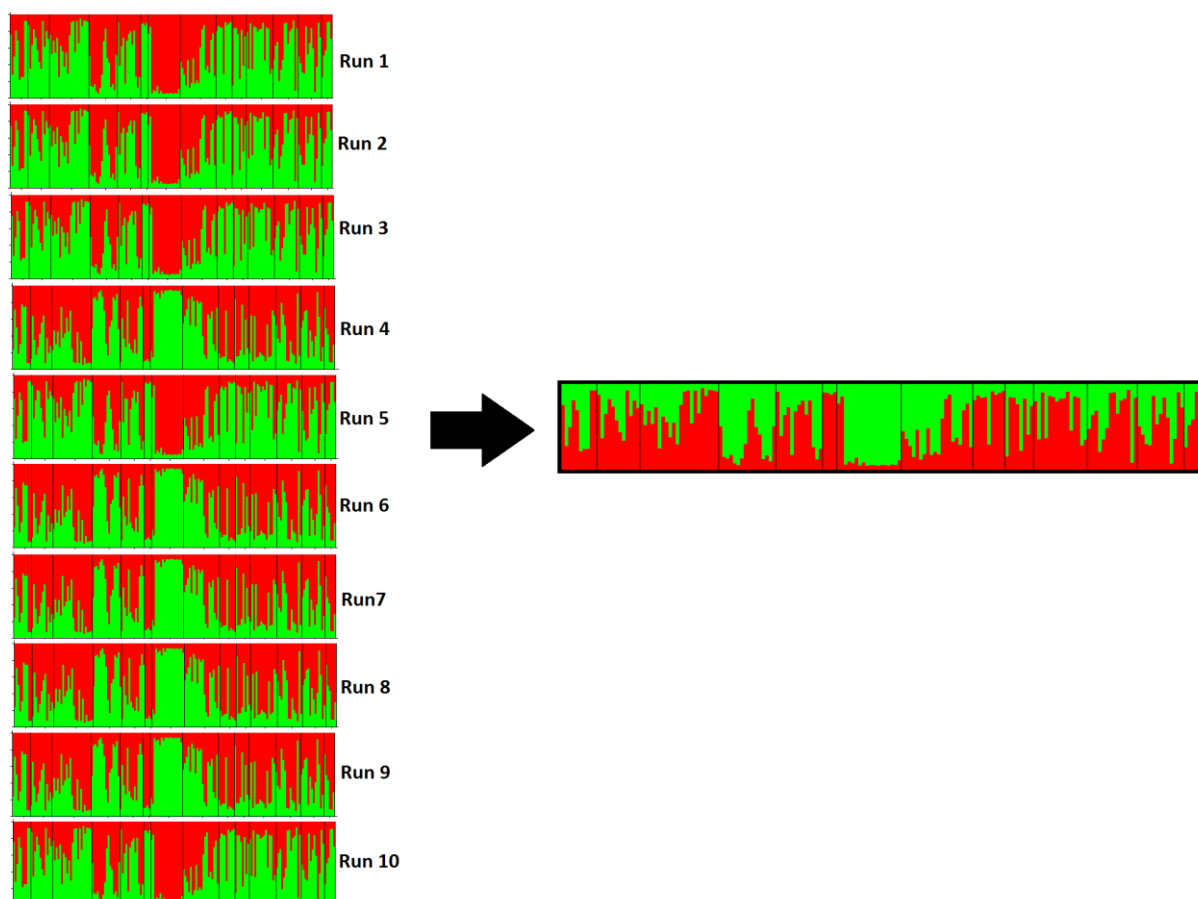
STRUCTURE (Pritchard in sod., 2000) je računalniški program za prikaz populacijske strukture. Temelji na podlagi Bayesovega matematičnega algoritma. Eden izmed modelov je admixture model, ki je primeren za populacije, v katerih obstaja možnost, da imajo osebki mešane predhodne osebke. To pomeni, da so se populacije v preteklosti mešale med seboj. Model temelji na predpostavki, da ima i -ti posameznik delček svojega genoma podedovanega od prednikov v populaciji k . Pri tem moramo upoštevati, da je vsak alel prednika neodvisnega izvora kot aleli ostalih prednikov. Na podlagi teh predpostavk program izbere najmanjši $K = 2$. S tem programom torej ne moremo dobiti samo enega klastra, čeprav na podlagi slike lahko sklepamo, da je klaster samo eden. Program nam za vsako vrednost K poda tudi Q vrednosti, ki nakazujejo na pripadnost enemu izmed klastrov za vsako populacijo. Te vrednosti so podane v datotekah s končnicama *.f* in *.q*. V teh datotekah dobimo tudi podatke o pričakovani heterozigotnosti za posamezen klaster.

1.2.3.8 Structure Harvester

Structure Harvester (Earl in sod., 2012) je računalniški program na spletu. Podatke, ki jih pridobimo s programom STRUCTURE, stisnemo v zip datoteko in naložimo na internet. Program nam s pomočjo ΔK metode (Evanno sod. 2005), ki temelji na metodi bližnjih sosedov (angl. maximum likelihood), izračuna najbolj verjetno število klastrov oz. K . Poda pa nam tudi clumpp datoteke, ki jih uporabimo v programu clumpp.

1.2.3.9 CLUMPP

Kratica CLUMPP (Jakobsson in Rosenberg, 2007) po angleško pomeni CLUster Matching and Permutation Program. CLUMPP je računalniški program ki prebere clumpp datoteke, ki jih pridobimo s programom Structure Harvester. V clumpp datoteki so združeni vsi podatki o ciklih za določen K . Clumpp poravna vse grafe za določen K . Kot izhodno datoteko nam ta program naredi datoteko, ki jo uporabimo v programu Distruct.



Slika 5: Prikazuje potek poravnave v ozadju programa Clumpp.

1.2.3.10 Distruct

Distruct (Rosenberg, 2004) je računalniški program za grafični prikaz populacijske strukture. Njegova vhodna datoteka je pridobljena s programom CLUMPP. Za grafični prikaz moramo pripraviti še 2 datoteki in sicer v eni definiramo barve in v drugi imena populacij, ki se pokažejo na končni sliki. Njegovo izhodno datoteko pa lahko odpremo s programom GSview.

1.2.3.11 BAPS

BAPS (angl. Bayesian Analysis of Population Structure) (Corander in sod., 2003) je računalniški program za določanje populacijske strukture na podlagi Bayesovega matematičnega algoritma. Poleg podatkov, ki jih pridobimo iz mikrosatelitov, potrebuje še koordinate populacij, ki jih preučujemo. Populacijsko strukturo nam tako predstavi še v prostoru. Program populacije razdeli v klastre s pomočjo Nei-jeve genetske razdalje. Število klastrov se lahko razlikuje od števila, ki ga pridobimo s programom STRUCTURE, saj ima BAPS v ozadju drugačen algoritem.

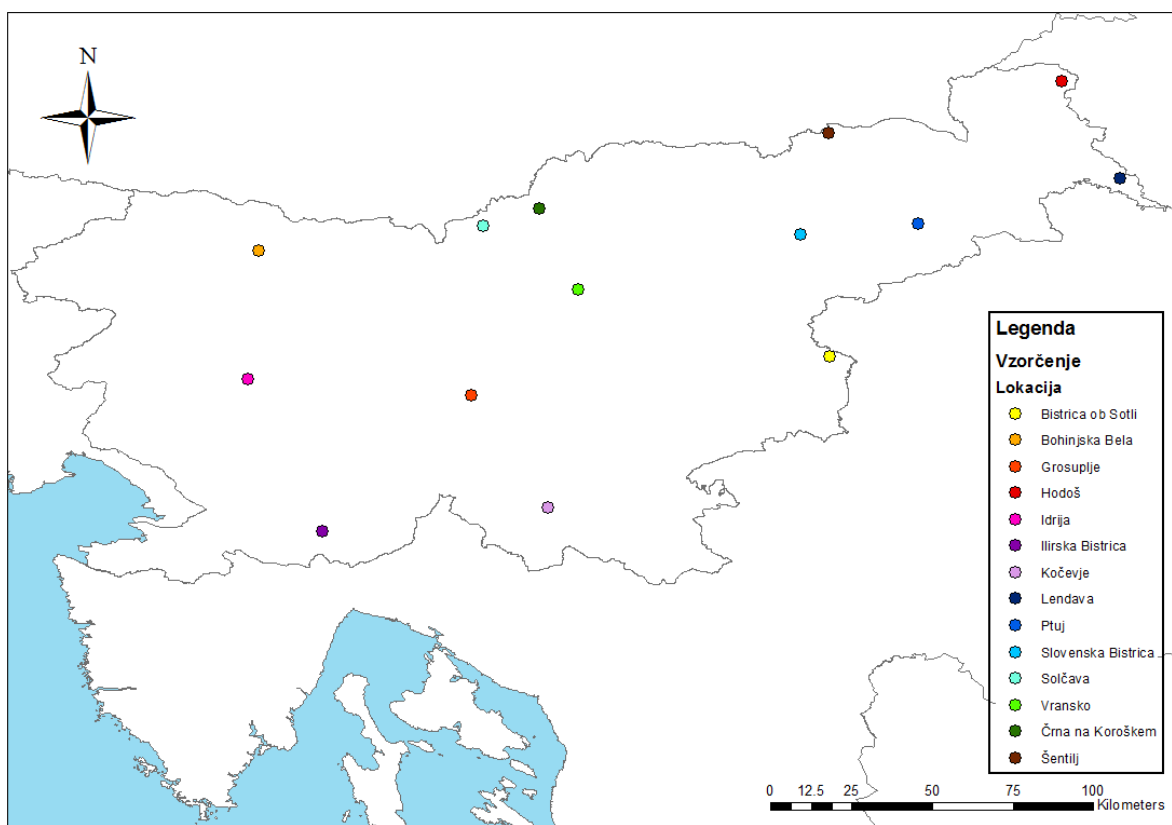
2 METODE DELA

Zaradi negativnega vpliva na človeka in zelo hitrega širjenja so raziskave in ugotavljanje razširjenosti komarjev izrednega pomena. V ta namen so Kalan in sod. leta 2013 in 2015 (2017) vzorčili komarje v celotni Sloveniji. Komarje so določili do vrste in jih primerno shranili za nadaljnje raziskave. Od nabranih vzorcev smo oddvojili osebkje japonskih komarjev, ki smo jih uporabili za našo študijo.

Podatki o lokacijah, kjer so bili najdeni japonski komarji, in številu vzorcev na lokacijo so zbrani v preglednici 2. Lokacije vzorčenja so s koordinatami prikazani tudi na zemljevidu Slovenije, ki ga prikazuje slika 5, ki je bila narejena s programom ArcGIS.

Preglednica 2: Podatki o lokacijah vzorčenja ličink *Ae. j. japonicus*.

Št. populacije	Oznaka populacije	Lokacija	Koordinate		Št. Vzorcev
			X	Y	
1	BB	Bohinjska Bela	14.066264	46.350679	10
2	BOS	Bistrica ob Sotli	15.659362	46.056455	12
3	CK	Črna na Koroškem	14.849204	46.470252	22
4	GROS	Grosuplje	14.660039	45.948237	16
5	HOD	Hodoš	16.3044	46.823727	13
6	IB	Ilirska Bistrica	14.244671	45.569077	4
7	ID	Idrija	14.035034	45.994368	18
8	KOc	Kočevje	14.87403	45.636456	20
9	LEN	Lendava	16.468129	46.552904	9
10	PT	Ptuj	15.904228	46.425731	8
11	SB	Slovenska Bistrica	15.575995	46.398538	15
12	SEN	Šentilj	15.654305	46.678783	14
13	SOL	Solčava	14.690889	46.419671	13
14	VRA	Vransko	14.956109	46.244728	6
Skupaj					180



Slika 6: Prikaz lokacij vzorčenja na zemljevidu Slovenije.

