

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ
BIOTEHNOLOGIJE

Andrej RAZPET

**GENETSKA RAZNOLIKOST SALMONIDOV V
POREČJU NERETVE**

MAGISTRSKO DELO

LJUBLJANA, 2004

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Andrej RAZPET

**GENETSKA RAZNOLIKOST SALMONIDOV V POREČJU
NERETVE**

MAGISTRSKO DELO

**GENETIC DIVERSITY OF SALMONIDS OF THE RIVER
NERETVA DRAINAGE**

M. Sc. THESIS

LJUBLJANA, 2004

Magistrsko delo je bila opravljeno na Biotehniški fakulteti, Oddelek za zootehniko, Inštitut za živinorejo, genetski laboratorij v Domžalah.

Senat biotehniške fakultete je za mentorja magistrskega dela imenoval prof. dr. Petra Dovča.

Mentor: prof. dr. Peter DOVČ

Komisija za oceno in zagovor magistrskega dela:

prof. dr. Jurij POHAR – predsednik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

prof. dr. Peter DOVČ – član

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

doc. dr. Peter TRONTELJ – član

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

dr. Aleš SNOJ – član

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 24. 6. 2004

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Andrej Razpet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Md
- DK UDK 597.5:575.2:577.2.088(043)=863
- KG rod *Salmo*/postrvi/Neretva/genetski markerji/mtDNA/mikrosateliti/
faktorielna korespondenčna analiza/biološka raznolikost
- AV RAZPET, Andrej, univ. dipl. mikrobiol.
- SA DOVČ, Peter (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij
biotehnologije
- LI 2004
- IN GENETSKA RAZNOLIKOST SALMONIDOV V POREČJU NERETVE
- TD Magistrsko delo
- OP XII, 69 str., 11 pregl., 19 sl., 4 pril. 104 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Porečje Neretve predstavlja najpomembnejše s salmonidi naseljeno območje na jugozahodnem Balkanu. Raziskovalci so s pomočjo zunanjih morfoloških znakov tam našli in opisali več simpatričnih vrst salmonidov: *Salmo trutta*, *S. marmoratus*, *S. obtusirostris*, *S. farioides* in *S. dentex*. Zaradi pomanjkljivih opisov in pomanjkanja tipskih primerkov je taksonomski status nekaterih vprašljiv. Izvedli smo genotipizacijo 206-ih primerkov, večinoma iz zgornjega dela porečja Neretve, da bi določili obstoječe taksone v porečju, odnose med njimi in odnose s salmonidnimi taksoni iz drugih porečij. Ugotovili smo mtDNA haplotip posameznih primerkov in jih uvrstili v obstoječo razdelitev na filogeografske linije. Genetsko strukturiranost populacij in introgresijo smo ugotavljali na osnovi mikrosatelitov in SNP-jev. V skladu z mtDNA haplotipi je porečje naseljujejo *S. obtusirostris* in tri linije *S. trutta*: avtohtona jadranska linija in dve neavtohtoni (donavska in atlantska). *S. dentex* in *S. marmoratus* imata mtDNA haplotip jadranske linije. Rezultati analize jedrnih markerjev potrjujejo križanje *S. obtusirostris* in avtohtone *S. trutta*. Povratno križanje poteka s *S. trutta*, kar pojasnjuje ohranitev simpatričnosti *S. obtusirostris*. Zasedili smo tudi križanje med avtohtonimi in vloženimi linijami *S. trutta*, ki lahko potencialno ogrozi simpatrijo avtohtonih linij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN MD
- DC UDC 597.5:575.2:577.2.088(043)=863
- CX genus *Salmo*/trout/Neretva/genetic markers/mtDNA/microsatellites
factorial correspondence analysis/biodiversity
- AU RAZPET, Andrej
- AA DOVČ, Peter (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, BF, Interdisciplinary Postgraduate Study in Biotechnology
- PY 2004
- TI GENETIC DIVERSITY OF SALMONIDES OF THE RIVER NERETVA
DRAINAGE
- DT M. Sc. Thesis
- NO XII, 69 p., 11 tab., 19 fig., 4 app., 104 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The Neretva basin is the main salmonid habitat in the Adriatic part of the south-western Balkans. On the basis of external morphology, several sympatric salmonid species (i.e., *Salmo trutta*, *S. marmoratus*, *S. obtusirostris*, *S. farioides* and *S. dentex*) were described, however, original descriptions were vague and some of the names are now questionably valid, which makes taxonomy unclear. In order to revise the existent taxonomy of salmonid taxa in the Neretva basin, to determine their mutual relationship and relationship to valid salmonid taxa, we conducted genetic screening of 206 specimens, randomly sampled in the upper part of the Neretva basin. On the basis of mtDNA, we determined the phylogeographic lineage of individuals, whereas population genetic structure and introgression were determined using microsatellite and SNP data. According to mtDNA haplotypes, Neretva basin is inhabited by *S. obtusirostris* and three lineages of *S. trutta*: native Adriatic lineage and two introduced lineages (the Danubian and Atlantic). *S. dentex* and *S. marmoratus* exhibit the Adriatic lineage mtDNA haplotype. Using nuclear DNA markers, natural introgression between *S. obtusirostris* and native *S. trutta* was detected being biased toward *S. trutta*, which may explain the preservation of the *S. obtusirostris* integrity despite observed interspecific hybridisation. Hybridisation between the native and introduced lineages of *S. trutta* was detected as well, representing a potential threat to sympatric co-existence of all the native lineages.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo slik	IX
Kazalo preglednic	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 POREČJE NERETVE	3
2.2 BIOLOŠKI KONCEPT VRSTE IN TAKSONOMIJA SALMONIDOV	4
2.3 EVOLUCIJSKI KONCEPT VRSTE	5
2.4 FILOGENETSKI KONCEPT VRSTE	6
2.5 OPIS VRST V POREČJU NERETVE	8
2.5.1 <i>S. trutta</i> Linnaeus, 1758	8
2.5.2 <i>S. obtusirostris</i> Heckel, 1851	9
2.5.3 <i>S. marmoratus</i> Cuvier, 1817	10
2.5.4 <i>S. dentex</i> Heckel, 1851	12
2.5.5 <i>S. farioides</i> Karaman, 1937	13
2.5.6 <i>S. cf. montenigrinus</i>	14
2.5.7 Križanci	15

2.6	GENETSKI MARKERJI	16
2.6.1	Mitohondrijska DNA	16
2.6.2	Jedrna DNA	18
2.6.2.1	Mikrosateliti	18
2.6.2.2	Točkovne mutacije (SNP)	19
2.7	OSNOVNI PRINCIPI STATISTIČNIH ANALIZ	19
2.7.1	Faktorielna korespondenčna analiza	19
2.7.2	Matematično ozadje genetskega polimorfizma	20
2.8	PROBLEMATIKA KRIŽANCEV	22
2.8.1	Različni tipi križanj	23
2.8.2	Vlaganja rib in ohranitev avtohtonih vrst	25
3	MATERIAL IN METODE	26
3.1	MATERIAL	26
3.1.1	Vzorčenje	26
3.1.2	Kemikalije	28
3.1.3	Pripravljene seti kemikalij	28
3.1.4	Encimi	28
3.1.5	Označevalci velikosti	29
3.1.6	Raztopine	29
3.1.7	Laboratorijska oprema	29
3.1.8	Začetni oligonukleotidi	30
3.2	METODE	30
3.2.1	Izolacija DNA	30
3.2.1.1	Fenolna ekstrakcija	30
3.2.1.2	Wizard [®] Genomic DNA Purification Kit	31

3.2.1.3	Hitra metoda	31
3.2.2	Agarozna gelska elektroforeza	31
3.2.3	Verižna reakcija s polimerazo	32
3.2.4	Izolacija fragmentov DNA iz gela z elektroelucijo	33
3.2.5	PCR–RFLP	33
3.2.6	Določanje nukleotidnega zaporedja	35
3.2.7	Ugotavljanje dolžine mikrosatelitov	36
3.2.8	Analiza podatkov	36
3.2.8.1	Analiza mtDNA	36
3.2.8.2	Analiza jedrnih markerjev	37
4	REZULTATI	38
4.1	TRENTNO STANJE V POREČJU NERETVE	38
4.2	KONTROLNA REGIJA mtDNA	38
4.2.1	Haplotipi mtDNA v porečju Neretve	38
4.2.2	Distribucija haplotipov	40
4.3	ANALIZA JEDRNIH MARKERJEV	41
4.3.1	Mikrosateliti	41
4.3.2	LDH in GH2C	42
4.3.3	Statistična obdelava podatkov	43
4.3.3.1	Faktorielna korespondenčna analiza	43
4.3.3.2	Deleži heterozigotnosti, F–statistika in vezava genetskih markerjev	45
5	RAZPRAVA	48
5.1	TRENTNO STANJE V POREČJU NERETVE	48
5.2	UVRSTITEV SALMONIDOV IZ POREČJA NERETVE V FILOGEOGRAFSKE LINIJE PO BERNATCHEZU	48

5.3	RAZŠIRJENOST IN IZVOR LINIJ mtDNA	49
5.3.1	Jadranska linija	49
5.3.2	Vnešene linije	49
5.3.3	Haplotip Soxy	50
5.4	VRSTE SALMONIDOV V POREČJU NERETVE KOT ESU	51
5.4.1	<i>S. obtusirostris</i> , <i>S. trutta</i> in njuni križanci	51
5.4.2	Vložene postrvi v Rakitnici	52
5.4.3	Posledice vlaganj v porečje Neretve	53
5.4.4	<i>S. marmoratus</i> in <i>S. dentex</i>	53
5.5	OHRANITEV BIOTSKE RAZNOLIKOSTI	54
6	POVZETEK	56
7	SUMMARY	58
8	VIRI	60
9	ZAHVALA	69

KAZALO SLIK

Slika 1:	Zemljevid porečja Neretve z okolico.	3
Slika 2:	Filogenetsko drevo predstavnikov rodu <i>Salmo</i> na osnovi kontrolne regije mtDNA, gena za citokrom <i>b</i> in regije ITS1 (Sušnik in sod., 2004).	7
Slika 3:	Različne barvne različice potočne postrvi (<i>S. trutta</i>).	8
Slika 4:	Mehkoustna postrv (<i>S. obtusirostris</i>).	10
Slika 5:	<i>S. marmoratus</i> , zgoraj primerki iz Zadlaščice, Slovenija, spodaj primerki iz Neretve (foto: Aleš Snoj).	11
Slika 6:	<i>S. dentex</i> , zgoraj Hecklova skica (1852), spodaj primerki iz Neretve.	12
Slika 7:	Primerjava <i>S. dentex</i> (zgoraj levo) in <i>S. farioides</i> (zgoraj desno) (Karaman, 1937), spodaj <i>S. cf. farioides</i> (Delling, 2003).	13
Slika 8:	<i>S. cf. montenigrinus</i> iz Neretve (Delling, 2003).	14
Slika 9:	Mehkoustna postrv ima značilno obliko ust (levo), pri kateri je spodnja čeljust opazno krajša od zgornje.	15
Slika 10:	Križanca <i>S. marmoratus</i> × <i>S. trutta</i> iz Posočja (foto: Aleš Snoj).	16
Slika 11:	Radzelitev različnih tipov križanj glede na nastanek (naravno ali antropogeno) in obseg (stopnja introgresije) (Allendorf in sod., 2001).	24
Slika 12:	Zemljevid z lokacijami vzorčenj (levo) in vzorčenje v Rakitnici s pomočjo elektrike, ki začasno omami ribe (desno).	27
Slika 13:	Profil kontrolne regije mtDNA po restrikciji z endonukleazami <i>AluI</i> (zgoraj levo), <i>NdeI</i> (zgoraj desno), <i>SatI</i> (spodaj levo) in <i>SmaI</i> (spodaj desno).	34
Slika 14:	Profil C introna gena za rastni hormon (GH2C) po restrikciji z endonukleazo <i>BseGI</i> .	35
Slika 15:	Profil introna gena za laktat dehidrogenazo (LDH) po restrikciji z endonukleazo <i>RsaI</i> .	35
Slika 16:	Filogenetsko drevo z novim haplotipom AdN na osnovi nekaterih zaporedij 5' dela kontrolne regije mtDNA.	40
Slika 17:	Polimorfizmi na posameznih mikrosatelitnih lokusih po posameznih fenotipih.	42
Slika 18:	Faktorielna korespondenčna analiza po posameznih lokacijah.	44
Slika 19:	Faktorielna korespondenčna analiza po posameznih fenotipih in z vrstami, ki verjetno ustrezajo posameznem gručam.	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Vzorčenje po lokacijah (navedena so imena rek oz. potokov) in fenotipih.	27
Preglednica 2:	Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov in ustreznih temperaturnih programov.	30
Preglednica 3:	Opis temperaturnih programov mikroprocesorsko vodenih termostatov.	33
Preglednica 4:	Mitohondrijski haplotipi v porečju Neretve.	38
Preglednica 5:	Primerjava zaporedja AdN (zadnja vrstica) z nekaterimi zaporedji iz baze podatkov Genbank.	39
Preglednica 6:	Razporeditev mitohondrijskih haplotipov glede na mesto izlova.	40
Preglednica 7:	Razporeditev mitohondrijskih haplotipov glede na fenotip.	41
Preglednica 8:	Frekvenca alelov po fenotipih za gena, ki kodirata laktat dehidrogenazo (LDH) in rastni hormon (GH2C).	43
Preglednica 9:	Najverjetnejši za vrsto značilni jedrni markerji.	45
Preglednica 10:	Primerjava deležev heterozigotnosti (pričakovani, brez vpliva in opazovani) in \hat{f} glede na fenotip in lokacijo.	46
Preglednica 11:	Vrednosti $\hat{\Theta}$ po fenotipih (nad diagonalo) in % zaupanja (pod diagonalo) glede na lokacijo (zgoraj) in fenotip (spodaj).	47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adenozin
ang.	angleško
bp	bazni par
C	citidin
cf.	confer, primerjati z
ddNTP	2', 3'-dideoksinukleozid 5'-trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid 5'-trifosfat
EDTA	etilen-diamino-tetraocetna kislina
ESU	evolucijsko pomembna enota (<u>e</u> volutionarily <u>s</u> ignificant <u>u</u> nit)
EtOH	etanol, C ₂ H ₅ OH
FAM	karboksifluorescin
FCA	faktorielna korespondenčna analiza (<u>f</u> actorial <u>c</u> orrespondence <u>a</u> nalysis)
G	gvanin
GH2C	growth <u>h</u> ormone, rastni hormon, C intron
HEX	2',4,4',5',7,7'-heksaklorofluorescin
JOE	6-karboksi-4',5'-dikloro-2',7'-dimetoksifluorescin
kbp	tisoč baznih parov
lat.	latinsko
LDH	<u>l</u> aktat <u>d</u> ehidrogenaza
mtDNA	mitohondrijska DNA
N	katerikoli nukleotid
n.z.	ni (statistično) značilno
PCA	analiza glavnih komponent (<u>p</u> rincipal <u>c</u> omponent <u>a</u> nalysis)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
RFLP	polimorfizem restrikcijskih fragmentov (<u>r</u> estriction <u>f</u> ragment <u>l</u> enght <u>p</u> olymorphism)
ROX	karboksi-X-rodamin
SDS	natrijev dodecil sulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate)
SNP	točkovna mutacija (<u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism)
T	timidin
TAE	raztopina <u>T</u> risa, <u>a</u> cetata in <u>E</u> DTA
TAMRA	karboksitetrametilrodamin

<i>Taq</i> DNA-polimeraza	DNA-polimeraza, izolirana iz <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	raztopina <u>T</u> risa, <u>b</u> orata in <u>E</u> DTA
TEN	raztopina <u>T</u> risa, <u>E</u> DTA in <u>N</u> aCl
TET	6-karboksi-2',4,7,7'-tetraklorofluorescin
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-1, 3-propandiol
TSR	<u>t</u> emplate <u>s</u> uppresion <u>r</u> eagent
ut%	utežni delež

1 UVOD

Opisovanje biološke raznolikosti tradicionalno temelji na morfoloških znakih ali markerjih. Vrsta kot osnovna enota biološke raznolikosti je pogosto tudi najmanjša taksonomska enota, ki je deležna zakonske zaščite posameznih držav bodisi s statusom ogrožene vrste ali nacionalnega simbola. Morfološke lastnosti so lahko podvržene vplivom okolja, zaradi česar je njihova uporaba v klasifikaciji včasih nezadostna, zlasti v primerih križanja. Napačna ocenitev biološke raznolikosti ima torej lahko za posledico pomanjkljivo zakonsko zaščito, ki tolerira človeške dejavnosti, ki vodijo v zmanjšanje raznolikosti znotraj vrst in ogrožajo njihov obstoj.

Pri predstavnikih rodu *Salmo* so očitne pomanjkljivosti morfoloških markerjev, med katerimi je najpogosteje omenjena obarvanost ali pigmentacija. Predstavnike rodu so poimenovali z vsaj 1931 znanstvenimi imeni, večinoma sinonimi, nekatere vrste naj bi že izumrle, nekaj pa jih je opisanih le na osnovi izgubljenih tipskih primerkov. Taksoni severnega dela jadranskega povodja so dobro raziskani, predvsem v porečjih Pada in Soče, kjer živi *S. marmoratus*, soška postrv. Preostanek jadranskega povodja pa je slabše raziskan, tako je zelo malo znanega, kakšen je odnos je med soško postrvjo in glavatico, ki naseljuje južni del jadranskega rečnega sistema. Obe sta poimenovani z istim znanstvenim imenom, *S. marmoratus*, vendar primerjava med njima, z izjemo obarvanosti, še ni bila izvedena. Položaj salmonidov iz porečja Neretve v obstoječi filogeografski razdelitvi *S. trutta*, je slabo raziskan.