2.1 Molekularne metode

2.1.1 Izolacija DNA

DNA smo izolirali iz ličink, ki so bile shranjene v etanolu. Za izolacijo smo uporabili naslednji kit: Tissue DNA Mini Kit, peqGOLD (vwr). Izolacija je potekala po protokolu, ki je bil priložen kitu. Po izolaciji smo izmerili koncentracijo DNA s fluorometrom (Qubit).

2.1.2 Pomnoževanje določenih fragmentov s pomočjo PCR reakcije

PCR reakcija je verižna reakcija s polimerazo, pri kateri pomnožujemo določene DNA fragmente s pomočjo začetnih oligonukleotidov.

Na podlagi izmerjenih koncentracij DNA smo za nadaljnje analize izbrali tiste vzorce, ki so imeli zadostno količino DNA (vrednosti nad 0,1 ng/μl). Po izolaciji smo napravili verižno reakcijo s polimerazo (PCR), kjer smo pomnožili sedem določenih fragmentov DNA (preglednica 3). Dolžine mikrosatelitov so prikazane v preglednici, ki je v prilogi št. 1. Imeli smo šest trinukleotidnih lokusov (OJ5, OJ85, OJ187, OJ338, OJ70) in en dinukleotidni lokus (OJ100). Iz preglednice lahko razberemo tudi, da imamo štiri sestavljene in tri popolne motive.

Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi za mikrosatelite japonskega komarja (Zielke sod. 2014)

Lokus	SET	Obseg	Začetni oligonukleotidi	Ponavljajoči se motiv	Tm	Podaljševanje T
OJ5	A	144-157	F: CACGAAGTCTG GAAGATCTGG	(GTT) ₆ (GCT) ₃ (GTT)	56.6	51.6
			R: 6FAM-GTGCAGCGAAA TCTGAGGAA		57.2	
OJ10	A	114-137	F: GCTTGTCTGGC TAAGTACTGC	(GTT)(GTG)(GTT) ₈	60.0	49.5
			R: NED-CGGTAATGTCC ACCTGATTG		54.5	
OJ70	B	186-212	F: CGTTGACAAAG CTCATCTGC	(GCT) ₄ (GTT) ₂ (GCT) ₂ (GTT)	55.9	50.9
			R: NED-TGATCTCCAACG GAAGTATGC	(GCT) ₂ (GTT) ₂ (GCT) ₇	56.1	
OJ85	A	161-173	F: NED-CATAAAGCAGC AAGCACAGC	(CAG) ₆	56.5	49.0
			R: TGTCTTCCGGAT TGATTTC		54.0	
OJ100	B	180-189	F: 6-FAM-CGCATTCTCTCAA ACCCTAAC	(GT) ₅	55.4	50.4
			R: TCGGTCCGAGG GAAAAAC		56.9	
OJ187	A	135-157	F: PET-AAATCAGCTGC CAGTGCAAG	(CGA) ₁₁	57.6	51.6
			R: TGTGTACTTTGC GGTGAAGG		56.6	
OJ338	B	134-179	F: NED-TCTCCTGATCCT GAAGAAGC	(CAA) ₁₀	55.5	50.5
			R: AGGGAGCAGAG CAACACTTG		59.1	

PCR reakcijo smo pripravili v dveh setih na vzorec. V setu A smo pomnoževali lokuse OJ5, OJ10, OOJ85 ter OJ187, v setu B pa OJ70, OJ100 ter OJ338. Po naslednjih protokolih smo pripravili 15 μ l reakcijske mešanice:

Protokol za SET A za en vzorec

V mikrocentrifugirki smo pripravili mešanico po naslednjem protokolu:

- 1,5 μ l ddH₂O (dvojno destilirana voda)
- 7,5 μ l KAPA2G
- 4 μ l SET A (mešanica začetnih oligonukleotidov, v enakomernem razmerju)
- 2 μ l vzorca (izolirane DNA)

Protokol za SET B za en vzorec

V eno epicomikrocentrifugirki smo pripravili mešanico po naslednjem protokolu:

- 2,5 μ l ddH₂O (dvojno destilirana voda)
- 7,5 μ l KAPA2G
- 3 μ l SET B - (mešanica začetnih oligonukleotidov, v enakomernem razmerju)
- 2 μ l vzorca (izolirane DNA)

Reakcijske mešanice smo dali na ciklični termostat DNA ENGINE Thermal Cycler 200 in določili naslednji temperaturni profil:

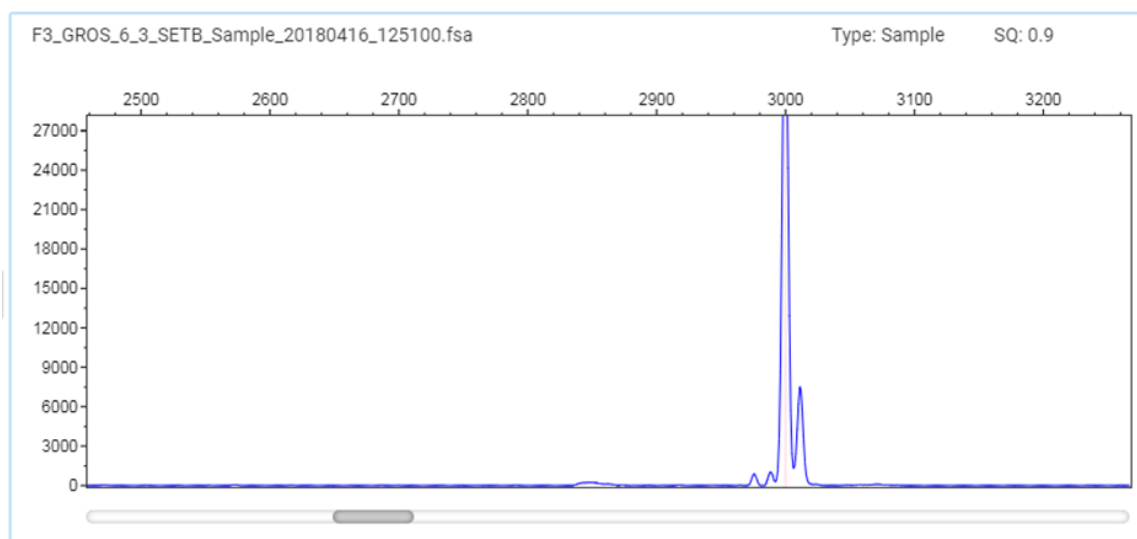
- 5 minut na 96°C
- 30 ciklov:
 - 30 s na 94°C
 - 30 s na 56°C
 - 30 s na 72°C
- 10 min na 72°C

2.1.3 Fragmentna analiza

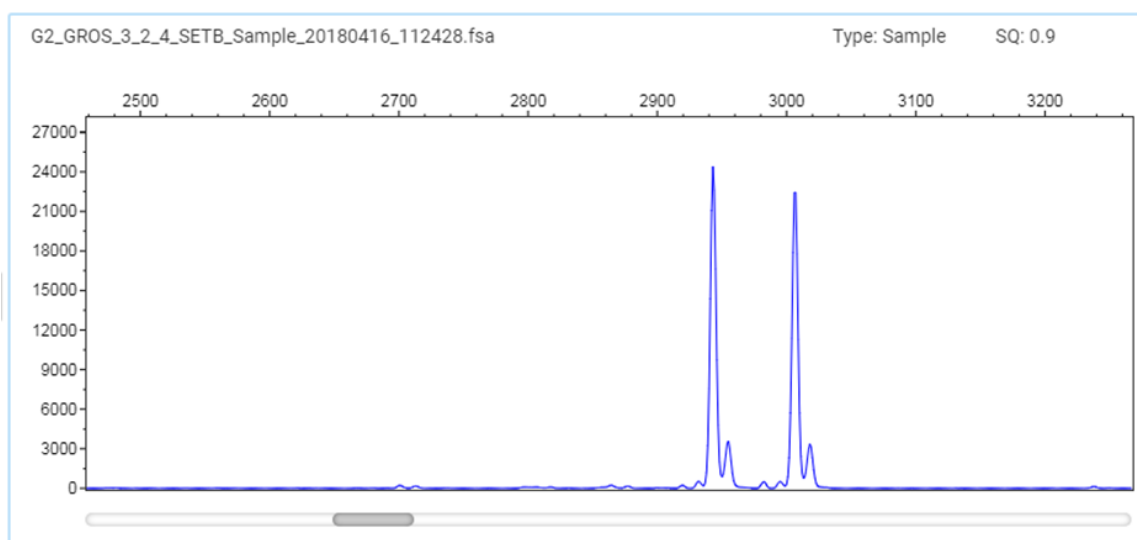
Končanemu PCR je sledila fragmentna analiza. Za to smo naredili reakcijsko mešanico po spodnjem protokolu:

1. Naredili smo reakcijsko mešanico
 - a. Št. vzorcev x 0,3 μ l LIZa (LIZ size standard – za naš primer GS500(-250) LIZ)
 - b. Št. vzorcev x 12 μ l formamida
2. Na ploščo smo nanegli v vsako luknjico po 12,3 μ l reakcijske mešanice in nato še 1 μ l vzorca
3. Ploščo smo pokrili s septo in na kratko centrifugirali
4. Ploščo smo dali na PCR za denaturacijo na 95°C za 5 min

Po denaturaciji smo ohladili PCR ploščo in jo dali na sekvenator. V naši raziskavi smo uporabili avtomatski sekvenator ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied biosystems). Rezultate smo dobili v obliki FSA datotek, ki smo jih analizirali s pomočjo programa GenMapper4.1. Pred pričetkom analize smo vnesli v program še velikostni standard, ki smo ga prej dodali na sekvenator. V programu se nam izriše elektrofeogram v obliki slike barvnih vrhov, ki nakazujejo, da je tam mikrosatelit. Za vsak lokus imamo določen obseg, kjer naj bi se nahajal mikrosatelit in tako najdemo primeren vrh. S klikom na te vrhove se nam prikaže dolžina alela, ki pa je tudi naš končni podatek. Vrhovi so lahko različnih oblik. Če je bilo poleg večjega vrha še nekaj manjših, smoupoštevali največjega, saj so manjši vrhovi posledica zdrsa polimeraze (angl. stutter peaks). Če je bil vrh eden je to pomenilo, da imamo homozigotni organizem (Slika 6), pri heterozigotnih organizmih pa sta bila vrhova dva (Slika 7).



Slika 7: Primer homozigotnega organizma.



Slika 8: Primer heterozigotnega organizma.

2.1.3.1 Obdelava rezultatov frgmentne analize

Podatki o dolžini mikrosatelita običajno niso bili cela številka in zato smo jih jo na koncu zaokrožili. Če je npr. motiv sestavljen iz treh nukleotidov (trinukleotid), potem morajo biti dolžine določene tako, da se razlikujejo za tri nukleotide ali večkratnik števila tri. Tiste dolžine, ki se razlikujejo za manj kot tri, smo smatrali za iste dolžine.