V porečju Neretve je bilo opisanih vsaj šest salmonidnih taksonov: *S. marmoratus*, *S. trutta*, *S. dentex*, *S. obtusirostris*, *S. farioides* in *S. cf. montenegrinus*. Njihovi opisi z morfološkiimi znaki pogosto ne omogočajo nedvoumne identifikacije posameznih primerkov. Dodatne težave povzroča antropogeni vnos neavtohtonih linij postrvi (*S. trutta*), ki se uspešno križajo z domačimi linijami in tvorijo dodatne morfološke variante, ki predstavljajo reprodukcijski most med simpatričnimi avtohtonimi vrstami. Namen naše raziskave je:

- ugotoviti trenutno stanje salmonidov v porečju Neretve,
- uvrstiti salmonide iz porečja Neretve v obstoječe filogeografske linije (Bernatchez, 2001),
- določiti izvor in razširjenost mtDNA linij na tem območju,
- ugotoviti njihovo genetsko raznolikost in jo primerjati z morfološko raznolikostjo ter
- oblikovati predloge za ohranitev avtohtonih salmonidov.

Filogenijo salmonidov smo določali na osnovi 5' konca zaporedij kontrolne regije mitohondrijske DNA (mtDNA), strukturiranost znotraj posameznih populacij in med njimi pa na osnovi rezultatov statistične analize jedrnih markerjev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POREČJE NERETVE

Neretva izvira v jugovzhodnem delu Bosne in Hercegovine, blizu Zelengore na nadmorski višini 1095 m in se po 218 km izliva v Jadransko morje pri mestu Ploče. Njeni večji pritoki so Rakitnica, Rama, Bregava in Trebižat, porečje pokriva 5581 km², večinoma v Bosni in Hercegovini (Slika 1). Neretva je gorska reka z velikimi nihanji vodostaja glede na letni čas. Leta 1955 so na njej zgradili hidroelektrarno pri Jablanici, za 85 m visokim jezom je nastalo 27 km dolgo akumulacijsko jezero s prostornino 288000000 m³, ki sega vse do Konjica (Enciklopedija leksikografskog zavoda, 1968).



Slika 1: Zemljevid porečja Neretve z okolico.

Figure 1: A map of the River Neretva drainage and its vicinity.

Porečje leži blizu stičišča jadranskega, črnomskega in egejskega povodja in je najbolj vodnato na vzhodni obali Jadranskega morja. Na osnovi paleogeografije in razširjenosti nekaterih sladkovodnih vrst lahko sklepamo na sladkovodno povezavo med jadranskim in panonskim povodjem v poznem mesinskem obdobju pred 5 milijoni leti. Med pleistocenski poledenitvami (v obdobju od pred 2,4 milijona let do pred 15-18 000 leti)

je bilo porečje Neretve zavetišče sladkovodnih rib iz rek, ki se izlivajo v severni in zahodni Jadran. Zaradi večkratnega vzpostavljanja in prekinjanja vodnih povezav je prišlo do zaporednih kolonizacij reke z novimi populacijami sladkovodnih vrst (Bianco, 1990). Večkratne kolonizacije so tudi najverjetnejši razlog za raznolikost salmonidov (predstavniki rodu *Salmo*) v porečju. Genetskih raziskav, ki bi to potrjevale, ni veliko. Kolonizacijo Neretve so preučevali z določanjem zaporedij kontrolne regije mtDNA na samo dveh primerkih (Bernatchez, 2001), z alocimi pa so pojasnili širjenje potočne postrvi v severno in zahodno Evropo iz vseh ledenodobnih zavetišč, razen tistih iz mediteranske regije (Garcia–Marin in sod., 1999).

2.2 BIOLOŠKI KONCEPT VRSTE IN TAKSONOMIJA SALMONIDOV

Vrsta je osnovna enota, s katero opisujemo biološko raznolikost. Veda, ki preučuje raznolikost organizmov in odnose med njimi, se imenuje sistematika. Obstaja več osnovnih konceptov, ki definirajo vrste kot dejanske naravne enote, na primer biološki, evolucijski in filogenetski koncept vrste. Biološki koncept, ki je od naštetih najbolj znan, definira vrsto kot skupino osebkov v naravnih populacijah, ki se pariyo med seboj in so reproduktivno izolirani od drugih takih skupin (Mayr, 2000). Vrsta po tej definiciji se občasno imenuje tudi "biološka vrsta", čeprav so tudi vse druge definicije vrste biološke. Ključno pri opisu "biološke vrste" je torej določiti reprodukcijsko izolacijo. V praksi raziskovalci vrsto opisujejo po morfoloških, ekoloških, biokemičnih, etoloških in molekularno genetskih kriterijih, ki pa so različni glede na obravnavane organizme. Tako se, denimo, uporablja različne kriterije pri določanju vrst ptic in rib, še dosti drugače je pri bakterijah in dinozavrih. Za rastline in živali, ki se razmnožujejo spolno, raziskovalci izluščijo reprodukcijsko bariero in definirajo vrste, dejanskih poskusnih križanj se običajno ne izvaja (Kottelat, 1997).

Z boljšim razumevanjem prej omenjenih kriterijev se spreminjata tako razvrščanje osebkov v hierarhični sistem (klasifikacija) kot tudi njihovo poimenovanje (nomenklatura). Ribe (*Pisces*) so parafiletski takson, opišemo jih kot v vodi živeče vretenčarje s škrkami in izrastki, če jih imajo, v obliki plavuti. Po eni od ocen ribe predstavljajo polovico vretenčarskih vrst (Nelson, 1994). Trenutno je klasifikacija salmonidov po ITIS (ITIS, 2004) naslednja:

- kraljestvo *Animalia*, živali
- debló *Chordata*, strunarji
- poddebló *Vertebrata*, vretenčarji
- nadrazred *Ochteichthyes*, ribe kostnice
- razred *Actinopterygii*, žarkoplavutarice
- podrazred *Neopterygii*
- podpodrazred *Teleostei*

- nadred *Protacanthopterygii*
- red *Salmoniformes*
- družina *Salmonidae* s poddružinami:
 - *Coregoninae*, ozimnice
 - *Thymallinae*, lipani
 - *Salmoninae* z rodovi:
 - * *Brachymystax*, lenok
 - * *Hucho*, sulci
 - * *Onchorhynchus*, pacifiški lososi in pacifiške postrvi
 - * *Parahucho*
 - * *Salmo*, atlantski losos in postrvi
 - * *Salvelinus*, zlatovčice
 - * *Salvethymus*

Predstavnike rodov *Parahucho* in *Salvethymus* se po nekaterih genetskih raziskavah uvršča v rodova *Hucho* in *Salvelinus* (Phillips in Oakely, 1997), rod *Salmo* pa vključuje tudi predstavnike, ki so bili prej vključeni v rodove *Acantholingua*, *Platysalmo* in *Salmothymus* (Snoj in sod., 2002a; Sušnik in sod., 2004). Salmonidne vrste so bile opisane skoraj izključno na osnovi morfologije, saj molekularno genetskih tehnik ni bilo. Pristopa so združili v raziskavi na fenotipsko zelo različnih salmonidih v Italiji, kjer so našli nepričakovano malo genetske variacije na zaporedjih mtDNA (Patarnello in sod., 1994).

Od Linnejeve uvedbe nomenklturnega sistema leta 1758 je bilo na osnovi morfologije poimensko opisanih vsaj 1931 vrst evropskih salmonidov (Kottelat, 1997). Ne glede na definicijo vrste je številka pretirano visoka in predvsem posledica nepoznavanja pravil nomenklature (pri starejših opisih vrst teh pravil še ni bilo) in slabega poznavanja morfologije rib. V obsežnem pregledu evropskih sladkovodnih rib je Kottelat (1997) naštel kar 57 znanstvenih imen za potočno postrv *S. trutta* sensu stricto in zlobno pripomnil, da je število vrst na nekem območju v obratnem sorazmerju z oddaljenostjo od laboratorija sistematika, ki se ukvarja z njimi.

Zračna razdalja med Ljubljano in Neretvo je 400 km.

2.3 EVOLUCIJSKI KONCEPT VRSTE

V skladu z evlucijskim konceptom je vrsta linija prednikov in potomcev, ki ohranja svojo identiteto glede na druge linije in ki ima svoje evlucijske tendence in svojo zgodovinsko usodo (Wiley, 1978). Od vseh naštetih konceptov vrste je ta najbolj fleksibilna, zato jo nekateri avtorji priporočajo kot osnovno enoto biološke raznolikosti (Mayden, 1997). Določitev vrst po tem konceptu je v praksi težavna, nagnjena je zlasti

v smer precnitve biološke raznolikosti, kar pa je (z naravovarstvenega stališča) morda celo prednost (Kottelat, 1997). Namesto izraza vrsta se pri tem konceptu pogosto uporablja izraz evlucijsko pomembna enota (ang. ESU, evolutionarily significant unit), ki ga je prvi uporabil Simpson (1961). Natančna opredelitev evlucijskega koncepta se razlikuje med raznimi avtorji, vsekakor pa je glavni namen določitev osnovnih enot, ki bi bile deležne zakonske zaščite (Fraser in Bernatchez, 2001).