2.2 Statistične metode

Excelovo tabelo z zaokroženimi in urejenimi podatki o dolžinah mikrosatelitov smo uporabili za nadaljnje statistične analize. Statistična analiza je potekala takole:

1. Priprava vhodnih datotek z Excelovim vtičnikom GenAlEx.
2. Preverjanje ničelnih alelov s programi FreeNA, Mikrochecker in Genepop.
3. Izračun heterozigotnosti ter opažene in pričakovane heterozigotnosti s programi Genetix, FreeNA in FSTAT.
4. Izračun fiksacijskih indeksov F_{IT} , F_{IS} in F_{ST} s programi Genepop, FreeNA in FSTAT.
5. Izračun bogastva alelov s programom FSTAT.
6. Izračun Nei-jeve genetske razdalje s programom Genetix.
7. Izris grafa PCoA v programu GenAlEx
8. Izračun najbolj verjetnega K , ki nam pove najbolj verjetno število klastrov oz. genotipov s pomočjo programa STRUCTURE. Program STRUCTURE potrebuje še pomožne programe kot so: Structure Harvester, CLUMPP in Distruct, ki nam na koncu dajo ustrezne podatke o najbolj verjetnem K in nam na koncu izrišejo ustrezno sliko populacijske strukture.
9. Predstavitev populacijske strukture v prostoru s programom BAPS.

2.2.1 GenAIEx

Uporabili smo verzijo programa GenAIEx 6.5. S tem vtičnikom smo pripravili vhodne datoteke za naslednje programe: Genetix, STRUCTURE, Genepop in FreeNA. Izrisali smo tudi graf PCoA (Slika 14).

2.2.2 FreeNA

S tem programom smo preverili ničelne alele za vse populacije in vse lokuse (Preglednici 4 in 5) in izračunali fiksacijski indeks F_{st} za vse populacije in vse alele (Preglednica 7). Za izračun smo naredili 10000 iteracij.

2.2.3 Mikrochecker

S tem programom smo preverili ničelne alele za vse populacije in vse lokuse (Preglednici 4 in 5). Za našo raziskavo smo uporabili 95% interval zaupanja za ugotavljanje prisotnosti ničelnih alelov.

2.2.4. Genepop

S tem programom smo izračunali naslednje parametre: HW ravnotežje in fiksacijske indekse F_{is} in F_{st} (Preglednici 6 in 7). Preverili pa smo tudi ničelne alele za vse populacije in vse alele (Preglednici 4 in 5). Za izračun smo uporabili 1000 ponovitev markovske verige.

2.2.5 Genetix

S tem programom smo izračunali fiksacijske indekse F_{is} in F_{st} (Preglednici 6 in 7). Izračunali smo tudi genetsko razdaljo z AFC algoritmom in dobili datoteko s koordinatami, s pomočjo katere smo v Excelu izrisali graf genetske razdalje med posamezniki in med populacijami (Sliki 10 in 11). Pripravili pa smo tudi izhodno datoteko za program FSTAT.

2.2.6 FSTAT

Za našo raziskavo smo uporabili verzijo programa FSTAT293. S tem programom smo izračunali pričakovano in opažno heterozigotnost (Slika 9), fiksacijske indekse F_{is} , število alelov in bogastvo alelov (Preglednica 6). Bogastvo alelov nam je po rarefaction metodi prilagodilo rezultate na najmanjšo populacijo – štiri vzorci.

2.2.7 STRUCTURE

Za našo raziskavo smo uporabili verzijo STRUCTURE 2.3.4. Za analizo smo uporabili admixture model in naredili 10 ciklov in za vsak cikel 10 iteracij. Za vsak cikel smo nastavili naslednje pogoje: "a burn-in period" = 100000 in 1000000 ponovitev MCMC. K (število klastrov) je tekel od 1 do 10. Za model smo uporabili "Admixture model". Kot rezultat smo dobili sliko populacijske strukture (Slika 13). Q vrednosti za klaster za vsako populacijo so prikazane v preglednici 8.

2.2.8 Structure Harvester

S tem programom smo izračunali najbolj verjetno število klastrov K . Eden od prikazov za najbolj verjeten K je graf prikazan na sliki 12. Pridobili smo tudi clumpp datoteke, ki smo jih uporabili v programu CLUMPP.

2.2.9 CLUMPP

S tem programom smo združili vse cikle v clumpp datoteki v eno datoteko. Uporabili smo clumpp datoteko za $K = 2$. Za poravnavo smo uporabili opcijo Greedy. Izhodno datoteko smo uporabili v programu Distruct.

2.2.10 Distruct

Poleg datoteke pridobljene s programom CLUMPP smo pripravili še 2 datoteki. V eni smo definirali imena populacij in v drugi barve klastrov za končen prikaz slike populacijske strukture. Izrisano sliko smo odprli s programom GSview (Slika 13).

2.2.11 BAPS

V naši raziskavi smo uporabili BAPS6. Izbrali smo opcijo "Spatial clustering of groups za Population mixture analysis" in izrisali sliko populacijske strukture (Slika 15) in sliko populacijske strukture v prostoru (Slika 16).

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

3.1 Ničelni aleli

Ničelne alele smo preverjali s tremi programi in dvema algoritmoma: EM Dempster algoritom in Brookfield metodo. V povprečju pri nobenem programu ni bilo opaziti vrednosti nad 0,1 kar kaže na prisotnost ničelnih alelov (Preglednici 4 in 5). Izstopa program Genepop in EM –Dempster algoritem, ki pri lokusu OJ100 kaže vrednost malo nad 0,1. Ker je to res edini primer na ničelne alele, na to nismo dali poudarka in smo sklepali, da niso prisotni. V posameznih populacijah ničelnih alelov nismo zaznali.

Preglednica 4: Povprečne verjetnosti prisotnosti ničelnih alelov glede na lokuse v programih FreeNA, Mikrochecker, Genepop. Rumeno je označen lokus, pri katerem obstaja verjetnost pojava ničelega alela.

Populacije	Programi			
	FreeNA	Mikrochecker	Genepop (Brookfield)	Genepop (Dempster)
pop1	0.0262	0.0288	0.0626	0.0831
pop2	0.0150	0.0226	0.0076	0.0576
pop3	0.0310	0.0333	0.0249	0.0595
pop4	0.0559	0.0715	0.0429	0.0830
pop5	0.0440	0.0468	0.0207	0.0757
pop6	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000
pop7	0.0154	0.0156	0.0083	0.0404
pop8	0.0573	0.0629	0.0490	0.0506
pop9	0.0049	0.0164	0.0104	0.0400
pop10	0.0119	0.0057	0.0000	0.0395
pop11	0.0483	0.0352	0.0163	0.0698
pop12	0.0194	0.0629	0.0000	0.0154
pop13	0.0110	0.0177	0.0000	0.0513
pop14	0.0001	0.0089	0.0089	0.0083

Preglednica 5: Povprečne verjetnosti prisotnosti ničelnih alelov glede na lokuse v programih FreeNA, Mikrochecker, Genepop. Rumeno je označen lokus, pri katerem obstaja verjetnost pojava ničlega alela.

Programi				
Lokusi	FreeNA	Mikrochecker	Genepop (Brookfield)	Genepop (Dempster)
OJ5	0.0205	0.0249	0.0117	0.0489
OJ10	0.0201	0.0151	0.0131	0.0480
OJ85	0.0222	0.0229	0.0175	0.0288
OJ187	0.0072	0.0115	0.0105	0.0197
OJ338	0.0220	0.0388	0.0222	0.0186
OJ100	0.0690	0.0757	0.0431	0.1280
OJ70	0.0138	0.0254	0.0007	0.0397

3.2 Parametri populacijske strukture

Z zgoraj navedenimi računalniško-statističnimi programi smo naredili analizo naslednjih parametrov: opaženo in pričakovano heterozigotnost, Hardy-Weinbergovo ravnotežje, koeficient parjenja v sorodstvu, število alelov in bogastvo alelov. Rezultate smo pridobili za posamezno populacijo japonskega komarja v Sloveniji (Preglednica 6). Rezultate za posamezne parametre smo komentirali v nadaljnjem besedilu.

Preglednica 6: V spodnji preglednici so zbrani rezultati za a) N – število vzorcev, b) He – pričakovana heterozigotnost, c) Ho – opažena heterozigotnost, d) HW – Hardy-Weinbergovo ravnotežje (p-vrednosti), e) Fis – koeficient parjenja v sorodstvu, f) NA – število alelov, g) AR – bogastvo alelov za posamezno populacijo japonskega komarja. Zelena barva prikazuje populacije, pri katerih je He večja od Ho, rumena barva pa prikazuje populacijo, ki odstopa od HW ravnotežja. Poudarjen Fis prikazuje populacije pri katerih ni prisotno parjenje v sorodstvu.

Populacija	N	He	Ho	HW	F _{IS}	NA	AR
Bohinjska Bela	10	0.383	0.371	0.603	0.082	3.000	2.390
Bistrica ob Sotli	12	0.542	0.583	0.221	-0.033	4.714	3.190
Črna na Koroškem	22	0.544	0.584	0.164	-0.051	4.143	2.880
Grosuplje	16	0.515	0.477	0.960	0.107	3.714	2.772
Hodoš	13	0.548	0.517	0.932	0.097	4.429	3.099
Ilirska Bistrica	4	0.464	0.679	0.025	-0.341	2.714	2.714
Idrija	18	0.443	0.484	0.169	-0.064	3.143	2.353
Kočevje	20	0.455	0.413	0.936	0.119	3.429	2.493
Lendava	9	0.541	0.571	0.311	0.002	3.857	2.938
Ptuj	8	0.575	0.661	0.352	-0.084	4.143	3.268
Slovenska Bistrica	15	0.559	0.562	0.930	0.029	4.429	3.075
Šentilj	14	0.595	0.666	0.103	-0.082	5.286	3.422
Solčava	13	0.488	0.495	0.712	0.026	4.714	2.946
Vransko	6	0.514	0.595	0.245	-0.068	3.286	2.959

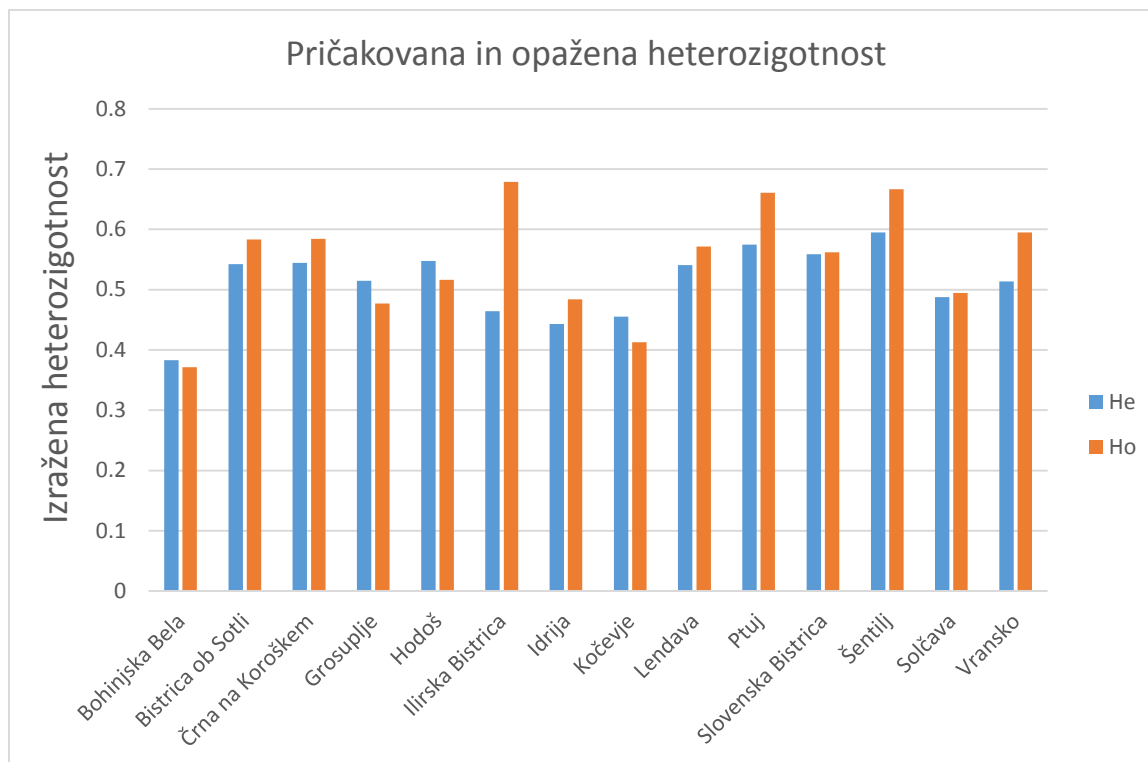
P<0,05 za HW in F_{IS} (pred popravkom Bonferroni).

3.3 HW test heterozigotnosti

Pri izračunu HW ravnotežja smo v vseh populacijah dobili p-vrednosti nad 0,05, razen pri populaciji Ilirske Bistrice smo dobili p-vrednost 0,025 (preglednica 4). Ta populacija torej ni v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, kar pomeni, da ima manj heterozigotov, kot bi bilo pričakovano, saj obstaja možnost, da se je v tej populaciji zgodilo parjenje v sorodstvu. Druga bolj verjetna razlaga pa je ta, da so rezultati taki zaradi samo štirih vzorcev iz te populacije.

3.4 Pričakovana in opažena heterozigotnost

Pri štirih populacijah je opažena heterozigotnost manjša od pričakovane (Preglednica 4, Slika 9). Te populacije so: Bohinjska Bela, Grosuplje, Hodoš, Kočevje. To kaže na to, da je v teh populacijah prisotno parjenje v sorodstvu. Pri ostalih populacijah je opažena heterozigotnost večja od pričakovane.



Slika 9: Razmerje med opaženo in pričakovano heterozigotnostjo.

3.5 Fiksacijski indeksi

3.5.1 F_{IS}

Negativne vrednosti F_{IS} so se pojavile v naslednjih populacijah: Bistrica ob Sotli, Črna na Koroškem, Ilirska Bistrica, Idrija, Ptuj, Šentilj, Vransko (Preglednica 4). To pomeni, da je v teh populacijah parjenje v sorodstvu manj prisotno in zato je več heterozigotnih osebkov. Vse ostale populacije so imele F_{IS} pozitiven.

3.5.2 F_{ST} indeks

Vrednosti F_{ST} med populacijami prikazuje preglednica 7.

Preglednica 7: F_{ST} med populacijami. Rumeno je označen najvišji F_{ST} , zeleno je označeno najnižji F_{ST} .

pop	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
2	0.041												
3	0.049	0.040											
4	0.102	0.045	0.099										
5	0.063	0.054	0.074	0.055									
6	0.161	0.023	0.092	0.119	0.112								
7	0.172	0.137	0.173	0.102	0.169	0.258							
8	0.135	0.068	0.081	0.114	0.118	0.156	0.149						
9	0.056	0.071	0.041	0.122	0.046	0.073	0.215	0.146					
10	0.076	-0.007	0.055	0.026	0.052	0.032	0.135	0.102	0.080				
11	0.067	0.002	0.055	0.050	0.077	0.044	0.130	0.053	0.076	0.014			
12	0.050	-0.013	0.039	0.021	0.032	0.049	0.122	0.057	0.058	-0.014	0.003		
13	0.034	0.020	0.017	0.065	0.042	0.101	0.123	0.031	0.054	0.043	0.035	0.032	
14	0.101	0.021	0.086	0.081	0.099	0.059	0.135	0.094	0.081	0.028	0.023	0.026	0.075

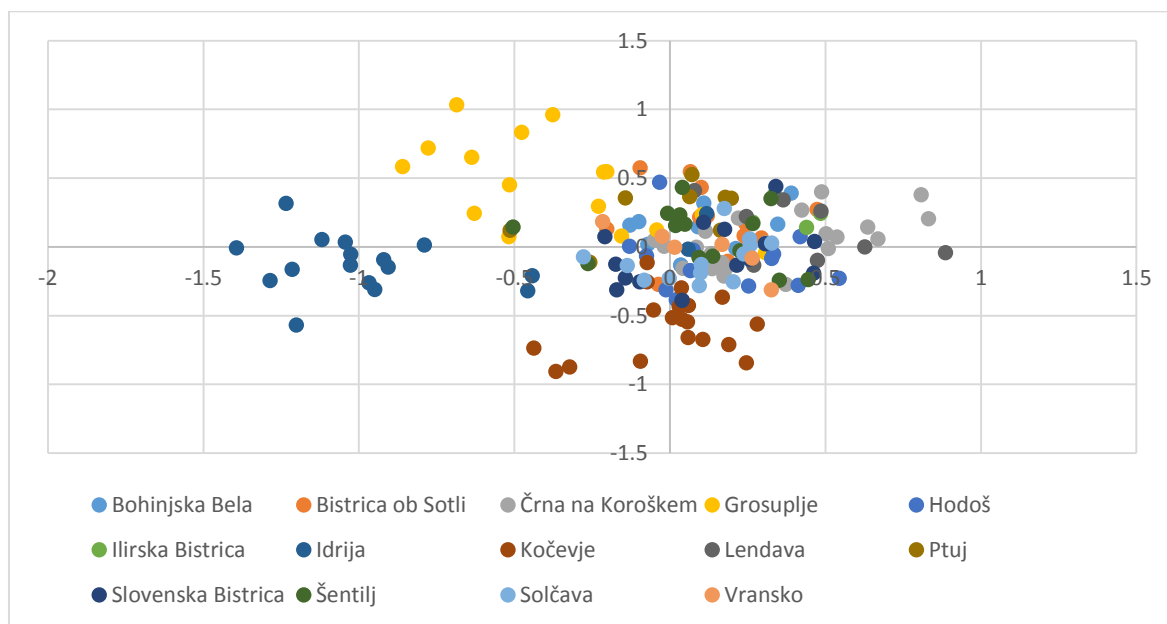
Med nekaterimi populacijami so se pojavile negativne vrednosti, kar kaže na pojav Wahlundovega efekta. To se je zgodilo med: Bistrico ob Sotli in Ptujem, med Bistrico ob Sotli in Šentiljem in med Ptujem in Šentiljem. To pomeni, da so si te populacije med seboj najbolj podobne, kar lahko delno apliciramo na njihovo geografsko bližino. Med populacijami v Idriji in Ilirski Bistrici je F_{ST} največji, kar kaže na največjo razliko med tema dvema populacijama.

3.6 Bogastvo alelov

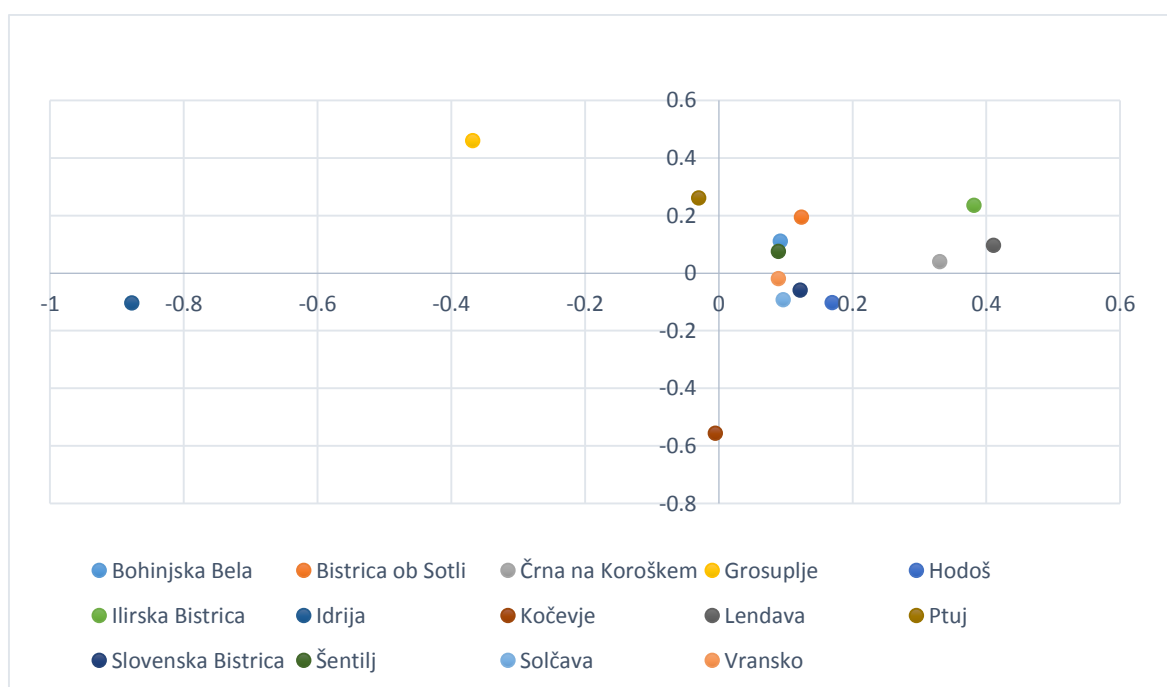
Za analizo bogastva alelov smo uporabili (angl. rarefaction) metodo (Leberg, 2002), ki nam bogastvo alelov izračuna glede na populacijo z najmanjšim številom vzorcev. V našem primeru je to bila populacija iz Ilirske Bistrice, ki je imela štiri vzorce. Število alelov se giblje med 2,71 do 5,28 (povprečna vrednost je 4,07). Bogastvo alelov se giblje med 2,35 in 3,42 (povprečna vrednost je 2,91). Opazimo lahko tudi, da je v populaciji Ilirske Bistrice število alelov in bogastvo alelov enako (preglednica 4). To si lahko razlagamo z majhnim številom vzorcev, ki smo jih analizirali pri tej populaciji. Glede na te podatke lahko sklepamo, da smo zajeli kar dober izbor alelov glede na število vseh alelov v populaciji. Po drugi strani vidimo, da imamo vse lokuse polimorfne, saj imajo več različnih alelov.

3.7 Genetska razdalja

Grafa genetske razdalje med posameznimi osebkami (slika 10) in genetske razdalje med populacijami (slika 11) nam kažeta, da so populacije v Grosuplju, Kočevju in Idriji najbolj oddaljene od ostalih. Ostale populacije so si na podlagi Nei-jeve genetske razdalje precej blizu. Ti podatki se skladajo z njihovo geografsko lokacijo.



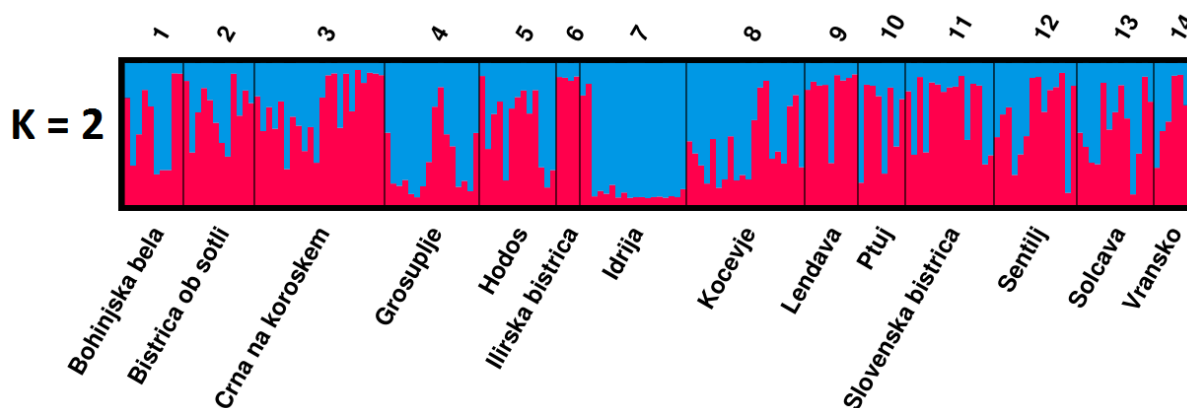
Slika 10: Genetska razdalja na podlagi Nei-jeve genetske razdalje med posameznimi osebki. Os x ima varianco 7,21% in os y ima varianco 5,38%.