Linije prednikov in potomcev se običajno določa preko določanja haplotipov, zato je zaradi tehničnih razlogov bolj vabljev filogenetski koncept vrste.

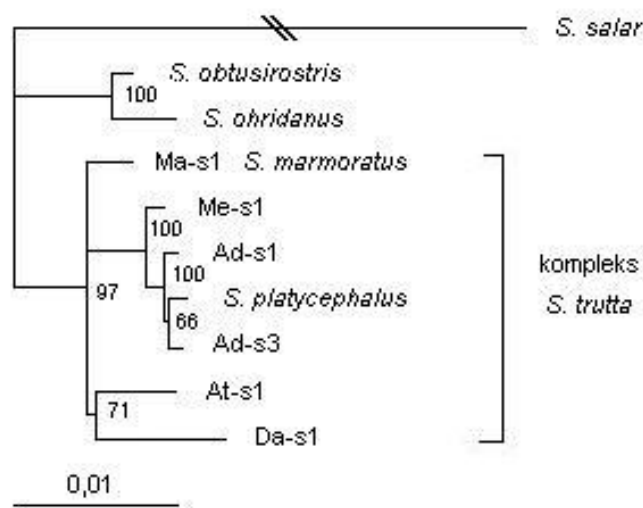
2.4 FILOGENETSKI KONCEPT VRSTE

Po Cracraftu (1989) je vrsta najosnovnejša skupina organizmov, ki jih lahko ločimo od drugih skupin in znotraj katere imajo vsi osebki skupnega prednika. Filogenijo lahko rekonstruiramo na osnovi zaporedij DNA. Markerji jedrne DNA se ne uporabljajo pogosto zaradi rekombinacij in selekcijskega pritiska na številna zaporedja jedrne DNA. Glavna tehnična ovira pa je določitev posameznih haplotipov pri heterozigotnih organizmih. (Zhang in Hewitt, 2003). Pri salmonidih so filogenetske raziskave na jedrni DNA še dodatno omejene zaradi primerov rekombinacij med paralognimi zaporedji, ki so posledica tetraploidizacije pred 25–100 milijoni leti (Angers in sod., 2002). Zaradi tega je tehnično lažje določiti filogenijo s primerjavami mitohondrijske DNA (mtDNA). Omejitev raziskave na mitohondrijske haplotipe ima lahko za posledico podcenitev genetske raznolikosti in pretirane poenostavitve evlucijskih procesov (Zhang in Hewitt, 2003).

Filogenija evropskih populacij postrvi temelji na nukleotidnih zaporedjih mtDNA in na nekaterih jedrnih zaporedjih, kot so zaporedja ITS med rRNA geni (Slika 2). Glede na zaporedja kontrolne regije mtDNA ločimo pet filogeografskih linij postrvi: atlantsko (At), donavsko (Da), jadransko (Ad), sredozemsko (Me) in marmoratus (Ma) (Bernatchez in sod., 1992; Bernatchez, 2001). Seznam mitohondrijskih haplotipov je dopolnjen z vzorci iz Grčije (Apostolidis in sod., 1997) ter iz Slovenije, Hrvaške, Srbije, Črne Gore ter Bosne in Hercegovine (neobjavljeno). Filogenija kontrolne regije mtDNA se ujema s filogenijo kodirajočih zaporedij mtDNA (Giuffra in sod., 1994).

Na osnovi razlik med mitohondrijskimi haplotipi in oceni molekularne ure so sklepali, da je zadnji skupni prednik današnjih postrvi živel pred 700000–450000 leti, daleč pred zadnjo poledenitvijo (pred 18000 leti). Zadnji skupni prednik haplotipov donavske linije je živel pred 300000–150000 leti, zadnji skupni prednik haplotipov atlantske linije pa pred 20000–14000 leti (Bernatchez in sod., 1992; Bernatchez, 2001). Atlantska linija danes prevladuje v rekah zahodne in severne Evrope, ki se izlivajo v Belo, Baltiško, Severno in Irsko morje ter v Biskajski zaliv. Tej liniji pripada tudi "morska" postrv (Snoj in sod., 2002b) in večina postrvi iz ribogojnic. Vlaganje postrvi povzroča ve-

like težave pri preučevanju filogenije. Tako je Bernatchez (2001) v raziskavo vključil tudi dva vzorca iz Neretve, oba s haplotipom donavske linije Da-s1. V reko že dlje časa vlagajo postrvi (Bojčić in sod., 1982), zato je pričakovano, da so v reki prisotne neavtohtone linije.



Slika 2: Filogenetsko drevo predstavnikov rodu *Salmo* na osnovi kontrolne regije mtDNA, gena za citokrom *b* in regije ITS1 (Sušnik in sod., 2004). Ad–jadranska, At–atlantska, Da–donavska, Ma–marmoratus in Me–mediteranska linija, metoda največjega verjetja (maximum likelihood), 10 000 ponovitev, verjetnost razvejanja v (%).

Figure 3: Maximum likelihood tree, based on combined data set of mtDNA control region, cytochrome *b* gene and ITS1 region (Sušnik *et al.*, 2004). Abbreviations Da, At, Me, Ad and Ma refer to main phylogenetic lineages. Confidence statements (%) estimated from 10000 puzzling steps are shown between the nodes.

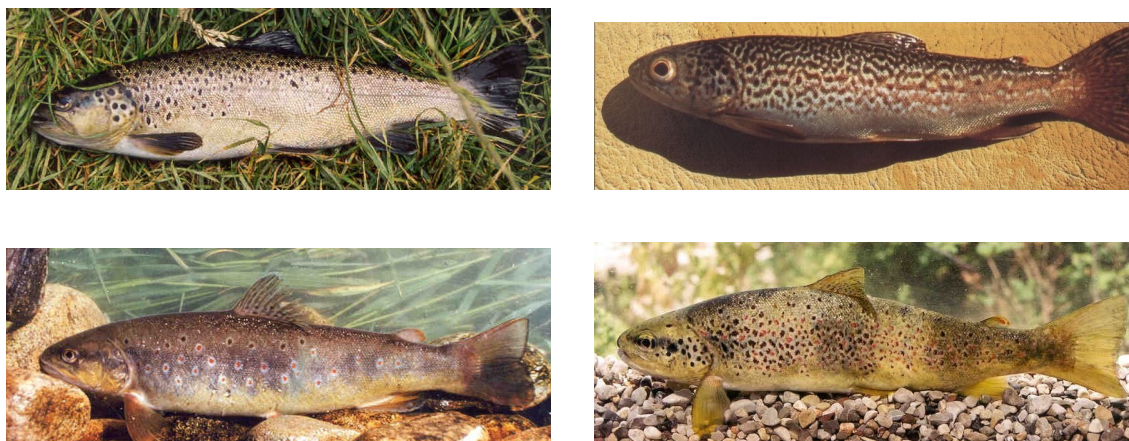
Znana so mitohondrijska zaporedja kontrolne regije in gena, ki kodira citokrom *b* *S. obtusirostris* iz Neretve. Na osnovi mitohondrijskih zaporedij in jedrnega gena za laktat dehidrogenazo so predlagali spremembo klasifikacije iz rodov *Salmothymus*, *Acantholingua* in *Platysalmo* v *Salmo* (Snoj in sod., 2002a). Velja omeniti, da sta glede na zaporedje mtDNA vrsti *S. marmoratus* in *Salmo (Platysalmo) platycephalus* sestavni del filogenetskega kompleksa *S. trutta* (Bernatchez in sod., 1992; Sušnik in sod., 2004). Genetski markerji (mtDNA in jedrne DNA) so zaradi svoje številčnosti precej boljši pri pojasnjevanju filogenije in strukturiranosti populacij kot morfološki znaki.

2.5 OPIS VRST V POREČJU NERETVE

Fenotipska raznolikost salmonidov otežuje tradicionalno opisovanje vrst na osnovi morfoloških znakov. V splošnem se sistematiki, ki so preučevali ribe v Neretvi in njenih pritokih, strinjajo o prisotnosti potočne postrvi (*Salmo trutta*), glavatice (*Salmo marmoratus*) in mehokoustne postrvi (*Salmo obtusirostris*) (Karaman, 1926; Bojčić in sod., 1982; Kosorić in sod., 1983).

2.5.1 *S. trutta* Linnaeus, 1758

Potočna postrv, kot jo je opisal Carl Linne (lat. oblika Linnaeus), je zelo razširjena po Evropi, severni Afriki in Aziji do Aralskega morja (Bernatchez in Osinov, 1995). V zadnjih stoletjih so jo naselili tudi v preostanek Azije in Afrike, v Avstralijo, severno in južno Ameriko (Laikre in sod., 1999). Ima vretenast, bočno rahlo stisnjen trup. Glava je srednje velika, gobec sega nazaj čez zadnji očesni rob, spolno zreli samci imajo spodnjo čeljust kavljasto zakrivljeno navzgor. Zobe imajo v čeljustih, na ralniku, jeziku in nebnicah (Povž in Sket, 1990). Zaradi različnega načina življenja so predstavniki te vrste lahko na videz dokaj različni, predvsem to velja za pigmentacijo (Slika 3). Barvna podlaga je sivkasto zelena z olivnim, rjavkastim ali črnim odtenkom ali kombinacije teh. Po telesu imajo različno število različno razporejenih, različno velikih črnih, rdečih in/ali oranžnih peg (Povž in sod., 1996).