Slika 11: Genetska razdalja na podlagi Nei-jeve genetske razdalje med populacijami. Os x ima varianco 25,46% in os y ima varianco 13,52%.

3.7 Populacijska struktura

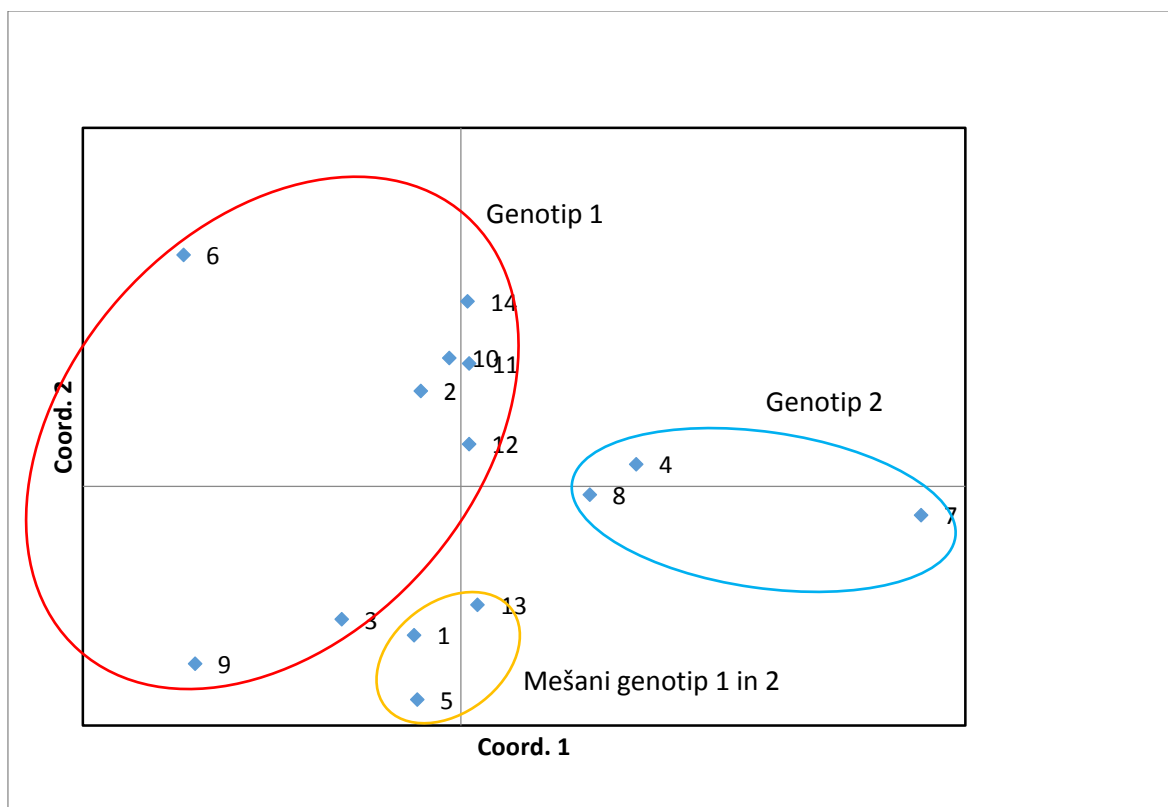
Program Structure Harvester je pokazal, da je najbolj verjeten model za $K = 2$ (Slika 13). K pomeni klaster. Iz podatka za $K=2$ lahko vidimo, da ima slovenska populacija japonskega komarja 2 genotipa, kar se sklada z evropskimi populacijami. Na podlagi rezultatov iz Structure Harvester smo izrisali sliko populacijske strukture (slika 14). Genotip 1 je označen z modro barvo in genotip 2 z rdečo. Idrijska populacija izstopa, saj kaže na prisotnost večinoma genotipa 1. Tudi populaciji v Grosuplju in Kočevju imata več genotipa 1 kot 2. V populacijah Ilirske Bistrice, v Črni na Koroškem, Lendavi, Ptuju in Slovenski Bistrici prav tako genotip 2 prevladuje. V ostalih populacijah sta genotipa 1 in 2 prisotna v približno enakem razmerju.



Slika 12: Slika populacijske strukture iz programa Distruct. Modra = genotip 1 in rdeča = genotip 2.

V študiji populacijske strukture japonskega komarja v zahodni Nemčiji so Zielke in sod. (2014) ugotovili nepričakovano mešanje obeh genotipov. Prvotno je na tem območju prevladoval genotip 2, rezultati te raziskave pa kažejo na prisotnost dveh genotipov. Sklepali so, da je prišlo do dvakratnega vnosa vrste z različnima genotipoma iz različnih območij v okolico Bona in nato širjenja na druga območja v zahodni Nemčiji. V raziskavi Zielke in sod. iz leta 2015, v katero so bili vključeni tudi osebki iz slovenskih populacij, so ugotovili, da naj bi v Sloveniji večinoma prevladoval genotip 1. V to raziskavo so bili vključeni osebki iz leta 2013. V našo študijo smo vključili vzorce iz leta 2015. V to smo vključili vzorce iz že obdelanih populacij ter tudi nove populacije. Podobno kot v Nemčiji, smo tudi pri nas ugotovili mešanje dveh genotipov. Primerjali smo sliko populacijske strukture iz raziskave Zielke in sod. 2015 in ugotovili, da je bil za slovenske populacije v njihovi raziskavi ugotovljen en genotip v naši pa smo dobili dva. Verjetni razlagi za to sta, da smo v našo raziskavo vključili več osebkov na posamezno populacijo v primerjavi z raziskavo Zielke in sod. iz leta 2015, zato smo tudi zajeli večjo genetsko pestrost populacij. Druga možna razlaga pa je ta, da je prišlo do večkratnih vnosov vrste z različnima genotipoma na naše območje.

Graf glavnih koordinat (PCoA) (Slika 14) smo naredili s programom GenAlEx. Rezultati kažejo na grobo delitev populacij glede na to, kateri genotip prevladuje v posamezni populaciji. V nadaljevanju so prikazani tudi rezultati pridobljeni s programom STRUCTURE. Rezultati se med seboj skoraj povsem skladajo. Razvrstitve v skupine so bile narejene na podlagi preglednice 8, ki prikazuje vrednosti Q . Ta nam pove delež prisotnega genotipa v posamezni populaciji.



Slika 13: Prikaz PCoA med populacijami (označene s številko) v programu GenAlEx 6.5.: 1 – Bohinjska Bela, 2 – Bistrica on Sotli, 3 – Črna na Koroškem, 4 – Grosuplje, 5 – Hodoš, 6 – Ilirska Bistrica, 7 - Idrija, 8 – Kočevje, 9 – Lendava, 10 – Ptuj, 11 – Slovenska Bistrica, 12 – Šentilj, 13 – Solčava, 14 – Vrsko

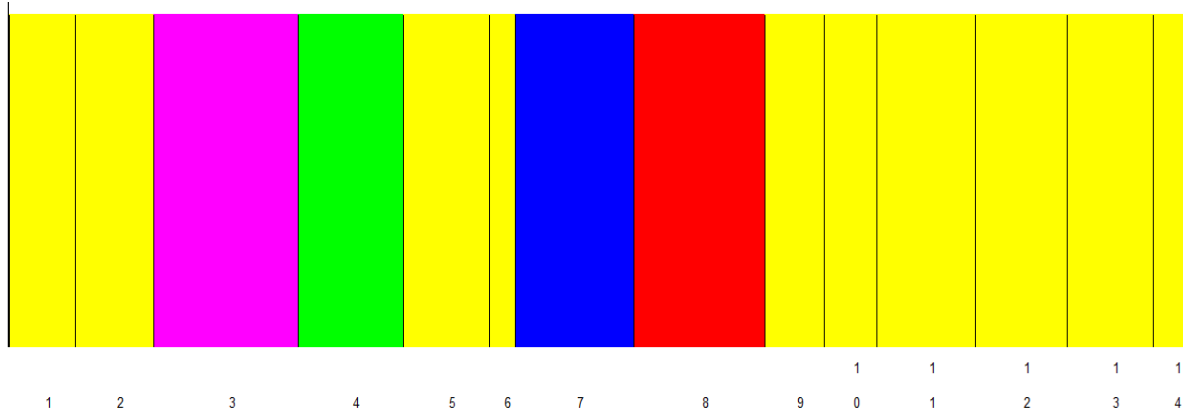
Preglednica 8: Q vrednosti za $K = 2$, ki nam nakazujejo kateremu klastru pripada posamezna populacija. Podatki so pridobljeni s programom STRUCTURE 2.3.4.

pop	Nakazan klaster		število osebkov
	1	2	
1	0.444	0.556	10
2	0.336	0.664	12
3	0.310	0.690	22
4	0.692	0.308	16
5	0.446	0.554	13
6	0.102	0.898	4
7	0.848	0.152	18
8	0.598	0.402	20
9	0.189	0.811	9
10	0.390	0.610	8
11	0.309	0.691	15
12	0.361	0.639	14
13	0.458	0.542	13
14	0.345	0.655	6

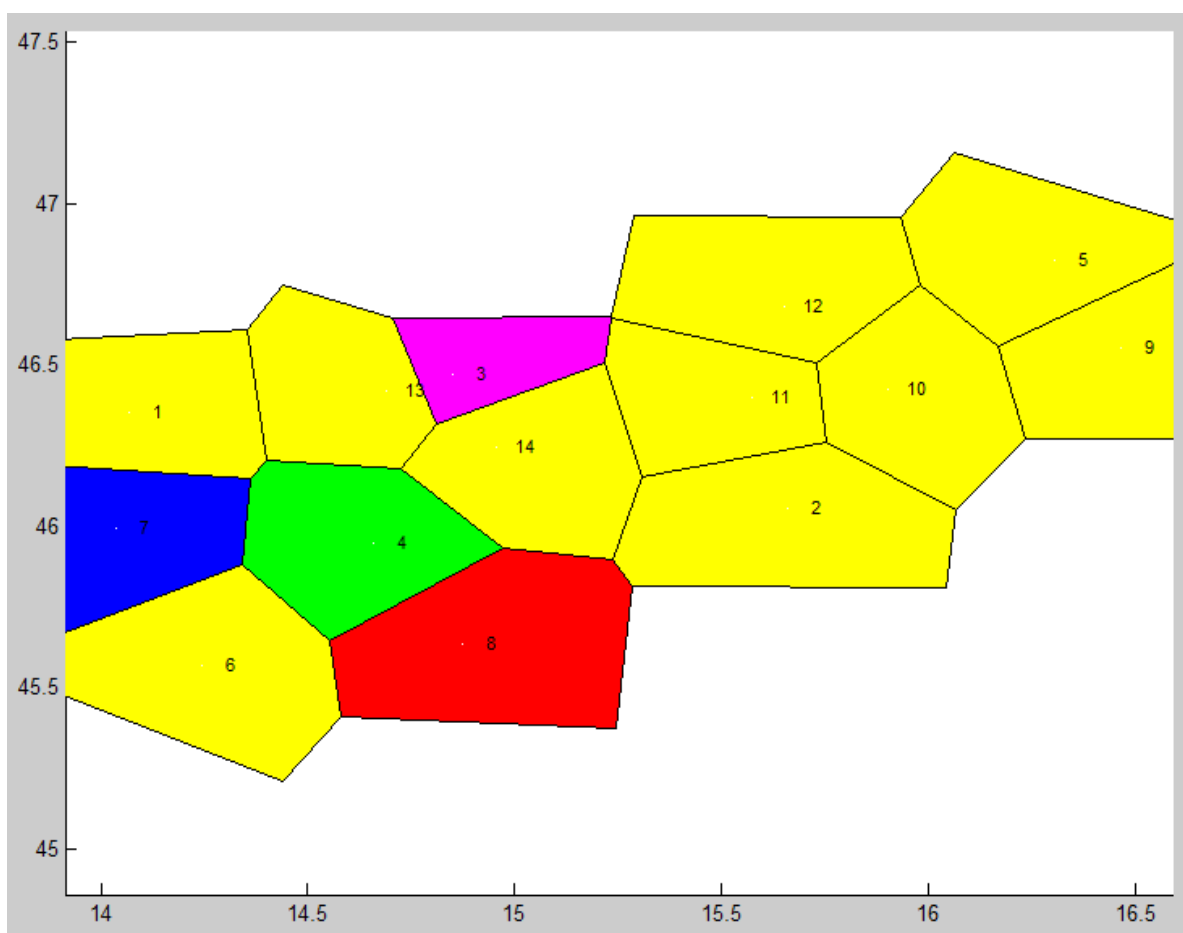
3.8 Populacijska struktura v prostoru

Populacijsko strukturo v prostoru smo analizirali v programu BAPS 6, kjer smo izbrali opcijo "Spatial clustering of groups za Population mixture analysis". Dobili smo dve sliki. Slika 15 nam kaže samo populacijsko strukturo podobno kot slika 14, Slika 16 pa nam kaže populacijsko strukturo v prostoru.

Druga slika je vezana na koordinate in zato ima približno obliko Slovenije. Populacije z enako barvo so si med seboj podobne. Analiza je pokazala prisotnost 5 klastrov. Večina populacij na vzhodu države je označenih z rumeno barvo, ko pa gremo proti zahodu so populacije, ki so pobarvane z drugimi barvami. Različno pobarvane populacije so: Idrija, Kočevje, Grosuplje in Črna na Koroškem. Ti podatki pa se skladajo z grafom Nei – jeve genetske razdalje, saj so bile ravno te populacije najbolj oddaljene od povprečja.



Slika 14: Slika populacijske strukture v programu BAPS6. 1 – Bohinjska Bela, 2 – Bistrica on Sotli, 3 – Črna na Koroškem, 4 – Grosuplje, 5 – Hodoš, 6 – Ilirska Bistrica, 7 - Idrija, 8 – Kočevje, 9 – Lendava, 10 – Ptuj, 11 – Slovenska Bistrica, 12 – Šentilj, 13 – Solčava, 14 - Vransko



Slika 15: Slika populacijske strukture prostoru v programu BAPS6. 1 – Bohinjska Bela, 2 – Bistrica on Sotli, 3 – Črna na Koroškem, 4 – Grosuplje, 5 – Hodoš, 6 – Ilirska Bistrica, 7 - Idrija, 8 – Kočevje, 9 – Lendava, 10 – Ptuj, 11 – Slovenska Bistrica, 12 – Šentilj, 13 – Solčava, 14 - Vransko

4 ZAKLJUČKI

Zaradi vse večje globalizacije po celem svetu se s človekom hitro širijo tudi živalske vrste, ki na novem območju lahko postanejo invazivne. Prisotnost invazivne vrste na nekem območju ima številne negativne posledice in zato je pomembno, da poznamo potencialne habitate in razširjenost invazivnih vrst. Z analizo populacijske strukture lahko ugotovimo kako stabilne so te populacije. Populacijsko strukturo se da določiti s pomočjo genotipizacije mikrosatelitnih lokusov, ki poteka s fragmentno analizo. Uspešnost fragmentne analize smo preverjali z izračunom ničelnih alelov. Samo na enem lokusu smo zaznali verjetnost obstoja ničelnih alelov. Sklepali smo lahko, da je bila laboratorijska analiza uspešna in da so bili vsi lokusi primerni za nadaljnje analize. Širjenje japonskega komarja je potekalo od vzhoda proti zahodu države, kar je opisano v predhodni študiji (Kalan in sod., 2017). Ta podatek se sklada tudi z našo populacijsko analizo, saj smo zaznali, da se populacije v smeri širjenja genetsko med seboj vedno bolj razlikujejo. V Evropi sta za japonskega komarja ugotovljena dva genotipa in tudi za Slovensko populacijo smo ugotovili enako. Na podlagi slike 12 populacijske strukture lahko sklepamo, da se genetska diverziteteta počasi izgublja, saj je v zahodnejših populacijah bolj prisoten samo en genotip, medtem ko se pri vzhodnejših populacijah pojavljata oba genotipa v skoraj enakem razmerju. Najbolj zahodni populaciji v naši študiji sta v Idriji in Ilirski Bistrici. Pri obeh smo opazili, da en genotip prevladuje in da je drugi prisoten v zelo majhni frekvenci. V Idriji je prisoten večinoma genotip 1 in v Ilirski Bistrici večinoma genotip 2. Ti dve populaciji sta si tudi najbolj oddaljeni na podlagi Nei – jeve genetske razdalje in subpopulacijskega indeksa (F_{ST}). Za populacijo Ilirske Bistrice je HW test pokazal, da odstopa od HW ravnotežja, kar lahko razjasnimo z majhnim številom analiziranih vzorcev. Za to populacijo bi bilo v prihodnje potrebno vzeti večje število vzorcev, da bi videli, če bi prišlo do kakšnih razlik. Da je bilo vzeto premajhno število vzorcev nam pokaže tudi podatek o bogastvu alelov, ki je enak celotnemu naboru alelov v populaciji. S tem smo delno potrdili našo prvo hipotezo, kjer smo predpostavljali, da se genetska diverziteteta izgublja vzdolž širjenja vrste. Izguba genetske diverzitetete pa se pokaže tudi z razmerjem med med opaženo in pričakovano heterozigotostjo. V štirih populacijah (Bohinjska Bela, Grosuplje, Hodoš in Kočevje) je opažena heterozigotnost manjša od pričakovane, kar nakazuje na parjenje v sorodstvu v teh populacijah. Sokrvje pa lahko pripelje do zmanjšane heterozigotnosti osebkov in v naslednjih populacijah se posledično pojavi genetski zdrs. Kočevje in Grosuplje sta precej proti jugozahodu in s tem dokazujemo, da se heterozigotnost počasi izgublja vzdolž širjenja.

Na podlagi slike 15, ki smo jo dobili s programom BAPS lahko opazimo, da so si populacije na jugozahodu bolj različne med sabo in da je genski pretok med njimi manjši. Prisotna diferenciacija lahko v prihodnosti pripelje do razlik med populacijami. Po drugi strani pa opazimo, da so si na vzhodu države populacije med seboj genetsko zelo podobne, saj med njimi poteka tudi nemoten genski pretok, kar nam je pokazal subpopulacijski indeks (F_{ST}).

Ta je bil med nekaterimi populacijami celo negativen (normalno ima vrednosti med 0 in 1), kar kaže na pojav Wahlundovega efekta, ki nam pove, da je med temi populacijami genski pretok zelo velik in to nakazuje na prisotnost subpopulacij. Te populacije so torej zelo stabilne in imajo veliko genetsko diverzitetu. Na podlagi teh sklepov lahko potrdimo drugo hipotezo, ki pravi, da so populacije genetsko strukturirane.

Študije populacijske strukture invazivnih vrst so koristne, saj s temi lahko sklepamo na to, kako in iz kje so se te na neko območje razširile. S tem dobimo koristne informacije, ki nam pomagajo pri boju s takimi vrstami, saj lahko na podlagi genetske strukture sprejmemo ustrezne ukrepe. Populacije iste vrste imajo lahko različen genetski zapis, ta pa lahko določa stopnjo njihove invazivnosti ter v primeru komarjev tudi njihovo sposobnost za prenos različnih povzročiteljev bolezni. Z našo raziskavo smo pridobili pomembne podatke o genetski strukturiranosti japonskega komarja v Sloveniji, kar bo dobra osnova za nadaljnje akcijske plane za boj s to vrsto.

5 LITERATURA IN VIRI

- ADW, Animal Diversity Web. http://animaldiversity.org/accounts/Aedes_japonicus/classification/ (Datum dostopa: 5.8. 2018).
- B. Kryštufek 1999. Osnove varstvene biologije. Tehniška založba Slovenije.
- Beier, J. C., C. Patricoski, M. Travis, and J. Kranzfelder. 1983. Influence of water chemical and environmental parameters on larval mosquito dynamics in tires. *Environ. Entomol.* 12: 434-438.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, and F. Bonhomme. 1996–2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Brookfield J. F. Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455
- Chapuis M. P., and A. Estoup 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24(3):621–631.
- Corander, J., J. Sirén, and E. Arjas. 2008. Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Computational Statistics* 23:111–129.
- Corander, J., Waldmann, P. and Sillanpää, M. J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163, 367-374.
- Dakin E. E and J. C. Avise 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93: 504–509.
- Dempster A. P., Laird N. M., Rubin D. B. 1977. Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society*.
- Derraik, J. G. B. 2004. Exotic mosquitoes in New Zealand: a review of species intercepted, their pathways and ports of entry. *Aust. N. Z. J. Public Health*. 28: 433–444.
- Earl D. A., von Holdt B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359-361.
- ECDC, European Centre of Disease Prevention and Control. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-japonicus-current-known-distribution-june-2018>. (Datum dostopa: 5.8. 2018).
- ECDC, European Centre of Disease Prevention and Control. <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/aedes-japonicus>. (Datum dostopa: 5.8. 2018).

- ECDC, European Centre of Disease Prevention and Control. <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/public-health-importance-invasive-mosquitoes-europe>. (Datum dostopa: 5.8. 2018).
- 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.
- Fonseca, D.M., Widdel, A.K., Hutchinson, M., Spichiger, S.E. & Kramer, L.D. (2010) Fine-scale spatial and temporal population genetics of *Aedes japonicus*, a new US mosquito, reveal multiple introductions. *Molecular Ecology* 19, 1559-1572.
- Foulley J.-L., L. Ollivier 2006. Estimating allelic richness and its diversity. Elsevier B.V.
- Frankham R., J. D. Ballou, D. A. Briscoe, 2010. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press.
- Fred W. Allendorf and Gordon H. Luikhart 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Oxford, Blackwell Publishing.
- GISD (Global invasive species database). <http://www.iucngisd.org/gisd/speciesname/Ochlerotatus+japonicus+japonicus>. (Datum dostopa: 5.8.2018)
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a programme to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>. (Datum dostopa: 5.8. 2018).
- Guo S. W, Thompson E. A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*.48(2):361-72.
- Hughes A. R., B. D. Inouye, M. T. J. Johnson, N. Underwood and M. Vellend, 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, (2008) 11: 609–623.
- Ibañez-Justicia, A., H. Kampen, M. Braks, F. Schaffner, M. Steeghs, D. Werner, D. Zielke, W. den Hartog, M. Brooks, M. Dik, et al. 2014. First report of established population of *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) in the Netherlands. *J. Eur. Mosq. Control Assoc.* 32: 9–13.
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23(14): 1801-1806.
- Kalan K., Ivović V., Glasnović P., Buzan E. 2017a. Presence and Potential Distribution of *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Slovenia. *Journal of medical entomology*, 54(6), 1510-1518.
- Kampen, H., D. Zielke, and D. Werner. 2012. A new focus of *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901) (Diptera, Culicidae) distribution in Western Germany: rapid spread or a further introduction event? *Parasit. Vectors.* 5: 284.
- Kaufman, M. G., and D. M. Fonseca. 2014. Invasion Biology of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae). *Annu. Rev. Entomol.* 59: 31–49.