Slika 3: Različne barvne različice potočne postrvi (*S. trutta*). Zgoraj levo postrv iz ribogojnice (foto: Andreja Ramšak), zgoraj desno iz reke Otre, Norveška (foto: Bo Delling), spodaj levo iz donavskega porečja (foto: Enver Melkič), spodaj desno iz jadranskega povodja (foto: Aleš Snoj).

Figure 3: Different colour variants of brown trout (*S. trutta*). On top left brown trout from hatchery (foto: Andreja Ramšak), top right trout from the River Otre, Norway (foto: Bo Delling), bottom left trout from the Danubian basin (foto: Enver Melkič), bottom right trout from the Adriatic basin (foto: Aleš Snoj).

Linne je ločil morsko, jezersko in potočno formo potočne postrvi (*trutta*, *lacustris* in *fario*). Izrazi podvrsta, forma in morf se v literaturi uporabljajo zaradi nejasnih definicij od vrste nižjih taksonomskih enot. V skladu z Linnejevo razdelitvijo je v Neretvi prisotna potočna forma potočne postrvi (*S. trutta* forma *fario*). Razdelitev potočne postrvi na te tri forme pa je sporna, ker verjetno ni skladna s filogenijo. Številna velika evropska jezera naseljujejo jezerske forme potočne postrvi in malo verjetna je razlaga, da se je *S. trutta* forma *lacustris* razvila monofiletsko. Tej razlagi nasprotujejo tudi rezultati genetskih analiz (Bernatchez in sod., 1992).

Treba je poudariti, da se izraza postrv in losos nanašata na način življenja rib. Postrvi večinoma živijo v rekah in sladkovodnih jezerih, lososi pa migrirajo v morje. *Oncorhynchus mykiss* iz severne Amerike zaseda povsem drugo ekološko nišo kot *S. trutta* iz Evrope in Azije, vendar sta se zaradi podobnega načina življenja zanj uveljavili imeni kalifornijska in potočna postrv. V Sloveniji uporabljamo izraz potočna postrv za splošno poimenovanje vrste *S. trutta*, kot tudi za *S. trutta* forma *fario*, ki pri nas prevladuje (Jug, 2002).

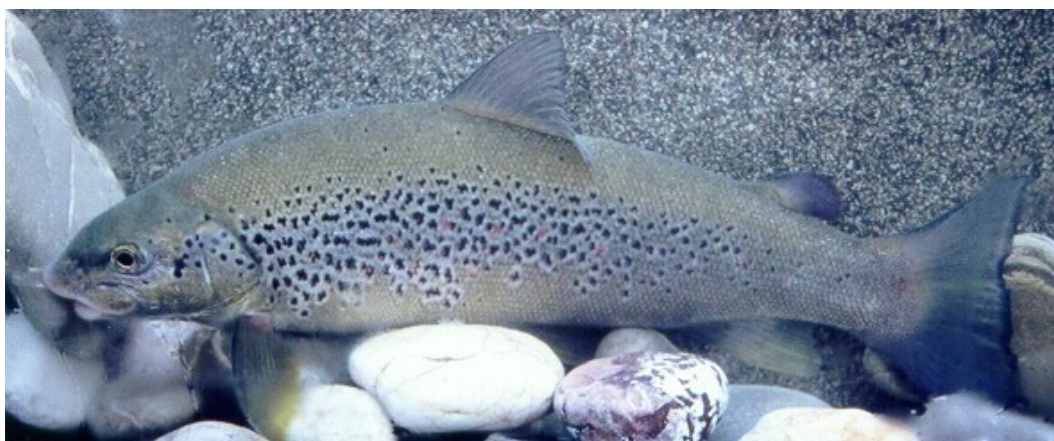
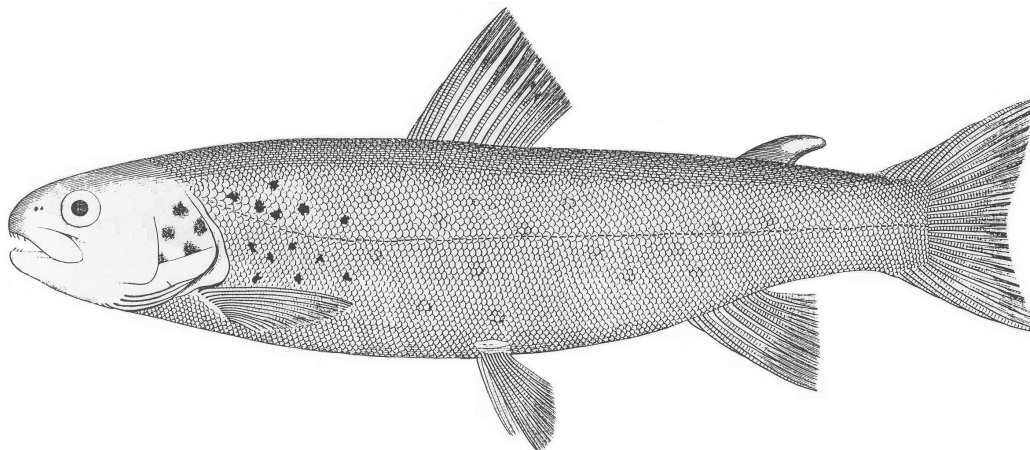
2.5.2 *S. obtusirostris* Heckel, 1851

Mehkoustna postrv (Slika 4) je bila sprva poimenovana *Salar obtusirostris* (Heckel, 1852), sinonima sta tudi *Salmothymus obtusirostris* in *Salmo obtusirostris* (Behnke, 1968). Pogoste so zamenjave *S. obtusirostris* z vrsto *S. ohridanus*, sinonim *Acantolingua ohridana* (Hadžišće, 1960; Šorić, 1990; Phillips in sod., 2000). V skladu s prvim opisom ima mehkoustna postrv glavo krajšo od višine trupa, trup pa je petkrat daljši od glave. Gobec in ustna reža sta kratka, mesnate in mehke ustnice zakrivajo zobe. So temnejše kot potočne postrvi, vendar imajo intenzivne črne in rdeče pike po telesu, rdeče pike imajo včasih črno obrobo (Heckel, 1852).

Mehkoustne postrvi živijo v nekaterih rekah, ki se izlivajo v Jadransko morje. Primerki iz različnih rek se med seboj razlikujejo po zunanem izgledu, zlasti po pigmentaciji in dolžini gobčka, zato je za vsako od teh rek opisana podvrsta:

- *S. obtusirostris zetensis* Hadžišće, 1960 v Zeti (Črna Gora),
- *S. obtusirostris salonitana* Karaman, 1927 v Jadru (Hrvaška), vložena tudi v bližnjo Žrnovnico,
- *S. obtusirostris krkensis* Karaman, 1927 v Krki (Hrvaška) in
- *S. obtusirostris oxyrhynchus* Steindachner, 1882 v porečju Neretve (Bosna in Hercegovina).

Podvrsta *S. obtusirostris oxyrhynchus* živi v Neretvi in nekaterih pritokih. Osnovna barvna podlaga je olivna, po telesu ima večinoma črne pege (le malo rdečih), ki se prekrivajo z oranžnimi pegami, na repu so samo oranžne pege.



Slika 4: Mehkoustna postrv (*S. obtusirostris*). Zgoraj Hecklova skica (1852) primerka iz Krke ali iz Zrmanje (Hrvaška), spodaj primerek iz Neretve (foto: Aleš Snoj).

Figure 4: Soft mouth trout. Heckel's (1852) drawing of a specimen from the River Krka or from the River Zrmanja above, specimen from the River Neretva below (foto: Aleš Snoj).

2.5.3 *S. marmoratus* Cuvier, 1817

Pri nas znana kot soška postrv živi v reki Soči in njenih pritokih (Berrebi in sod., 2000), pa tudi v Rižani, v porečju Pada in nekaterih drugih rekah v severni Italiji (Giuffra in sod., 1994), v Neretvi s pritoki (Bosna in Hercegovina) in v porečju Drima (Albanija, Srbija in Črna Gora). Genetsko čiste populacije *S. marmoratus* so do zdaj našli v samo osmih potokih v soškem porečju (Fumagalli in sod., 2002).