- Kaufman, M. G., and D. M. Fonseca. 2014. Invasion Biology of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae). *Annu. Rev. Entomol.* 59: 31–49.
- Knudsen, A. B. 1995. Global distribution and continuing spread of *Aedes*
- Kent E. Holsinger. 2014. *Lecture Notes in Population Genetics*. University of Connecticut.
- Krebs, T., P. Bindler, G. L. Ambert, C. Toty, Y. Perrin, and F. Jourdain. 2013. First establishment of *Aedes japonicus japonicus* in France in 2013 and its impact on public health. *J. Vector Ecol.* 39: 437–440.
- Laird, M., L. Calder, R. C. Thornton, R. Syme, P. W. Holder, and M. Mogi. 1994. Japanese *Aedes albopictus* among four mosquito species reaching New Zealand in used tires. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10: 14–23.
- Leberg P. L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology*: 2445-2449.
- Medlock J.M., K.M. Hansford¹, V. Versteirt, B. Cull¹, H. Kampen, D. Fontenille, G. Hendrickx, H. Zeller, W. Van Bortel and F. Schaffner 2015. An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bulletin of Entomological Research* 105: 637–663
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat* 106: 283-292.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3): 583-590.
- Oosterhout C. V., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills and P. Shipley 2004. MICRO - CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Blackwell Publishing.
- Peakall R., Smouse P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537-2539.
- Peyton, E. L., S. R. Campbell, T. M. Candeletti, M. Romanowski, and W. J. Crans. 1999. *Aedes* (Finlaya) *japonicus japonicus* (Theobald), a new introduction into the United States. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15: 283–241.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(4): 945-959.
- Raymond M. in Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86: 248-249.
- Rosenberg N. A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology* 4:137-138.
- Rousset F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Blackwell Publishing.
- Sardelis M. R. Turell M. J. Dohm D. J. O'Guinn M. L. 2001. Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquillettidia* mosquitoes for West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 1018–1022.

- Schaffner F., J. M. Medlock W. Van Bortel 2013. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clinical microbiology and infection* 19: 685-692.
- Schaffner F. 2003. Mosquitoes in used tires in Europe: species list and larval key. *Eur. Mosq. Bull.* 16: 7-12.
- Schaffner F., C. Kaufmann, D. Hegglin and A. Mathis 2009. The invasive mosquito *Aedes japonicus* in Central Europe. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 448-451.
- Schaffner F., M. Vazeille, C. Kaufmann, A.-B. Failloux and A. Mathis 2011. Vector competence of *Aedes japonicus* for chikungunya and dengue viruses. *European Mosquito Bulletin* 29: 141-142
- Schaffner, F., C. Kaufmann, D. Hegglin, and A. Mathis. 2009. The invasive mosquito *Aedes japonicus* in central europe. *Med. Vet. Entomol.* 23: 448-451.
- Schaffner, F., M. Vazeille, C. Kaufmann, A.-B. Failloux, and A. Mathis. 2011. Vector competence of *Aedes japonicus* for chikungunya and dengue viruses. *J. Eur. Mosq. Control Assoc.* 29: 141-142.
- Schaffner, F., S. Chouin, and J. Guilloteau. 2003. First record of *Ochlerotatus* (*Finlaya*) *japonicus japonicus* (Theobald, 1901) in metropolitan France. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19: 1-5.
- Seidel B., Duh D., Nowotny N., Allerberger F. 2012. Erstnachweis der Stechmücken *Aedes* (*Ochlerotatus*) *japonicus japonicus* (Theobald, 1901) in Österreich und Slowenien in 2011 und für *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1895) in Österreich 2012 (Diptera: Culicidae). *Entomologische Zeitschrift* 122: 223-226.
- Seidel B., F. Montarsi, H. P. Huemer, A. Indra, G. Capelli, F. Allerberger, and N. Nowotny. 2016a. First record of the Asian bush mosquito, *Aedes japonicus japonicus*, in Italy: invasion from an established Austrian population. *Parasit. Vectors.* 9: 284.
- Seidel B., N. Nowotny, T. Bakonyi, F. Allerberger, and F. Schaffner. 2016b. Spread of *Aedes japonicus japonicus* and first records of the subspecies for Hungary, 2012, and the principality of Liechtenstein, 2015. *Parasit. Vectors.* 9: 1-7.
- Tanaka K., Mizusawa K., Saugstad E. S. 1979. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Army medical lab pacific APO San Francisco*, 96343.
- Tanaka, K., K. Mizusawa, and E. S. Saugstad. 1979. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contrib. Ameri. Ent. Inst.* 16: 1-987.
- Theobald. F. V. 1901. The clasiffication of mosquitoes. *The journal of tropical medicine.*
- Thielman, A., and F. F. Hunter. 2006. Establishment of *Ochlerotatus japonicus* (Diptera: Culicidae) in ontario, canada. *J. Med. Entomol.* 43: 138-142.

- Versteirt, V., F. Schaffner, C. Garros, W. Dekoninck, M. Coosemans, and W. Van Bortel. 2009. Introduction and establishment of the exotic mosquito species *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium. *J. Med. Entomol.* 46: 1464–1467.
- Weir BS, Cockerham CC.. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* 38: 1358-1370
- WHO, World Health Organization. 2014. Dengue control - Environmental control. http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/environmental_management/en / (Datum dostopa: 5.8. 2018).
- WHO, World Health Organization. 2018. Mosquito-borne diseases. http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/en/ (Datum dostopa: 5.8. 2018).
- Widdel A. K., Mccuiston L.J., Crans W. J., Kramer L. D. and Fonseca D. M. 2005. Finding needles in the haystack: single copy microsatellite loci For *aedes japonicus* (diptera: culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(4): 744–748.
- Zielke D. E, Werner D, Schaffner F, Kampen H, Fonseca DM (2014) Unexpected Patterns of Admixture in German Populations of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) Underscore the Importance of Human Intervention. *PLoS ONE* 9(7): e99093. doi:10.1371/journal.pone.0099093
- Zielke D. E., D. Walther and H. Kampen 2016. Newly discovered population of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in Upper Bavaria, Germany, and Salzburg, Austria, is closely related to the Austrian/ Slovenian bush mosquito population. *Parasites & Vectors* 9:163.
- Zielke D. E., Ibáñez-Justicia A., Kalan K., Merdić E., Kampen H., Werner D. 2015. Recently discovered *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) populations in The Netherlands and northern Germany resulted from a new introduction event and from a split from an existing population. *Parasites & vectors* 8(1): 40

PRILOGA

Priloga A: Zaokrožene dolžine mikrosatelitnih lokusov.

ime vzorca	OJ10 (114-137)		OJ5 (144-157)		OJ187 (135-157)		OJ85 (161-173)		OJ 338 (134-179)		OJ100 (180-189)		OJ70 (186-212)	
BB_2_1	124	124	149	149	141	150	170	170	140	149	181	185	206	206
BB_2_2	124	124	146	149	141	141	170	170	140	143	181	181	206	206
BB_2_3	124	127	140	149	150	150	170	170	146	149	181	185	206	206
BB_2_4	124	136	140	149	150	150	170	170	149	167	181	187	206	206
BB_2_5	124	127	149	149	141	150	170	170	146	149	193	193	206	206
BB_2_6	121	124	149	149	141	141	170	170	140	161	181	181	206	206
BB_2_9	124	124	149	149	141	141	170	170	143	161	181	181	206	206
BB_3_2	124	124	149	149	141	141	170	170	143	161	181	181	206	206
BB_3_3	124	136	140	149	141	150	170	170	149	149	185	193	206	206
BB_3_4	124	136	149	149	150	150	170	170	149	149	185	193	206	206
BOS_2_1_1	124	124	143	149	150	150	170	170	143	164	181	185	206	209
BOS_2_2	124	127	137	149	141	150	164	170	146	176	181	185	206	212
BOS_5_1	124	127	149	149	150	150	164	170	146	164	185	193	206	206
BOS_5_2	121	124	137	149	141	150	170	170	140	164	185	193	206	206
BOS_6_3	124	136	146	152	141	141	164	170	161	167	181	185	200	212
BOS_6_5	124	124	149	149	141	141	164	170	161	164	181	185	206	206
BOS_6_6	124	124	146	146	141	150	170	170	143	167	181	185	206	206
BOS_7_1_	124	124	149	149	150	150	170	170	140	143	181	187	206	206
BOS_7_2_	124	136	149	149	141	141	170	170	143	158	185	185	209	212
BOS_7_4	124	127	140	149	141	150	164	170	140	155	185	191	206	206
BOS_7_5	124	124	149	149	150	150	170	170	149	155	185	185	206	206
BOS_7_6	121	124	140	149	141	150	170	170	149	161	185	191	206	206
CK_1_1	124	136	140	149	141	141	170	170	143	143	187	193	206	206
CK_1_2	121	124	149	149	141	150	170	170	140	149	181	187	206	206

CK_3_1	121	121	137	149	150	150	164	170	143	146	187	193	206	209
CK_3_2	121	124	137	149	141	150	164	170	140	161	187	193	206	206
CK_3_3	124	124	149	149	141	150	164	170	146	164	187	193	206	209
CK_3_4	121	124	149	149	150	150	164	170	146	146	181	187	206	206
CK_3_5	124	124	137	149	150	150	170	170	146	164	187	193	206	206
CK_3_6	121	121	149	149	150	150	170	170	143	146	187	193	206	209
CK_3_7	121	124	149	149	150	150	164	170	146	146	181	187	206	209
CK_3_8	124	124	149	149	141	150	170	170	146	164	181	185	206	206
CK_3_8	124	124	149	149	141	150	170	170	146	146	181	185	206	206
CK_3_9	124	124	140	143	141	150	170	170	146	146	181	193	203	206
CK_6_1	124	124	137	140	141	150	164	170	149	149	187	193	203	206
CK_6_2	124	124	137	149	150	150	170	170	149	149	181	193	200	206
CK_6_4	121	124	143	149	141	150	170	170	140	161	187	193	206	206
CK_6_5	124	124	140	149	141	150	164	170	149	149	185	193	206	206
CK_6_6	121	121	149	149	141	150	170	170	143	161	185	193	206	209
CK_6_7	124	124	137	149	141	150	164	170	149	149	185	191	200	203
CK_7_1	124	124	149	149	141	150	170	176	149	158	181	187	206	209
CK_7_2	124	124	149	149	141	159	170	176	149	149	181	193	206	209
CK_7_3	124	136	137	149	141	150	170	176	143	149	181	191	206	209
CK_7_4	124	124	149	149	141	150	170	170	149	149	181	193	203	206
GROS_3_2_1	121	124	146	149	141	150	170	170	149	161	185	185	206	206
GROS_3_2_2	124	124	146	146	141	150	170	170	161	176	185	185	206	206
GROS_3_2_4	121	127	146	152	150	150	170	170	161	176	181	185	206	209
GROS_3_2_5	124	127	146	152	141	141	170	170	161	176	185	185	206	209
GROS_3_2-3	124	127	146	152	141	150	170	170	-9	-9	187	187	206	206
GROS_3_2-3	124	127	146	152	141	150	170	170	161	176	187	187	206	206
GROS_4_2_1	127	127	146	146	141	141	170	173	143	146	181	185	206	212
GROS_4_2_2	124	127	146	149	150	150	170	170	146	176	185	191	206	212

GROS_6_1	121	124	152	152	141	150	170	170	149	182	181	185	206	206
GROS_6_2	121	121	149	149	141	150	170	170	143	149	185	193	206	206
GROS_6_3	124	124	146	152	141	150	170	170	149	176	185	185	206	212
GROS_6_4	124	124	140	140	141	141	170	170	146	149	187	187	206	206
GROS_6_5	127	127	146	149	150	150	170	170	146	149	187	187	206	206
GROS_6_6	124	124	149	149	141	141	170	170	161	176	-9	-9	206	206
GROS_6_6	124	124	149	149	141	141	170	170	161	176	187	187	206	206
GROS_6_8	124	124	146	149	141	150	170	170	140	143	187	193	206	212
HOD_1_3	133	136	140	149	141	150	170	170	143	149	181	185	203	206
HOD_1_4	127	127	137	149	141	150	170	170	155	167	181	185	206	206
HOD_1_5	124	124	146	152	141	141	170	170	155	158	185	185	206	212
HOD_1_6	124	124	149	149	141	150	170	170	143	155	181	193	206	212
HOD_1_7	124	124	146	149	141	141	170	170	155	155	181	187	206	206
HOD_2_1	124	124	137	149	141	141	170	170	149	149	187	187	206	206
HOD_2_2	133	136	140	149	141	150	170	170	143	149	181	187	206	206
HOD_2_3	121	124	140	143	141	150	170	173	149	155	187	193	206	206
HOD_2_4	124	124	140	146	126	141	164	170	167	167	181	187	203	203
HOD_2_5	124	124	149	149	141	141	170	170	167	167	181	187	203	203
HOD1_1	121	127	137	140	141	150	170	176	155	161	187	187	206	206
HOD1_2	124	127	140	149	141	141	170	170	155	161	181	187	206	206
HOD2_6	124	124	149	149	141	141	170	170	161	161	181	187	203	206
IB_1	124	124	140	146	150	150	170	170	149	158	185	193	203	206
IB_4_1	124	124	143	149	141	150	164	170	140	149	181	185	206	212
IB_4_2	124	124	149	149	141	150	164	170	149	155	185	185	206	212
IB_4_3	124	124	143	149	141	150	164	170	149	155	185	185	206	212
ID_2_1	121	124	140	149	150	150	170	170	140	143	185	193	206	206
ID_2_2	121	136	143	149	150	150	170	170	140	146	185	193	206	212
ID_2_2_10	124	127	146	149	126	126	170	170	146	161	181	185	206	206

ID_2_2_6	124	127	146	149	126	150	170	170	146	161	185	185	206	206
ID_2_2_7	124	124	146	152	126	150	170	170	161	161	181	185	206	206
ID_2_2_8	124	124	146	149	150	150	170	170	161	161	181	185	206	206
ID_2_2-1	124	124	146	149	126	126	170	170	161	161	181	187	206	206
ID_2_2-11	124	124	146	149	150	150	170	170	161	161	181	187	206	206
ID_2_2-12	127	127	146	149	126	126	170	170	140	146	181	181	206	206
ID_2_2-13	127	127	146	152	126	150	170	170	140	146	181	181	206	206
ID_2_2-14	127	127	146	149	126	150	170	170	140	146	181	187	206	206
ID_2_2-15	124	127	146	152	126	150	170	170	161	161	181	187	206	206
ID_2_2-16	124	127	146	152	150	150	170	170	146	161	187	187	206	206
ID_2_2-4	124	127	146	149	126	150	170	170	140	161	187	187	206	206
ID_2_2-9	124	127	146	149	126	150	170	170	146	161	187	187	206	206
ID_2_3	124	127	146	149	126	150	170	170	146	161	181	181	206	206
ID_2_5	124	127	146	152	126	150	170	170	146	161	181	181	206	206
ID_3_2	124	127	140	152	126	150	170	170	161	161	185	185	206	206
KOC_1_1	124	124	146	149	150	150	164	170	146	161	181	185	203	206
KOC_1_2	124	127	137	149	150	150	170	170	146	146	181	181	203	206
KOC_2_1	124	133	149	149	126	150	170	170	143	161	185	185	206	206
KOC_2_2	121	124	149	149	141	150	170	170	143	161	187	187	206	206
KOC_2_3	121	124	149	149	150	150	170	173	143	161	181	185	206	212
KOC_2_4	121	133	149	149	126	150	170	170	155	161	187	187	206	212
KOC_2_5	121	133	149	149	141	150	170	170	155	161	187	187	206	212
KOC_2_6	121	124	149	149	141	150	170	173	143	161	185	185	206	206
KOC_2_7	121	124	149	149	141	150	170	173	143	161	187	187	206	206
KOC_2_8	121	124	149	149	141	150	170	173	143	161	181	187	206	206
KOC_2_9	124	133	149	149	150	150	170	170	143	161	187	187	206	206
KOC_6_1	124	124	137	137	150	150	170	170	149	161	187	187	203	206
KOC_6_2	124	124	137	149	150	150	170	170	149	161	185	185	203	206

KOC_6_3	124	124	137	149	150	150	170	170	143	143	185	185	203	206
KOC_6_4	124	124	137	149	150	150	170	170	-9	-9	187	187	206	206
KOC_6_4	124	124	137	149	150	150	170	170	143	143	187	187	206	206
KOC_6_5	124	124	149	149	150	150	170	170	143	143	187	187	206	206
KOC_6_6	124	124	149	149	150	150	170	170	143	161	185	185	203	206
KOC_6_8	124	133	137	137	150	150	170	170	143	155	185	185	206	206
KOC_6_9	133	133	149	149	126	141	170	170	155	161	185	185	206	206
LEN_1_1	124	127	143	146	141	150	170	170	149	149	181	181	203	203
LEN_1_2	124	124	137	149	141	150	170	170	149	164	181	181	203	206
LEN_1_3	124	124	137	149	150	150	170	170	149	149	181	181	206	206
LEN_1_4	124	127	143	149	141	150	170	170	149	149	187	193	200	206
LEN_3_1	124	127	149	149	141	141	164	173	143	155	181	187	206	206
LEN_3_3	124	136	149	149	141	141	164	173	149	158	181	187	203	203
LEN_3_4	124	124	149	152	150	150	170	170	149	182	185	193	206	212
LEN_3_5	124	136	149	149	141	150	164	170	149	158	181	187	203	206
LEN_3_6	124	136	149	149	141	150	170	170	149	158	181	193	206	212
PT_1_1	124	127	140	152	150	150	170	173	146	161	181	185	206	206
PT_2_1	124	136	146	149	150	150	170	173	143	164	185	185	206	209
PT_2_1_1	124	127	149	149	141	150	170	170	149	149	185	185	206	209
PT_2_2	124	124	140	149	141	141	170	170	140	155	185	185	206	209
PT_2_3	124	124	140	149	126	141	170	170	140	155	187	187	206	209
PT_4_1	124	124	146	152	141	150	170	173	149	167	185	193	206	209
PT_5_4	124	127	149	152	141	162	164	170	143	146	181	185	206	206
PT_6_1	124	127	143	149	141	150	170	170	146	149	185	193	206	206
SB_1_1	124	124	137	146	141	141	170	170	143	167	185	185	206	209
SB_1_2	121	124	137	146	150	150	170	170	161	167	181	181	206	206
SB_1_3	124	133	143	143	141	141	170	173	149	167	181	185	206	206
SB_1_4	121	124	146	149	141	162	170	173	146	161	185	185	206	206

SB_1_5	121	133	149	152	150	150	170	170	149	158	181	185	200	206
SB_1_6	124	124	149	152	141	141	164	164	143	149	185	185	206	206
SB_3_2	121	124	146	149	141	150	170	170	143	149	185	185	206	209
SB_3_6	124	133	149	149	126	150	170	170	149	158	185	185	200	206
SB_3_7	121	124	149	149	141	150	170	170	143	149	181	185	206	209
SB_3_8	124	133	149	149	150	162	170	170	149	158	181	185	200	206
SB_4_10	121	124	146	149	150	150	170	170	158	161	181	185	206	206
SB_4_11	124	124	149	149	150	150	170	173	158	182	181	185	206	206
SB_4_9	121	124	149	149	150	150	170	173	158	182	181	185	206	206
SB4_3	124	124	140	146	150	150	170	170	143	143	187	187	206	212
SB4_4	121	124	146	149	150	150	170	170	143	161	187	193	206	212
SEN_1_1	127	127	143	149	141	141	170	173	146	155	181	185	203	206
SEN_1_2	124	136	146	149	141	141	170	173	143	161	181	185	203	206
SEN_1_3	121	124	146	149	141	150	170	170	146	149	185	191	206	212
SEN_1_4	127	133	146	149	141	150	170	170	161	164	175	187	206	206
SEN_1_5	124	124	140	149	141	150	170	173	143	146	175	187	206	206
SEN_1_6	127	130	149	149	141	150	170	170	-9	-9	-9	-9	-9	-9
SEN_2_1	124	136	137	149	141	141	170	170	140	158	185	185	206	206
SEN_2_2	124	124	149	149	141	150	164	170	140	149	185	185	206	209
SEN_2_3	124	124	146	149	141	150	170	170	143	146	185	193	206	209
SEN_3_1	121	124	149	149	150	162	164	170	143	161	185	193	203	206
SEN_3_2	124	124	143	149	141	150	170	170	143	167	181	185	206	206
SEN_4_1	124	136	137	143	150	150	170	170	143	149	181	185	203	206
SEN_4_2	121	127	146	152	141	150	170	170	143	146	187	187	206	212
SEN_4_3	124	124	140	149	150	150	170	170	140	149	185	185	206	206
SOL_1_1	124	127	143	149	141	150	164	170	155	155	181	181	206	206
SOL_1_2	124	124	149	149	150	150	164	170	149	161	187	187	206	206
SOL_1_5	124	124	149	149	141	150	170	170	149	161	187	187	206	206

SOL_5_1	124	124	137	140	141	150	170	170	161	161	181	187	206	209
SOL_5_10	124	136	149	149	141	150	170	170	143	149	181	185	206	206
SOL_5_2	121	124	137	149	141	150	170	170	161	164	181	185	206	206
SOL_5_3	124	124	149	149	150	150	170	170	143	167	181	187	206	209
SOL_5_4	124	124	146	149	150	150	170	170	164	167	185	193	206	209
SOL_5_5	124	124	146	149	150	150	173	176	158	161	181	181	206	212
SOL_5_6	124	127	149	149	141	141	170	170	146	161	187	187	206	206
SOL_5_7	124	133	149	152	141	150	170	170	140	149	187	187	206	206
SOL_5_8	124	124	149	149	150	150	170	170	143	149	185	193	206	209
SOL_5_9	124	124	140	149	141	150	170	170	143	167	187	193	206	206
VRA_1_1	127	136	146	149	141	150	170	170	146	155	181	181	206	206
VRA_1_3	124	127	137	146	150	150	170	170	155	164	181	185	206	209
VRA_1_4	127	136	137	149	141	150	164	170	146	155	181	185	206	206
VRA_2_1	124	133	140	149	150	150	170	170	149	149	185	185	206	212
VRA_2_2	124	133	137	149	150	150	170	170	149	149	185	185	206	212
VRA_2_3	124	124	140	149	150	150	170	170	140	143	181	185	206	212