Znanstveno ime *marmoratus* je dobila zaradi izrazitega marmoriranega vzorca (Slika 5), v nekaterih populacijah so prisotne tudi rdeče pike. Marmoriran vzorec so našli tudi

pri postrveh v reki Otri (Norveška), vendar so jih po temeljitih genetskih in morfoloških raziskavah uvrstili v potočne postrvi atlantske linije (opis linij v poglavju 2.4) (Delling, 2002). V primerjavi s potočno postrvjo je soška večja in težja, razlikujeta se po številu in razporeditvi zob na ralniku (Povž in sod., 1996).



Slika 5: *S. marmoratus*, zgoraj primerek iz Zadlaščice, Slovenija, spodaj primerek iz Neretve (foto: Aleš Snoj).

Figure 5: *S. marmoratus* from the River Zadlaščica, Slovenija above and from the River Neretva below (foto: Aleš Snoj).

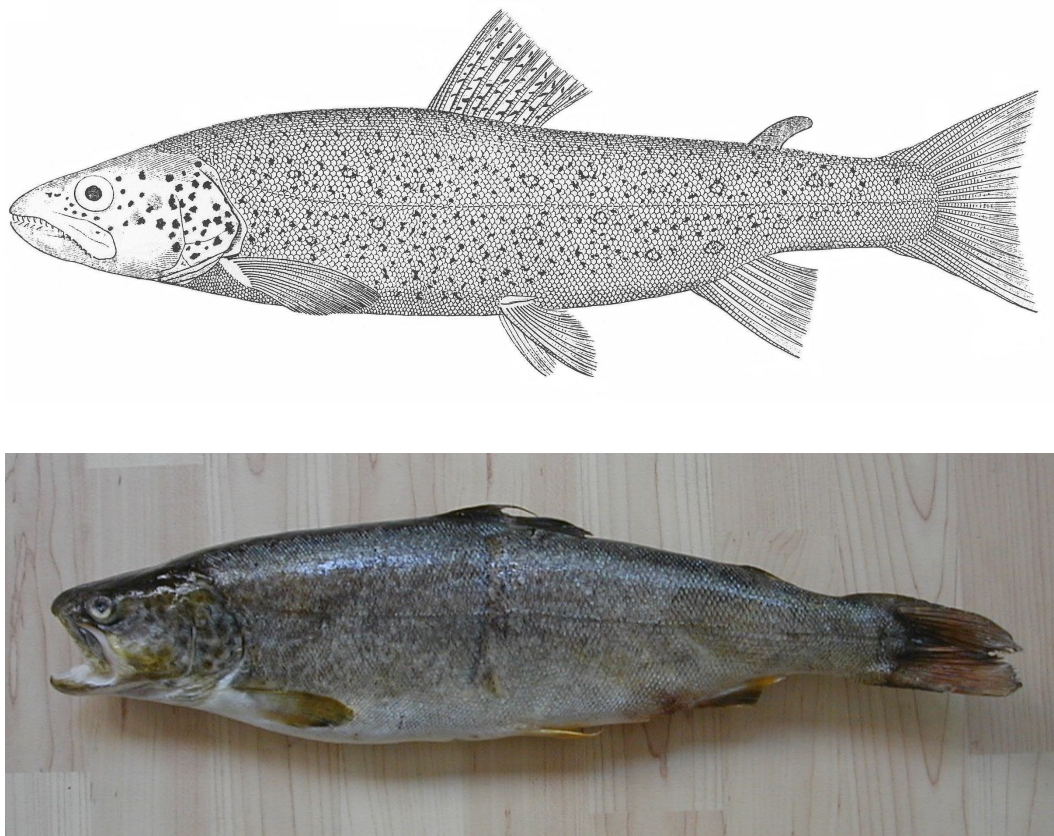
V Neretvi so *S. marmoratus* ali glavatico opazili Karaman (1926), Bojčić in sod. (1982) in Kosorić in sod. (1983). Raziskovalci ugotavljajo drastičen upad populacije glavatic, v zadnjem času celo njeno odsotnost v reki (Hamžić, 2002; Delling, 2003). Kot glavni razlog za ogroženost in skorajšnje izumrtje navajajo zaježitev reke. Tako na primer hidroelektrarna pri Jablanici s 85 m visokim jezom preprečuje migracije glavatic iz spodnjega dela Neretve v drstišča v zgornjem delu blizu kraja Glavatičevo.

V literaturi nismo našli primerjave primerkov *S. marmoratus* iz Soče in Neretve. Dopuščamo možnost, da se enako znanstveno ime uporablja samo zaradi marmoriranega vzorca. V poimenovanju bomo glede na izvor uporabljali izraza soška postrv in glavatica.

2.5.4 *S. dentex* Heckel, 1851

Ribe iz Krke, Cetine in Neretve z izrazitim zobovjem so bile prvotno poimenovane *Salar dentex*, po današnji nomenklaturi *Salmo dentex*. V spodnjem delu Neretve je ta riba znana kot zubatak, v Črni Gori isti vrsti pravijo strun. Zobje zubatkov so močni in veliki, pokrivajo skoraj vse kosti v ustih (čeljusti, jezik in nebo), glava je majhna in koničasta, petkrat krajša od telesa (Slika 6). Starejši primerki imajo temnejši hrbet s kovinskim sijajem in skoraj bel trebuh, ob strani telesa so večje črne pike in manjše krvavo rdeče pike. Postokularna razdalja znaša od 3,2 do 4,5–kratnega premera očesa, interokularna razdalja pa od 1,5 do 2–kratnega premera očesa (Heckel, 1852).

V literaturi pogosto zasledimo trditev Gridellija (1936), da je *S. dentex* križanec *S. marmoratus* × *S. trutta*. To možnost so zavrnil z argumentom, da zubatak živi tudi v rekah v bližini mesta Livno (najverjetneje v Plovuči), kjer ni glavatice (Karaman, 1937). Dejansko gre za napačno citiranje Gridellija (1936), ki je opozoril na pogosto zamenjavo med *S. marmoratus* in 'južno' *S. trutta*, torej *S. trutta* iz jadranskega povodja, ter kritiziral opis vrste *S. dentex*, ki pretirano poudarja zobe.



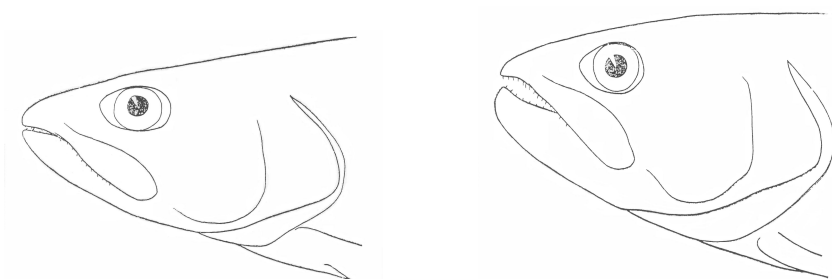
Slika 6: *S. dentex*, zgoraj Hecklova skica (1852), spodaj primerek iz Neretve (foto: Andrej Razpet).

Figure 6: Heckel's drawing of *S. dentex* (1852) above and a specimen from the River Neretva below (foto: Andrej Razpet).

2.5.5 *S. farioides* Karaman, 1937

Ta vrsta je zelo skromno opisana in v novejši literaturi ni omenjena. V primerjavi s *S. dentex* naj bi imeli primerki *S. farioides* krajše in višje telo ter manj izrazite zobe (Slika 7). V prvem opisu vrste je poudarjeno tudi, da je gobec postavljen višje, glava ni tako koničasta, barvne pike (črne in rdeče) pa so večje kot pri *S. dentex*. Samice *S. farioides* naj bi imele več črnih pik kot samci (Karaman, 1937).

To vrsto in še 8 drugih vrst in podvrst s področja Kraljevine Jugoslavije je opisal makedonski sistematik Stanko Karaman. Kasnejši raziskovalci so ga kritizirali zaradi pomanjkljivosti pri njegovem konceptu vrste in kršitvi načel taksonomije (Behnke, 1968). V enem od zgodnejših del je Karaman opisal tudi salmonide v Neretvi in naštel *S. marmoratus*, *S. trutta fario* in *S. obtusirostris* (Karaman, 1926). Kasneje pa je podvomil v prisotnost *S. trutta fario* in potočno postrv jadranskega povodja (porečja Krke, Neretve, Zrmanje in Drima) opisal kot novo vrsto *S. farioides*, v Zrmanji pa še podvrsto *S. farioides zrmanjaensis* (Karaman, 1937).



Slika 7: Primerjava *S. dentex* (zgoraj levo) in *S. farioides* (zgoraj desno) (Karaman, 1937), spodaj *S. cf. farioides* (Delling, 2003).

Figure 7: A comparison of *S. dentex* (top left) and *S. farioides* (top right) (Karaman, 1937), *S. cf. farioides* below (Delling, 2003).

V časih Karamanovega delovanja je bilo razširjeno mnenje, da jadransko povodje naseljuje *S. farioides*, črnomoško *S. taleri*, egejsko pa *S. macedonicus*. Z uporabo merističnih značilnosti so ugotovili, da v vseh teh povodjih živi *S. trutta fario*, takrat so *S. farioides* reklasificirali v podvrsto *S. trutta farioides*, ki se od *S. trutta fario* loči v manjšem številu piloričnih izrastkov in v večjih očeh. Opazili so, da se razmerja med merističnimi značilnostmi spreminjajo s starostjo in da je pri obliki glave in velikosti oči značilen spolni dimorfizem (Šorić, 1990).

2.5.6 *S. cf. montenigrinus*

Vrsta s prvotnim imenom *Trutta montenigrina* Karaman, 1933 je bila opisana v reki Morači (Črna Gora), ima široko glavo, po telesu pa majhne črne in vinsko rdeče pike (Karaman, 1933). Njen najditelj je v svojem naslednjem znanstvenem prispevku (Karaman, 1937) opisal še nekaj novih vrst in jih primerjal z že prej znanimi, med slednjimi ni več besede o *Trutta montenigrina*, prav tako ne v vseh kasnejših člankih. Možno je, da je Karaman v kasnejših člankih ime *Trutta montenigrina* nadomestil s *S. obtusirostris zetensis* (Behnke, 1968).



Slika 8: *S. cf. montenigrinus* iz Neretve (Delling, 2003).

Figure 8: *S. cf. montenigrinus* from the River Neretva (Delling, 2003).

V Neretvi pri Glavatičevem so nedavno ujeli ribe, ki so se med seboj razlikovale po morfometričnih značilnostih. Raziskovalcem vseh rib ni uspelo zanesljivo identificirati, zato so nekatere poimenovali po vrstah, ki so po opisu najbolj ustrezale, torej *S. cf. montenigrinus* (Slika 8) in *S. cf. farioides* (Slika 7) (Delling, 2003). Primerki ali primerki, na katerih je Karaman opisal vrsti *S. farioides* in *S. montenigrinus* in s katerimi bi bilo primerke iz Neretve potrebno primerjati (cf. = lat. confero, primerjati z), so izgubljeni ali neznano kje (Kottelat, 1997).

2.5.7 Križanci

Za križance so včasih uporabljali izraz bastard (Karaman, 1937). Slabšalen pomen te besede za ljudi se je razširil tudi na živalske vrste, zato ni čudno, da križanci pogosto niso deležni večje pozornosti raziskovalcev. V angleščini naj bi bil tudi izraz *hybrid* slabšalen, zato je bila predlagana bolj nevtralna beseda *intercross* (Allendorf in sod., 2001).

V 60-ih letih preteklega stoletja so se v ribogojnicah v Bosni in Hercegovini ukvarjali z nadzorovanim križanjem postrvi. Med drugimi so vzredili križance *S. trutta* × *S. obtusirostris* (Slika 9) in *S. trutta* × *S. marmoratus*. Zanimivo je, da so vsi križanci *S. obtusirostris* × *S. marmoratus* poginili 86 dni po oploditvi iker. V poskusu so uporabili starše iz reke Mušnice in Bune, ki sta del porečja Neretve (Kosorić in Vuković, 1969). Ker so bili poskusi izvedeni na majhnem številu staršev, obstaja možnost, da je vpliv določenega osebka lahko prevelik, da bi bila možna posplošitev za celo vrsto. Križanci *S. trutta* × *S. obtusirostris* so bili prisotni v reki že pred omenjenim poskusom (Bojčić in sod., 1982). V nekaterih obsežnejših raziskavah ribje favne v Neretvi pa so bili križanci povsem prezrti (Kosorić in sod., 1983; Karaman, 1937). Križanci *S. trutta* × *S. obtusirostris* naj bi bili po mnenju članov ribiškega društva Konjic sterilni. Znanstvene raziskave, ki bi to potrdila ali ovrgla, še ni bilo.



Slika 9: Mehkoustna postrv ima značilno obliko ust (levo), pri kateri je spodnja čeljust opazno krajša od zgornje. Desno fenotipski križanec *S. trutta* × *S. obtusirostris* z malo krajšo spodnjo čeljustjo od zgornje (foto: Aleš Snoj).

Figure 9: Soft mouth trout has a distinctive shape of mouth (left), the lower jaw is noticeably shorter than the upper jaw. A *S. trutta* × *S. obtusirostris* hybrid has a slightly longer lower jaw (right) (foto: Aleš Snoj).

Križanci *S. marmoratus* z vloženimi *S. trutta* (Slika 10) iz donavskega porečja in atlantskega povodja so opisani tudi v soškem porečju (Berrebi in sod., 2000; Snoj in

sod., 2000). Njihova pigmentacija je kombinacija marmoriranega in temno obarvane podlage z rdečimi pegami (Povž in sod., 1996). Križanje vloženih in avtohtonih postrvi *S. trutta* je bilo opaženo tudi v Neretvi (Bojčić in sod., 1982).



Slika 10: Križanca *S. marmoratus* × *S. trutta* iz Posočja (foto: Aleš Snoj).

Figure 10: *S. marmoratus* × *S. trutta* hybrids from the River Soča drainage (foto: Aleš Snoj).

2.6 GENETSKI MARKERJI

2.6.1 Mitohondrijska DNA

Glede na organizem, s katerim delamo, je mitohondrijska DNA (mtDNA) lahko vzrok za srečo, obžalovanje ali glavobol. Z redkimi izjemami ni uporabna za filogenijo rastlin zaradi prenizke stopnje mutacij in pogostih rekombinacij. Pri nekaterih živalih prisotnost mitohondrijskih psevdogenov v jedru otežuje raziskave ali pa mtDNA ni dovolj polimorfna znotraj posameznih vrst in rodov, kot na primer pri kobilicah. Večinoma pa ima živalska mtDNA na visoko stopnjo mutacij, zlasti v nekodirajočih regijah, zato je polimorfna tudi znotraj vrst. Človeška mtDNA ima na primer v kontrolni regiji povprečno stopnjo mutacije $0,14\text{--}2,7 \times 10^2 \%$ na milijardo let, človeška jedrna DNA v avtosomnih mikrosatelitih pa le $0,56\text{--}2,1 \times 10^{-3} \%$ na milijardo let (Zhang in Hewitt, 2003). Razlike med mitohondrijskimi haplotipi znotraj vrste so predvsem v posameznih baznih zamenjavah ali substitucijah. Molekule mtDNA so prisotne v somatskih in kličnih celicah, dedujejo se praviloma maternalno, med molekulami mtDNA običajno ne prihaja do rekombinacij. Večina osebkov ima v telesnih celicah isti mitohondrijski haplotip, pojav imenujemo homoplazmija. Heteroplazmija ali prisotnost različnih mitohondrijskih haplotipov v enem organizmu je redka in obstojna le nekaj generacij (Awise, 2000). Pri nekaterih vrstah pa je heteroplazmija zelo pogosta. Med ribami so najbolj preučeni jesetri, pri vrsti *Acipenser ruthenus* ima 46,8 % primerkov več kot en mtDNA haplotip (Ludwig in Jenneckens, 2000). Pri salmonidih heteroplazmije še niso opisali.

Zaradi svojih lastnosti se mtDNA pogosto uporablja v filogenetskih študijah. Njeno maternalno dedovanje raziskovalcem omogoča rekonstrukcijo evlucijskih dogodkov, kot so širjenje vrst, umetne naselitve, in efekt ozkih grl. Na osnovi mtDNA, izolirane iz fosilnih vzorcev, lahko primerjamo izumrle populacije z današnjimi. Raznolikost mtDNA znotraj rodu *Salmo* so preučevali na vrstah *S. trutta*, *S. marmoratus*, *S. obtusirostris*, *S. ohridanus*, *S. platysalmo* in *S. salar*. Glede na mtDNA ločimo filogeografske linije, v katerih je večje število mtDNA haplotipov in ki se ne ujemajo povsem s trenutno razdelitvijo rodu na vrste. *S. trutta* delimo na atlantsko, donavsko, jadransko in sredozemsko linijo (Bernatchez in sod., 1992), *S. platysalmo* sodi v jadransko linijo (Sušnik in sod., 2004) in *S. marmoratus* v linijo marmoratus. *S. obtusirostris* in *S. ohridanus* imata različna mtDNA haplotipa, ki ne sodita v prej omenjene linije in sta značilna samo za svojo vrsto (Phillips in sod., 2000; Snoj in sod., 2002a), *S. salar* ima dve glavni liniji, severnoameriško in evropsko (Nilsson in sod., 2001).

Za predstavnike družine *Salmonidae* velja, da so prišli v Evropo iz Sibirije (Banarecsu, 1973). Filogeografske linije vrste *S. trutta* so imele zadnjega skupnega prednika pred 450000–700000 leti (Bernatchez in sod., 1992). Drugi rodovi družine *Salmonidae*, kot so sulci (rod *Hucho*) in lipani (rod *Thymallus*) so prišli v Evropo po isti poti po koncu zadnje ledene dobe (Banarecsu, 1973).

Zadnje velike klimatske spremembe so bile pleistocenske poledenitve, ki so imele velik vpliv na evropske salmonide. Ti so preživel v nekaterih toplejših predelih, tako imenovanih ledenodobnih pribežališčih ali glacialnih refugijih, kjer je zaradi tega prihajalo do velikih sprememb v strukturi populacije. Na primeru atlantskih lososov (*S. salar*) so dokazali spremembe s primerjavo mtDNA, izolirano iz fosilnih in modernih vzorcev. Prevladujoči haplotipi izpred ledene dobe so se sicer ohranili, vendar jih je danes bistveno manj v primerjavi s haplotipi, ki so bili pred poledenitvijo prisotni samo v severni Evropi (Consuegra in sod., 2002). Vlogo ledenodobnega pribežališča je imel tudi Balkanski polotok vključno z Neretvo (Bianco, 1990).

Vseeno pa samo mtDNA ni dovolj za natančno rekonstrukcijo filogenije. Vlaganja gojenih postrvi v naravo so še vedno običajna praksa gospodarjenja z rekami, haplotipi vloženi postrvi atlantske in donavske linije otežujejo določitev avtohtonih linij in njihovo razširjenost. Tudi njihova razširjenost, na primer jadranske linije, še ni zadovoljivo pojasnjena. Postrvi te linije najdemo v Turčiji, Grčiji, rekah, ki se izlivajo v severni Jadran in na Korziki (Bernatchez in sod., 1992; Apostolidis in sod., 1997). Med temi področji v geološki preteklosti ni bilo sladkovodnih povezav, postrvi jadranske linije ne gojijo v ribogojnicah in jih ne vlagajo v reke. Pogosto je tudi neskladje med filogenijo mitohondrijske in jedrne DNA (Avise, 2000). Primer je mehkoustna postrv iz Žrnovnice in Jadra (Hrvaška), ki ima jedrna zaporedja, značilna za vrsto *S. obtusirostris* in mtDNA, ki sodi v jadransko linijo *S. trutta* (Odak, 2004).

Pretirano poenostavljanje filogenije je pogosto posledica uporabe mtDNA, zato je najboljša rešitev vključitev zaporedij jedrne DNA v raziskavo (Zhang in Hewitt, 2003).

2.6.2 Jedrna DNA

2.6.2.1 Mikrosateliti

V populacijskih študijah uporabljamo mikrosatelite, ki imajo variabilno število zaporednih ponovitev (ang. VNTR, variable number of tandem repeats), zato jih lahko enostavno ločimo med seboj po dolžini (Nakamura in sod., 1987). Mikrosatelitni markerji so kratki segmenti DNA, ki vsebujejo ponovitve motivov iz 1–6 baznih parov. Razporejeni so po celotnem evkariontskem genomu, manj jih je le v kodogenih regijah in na telomerah. Ker jih je v genomu veliko, je njihovo odkrivanje dokaj enostavno, najpogosteje uporabljani so mikrosateliti z dinukleotidno ponovitvijo CA in TG (Goldstein in Schlötterer, 1999). Pri določanju števila ponovitev lahko prihaja do razlik med posameznimi metodami elektroforeze. Najenostavnejše rešitve so enaki pogoji in kriteriji odčitavanja za vse vzorce, lažne signale pa lahko odstranimo s prilagajanji PCR (Fernando in sod., 2001).

Za mikrosatelite še ni univerzalnega evlucijskega modela, vendar pa le ta pri populacijskih študijah ni pomemben. Tako na osnovi mikrosatelitov preučujemo zgodovino in sedanost populacije, na primer križanja, parjenja v sorodstvu, odkrivamo ozka grla, ocenjujemo spolno obnašanje, socialne strukture in genetske strukture populacij. Opisani so primeri mikrosatelitnih zaporedij s funkcionalno vlogo kodirajočih ali nadzornih elementov (Goldstein in Schlötterer, 1999), vendar pri populacijskih študijah privzamemo, da mikrosateliti niso podvrženi selekciji.

Uporaba mikrosatelitov je razširjena predvsem zaradi naslednjih lastnosti (Jug, 2002):

- večinoma enostavna izolacija DNA,
- uporabljamo lahko veliko lokusov,
- možno je pomnoževanje večih lokusov hkrati v eni verižni reakciji s polimerazo, s čimer prihranimo čas in znižamo ceno, ter
- uporabljamo lahko material, ki ni pridobljen na invaziven način (slina, dlaka, iztrebki), torej brez žrtvovanja organizmov.

Za posamezne vrste ali populacije postrvi so bili odkriti diagnostični aleli, torej taki, ki ne obstajajo pri nobeni drugi vrsti ali populaciji. Hibridne cone in odsotnost neintrogresiranih (genetsko čistih) vrst pa onemogočajo določitev diagnostičnih alelov, saj so v teh primerih posamezni aleli prisotni v več kot eni populaciji, običajno z drugačno frekvenco.

Raznolikost mikrosatelitov določamo praviloma na osnovi razlik v dolžinah pomnožene DNA, kar je lahko zavajajoče. Homoplazija pri mikrosatelitih pomeni prisotnost vsaj dveh alelov enake dolžine na istem mikrosatelitnem lokusu, ki pa imata drugačen izvor (Jarne in Lagoda, 1996). Lahko celo izvirata iz istega alela, vendar imata različni evolucijski poti in posledično različno nukleotidno zaporedje (Angers in Bernatchez, 1997). Homoplazija lahko vodi do podcenjevanja raznolikosti obravnavanih populacij. Problemu se izognemo z določitvijo nukleotidnega zaporedja mikrosatelita, bistveno ceneje pa je enostavno povečati število mikrosatelitnih lokusov v raziskavi in s tem zmanjšati vpliv morebitne homoplazije na rezultate statistične analize.

2.6.2.2 Točkovne mutacije (SNP)

Spremembe v posameznih nukleotidih v zaporedju imenujemo točkovne mutacije (SNP, ang. single nucleotide polymorphism), večinoma gre za nukleotidne zamenjave (substitucije), redkeje za insercije in delecije. Pri pregledovanju človeškega genoma se za uporabne SNP–je šteje tiste, ki imajo frekvenco vsaj 1 % (Kruglyak in Nickerson, 2001). Alele se določa z ugotavljanjem zaporedja ali pa s pomočjo specifičnih endonukleaz, ki različne genotipe po PCR razrežejo v različne restrikcijske profile (RFLP, ang. restriction fragment lenght polymorphism).

SNP–je odkrivajo pri določanju nukleotidnega zaporedja, pred mikrosateliti imajo nekatere prednosti. Predvsem zanimivi so tisti SNP–ji, ki se nahajajo v kodirajočih regijah ali vsaj v intronih, ki se dedujejo vezano z določeno kodirajočo regijo. Diagnostični SNP–ji za izbrano populacijo, ki sami ne vplivajo na aminokislinsko zaporedje, se dedujejo vezano z drugimi SNP–ji, ki vplivajo na aminokislinsko zaporedje in na katere deluje selekcijski pritisk (Ferguson, 1994) ter so relevantni za adaptacijo populacije (Eanes, 1999). Pri postrveh so najbolj znani SNP–ji gena, ki kodira laktat dehidrogenazo (McMeel in sod., 2001).

2.7 OSNOVNI PRINCIPI STATISTIČNIH ANALIZ

2.7.1 Faktorielna korespondenčna analiza

Multivariatne statistične metode so glavno orodje za preučevanje genetske variabilnosti. Korespondenčna analiza (CA, ang. correspondence analysis) je ena od mnogih multivariatnih metod, pri njej podatke razporedimo v matriko \mathcal{X} oblike $(n \times p)$, v kateri je p frekvenc kvalitativnih spremenljivk za n osebkov. Kvalitativna spremenljivka je lahko osebkov spol in pigmentacija, v populacijski genetiki pa aleli na posameznih mikrosatelitnih/SNP lokusih. CA ponuja interpretacije povezav med vrsticami in stolpci v matriki, torej asociacije kvalitativnih spremenljivk (spola, pigmentacije, genotipa) z osebki. Posamezni stolpci matrike imajo lahko večji pomen (utež) na vrstice kot drugi, zato lahko zmanjšamo dimenzije matrike, torej jo poenostavimo, podobno kot pri analizi

glavnih komponent (PCA, ang. principal component analysis). Pri CA razčlenimo mero za asociacijo, običajno skupno χ^2 , redkeje skupno varianco, na lastne vrednosti λ_k .

Uravnoreženo matriko predstavimo na koordinatnih oseh $k = 1, 2, \dots, R$. Večinoma je zadovoljiv že dvodimenzionalen koordinatni sistem, ki zajema skupni delež celotne variance, ki ga pojasnjujeta prva dva po vrednosti največja faktorja. Zaradi interpretacije samo dela celotne CA metodo imenujemo tudi faktorielna CA ali FCA. Če je ta delež dveh faktorjev ψ_2 glede na celoto (1) zadovoljivo velik, lahko interpretiramo graf.

$$\psi_2 = \frac{\lambda_1 + \lambda_2}{\sum_{k=1}^R \lambda_k} \quad \dots (1)$$

V primeru populacijskih študij, kjer genotipiziramo posamezne osebkke, je interpretacija naslednja:

- Če sta na grafu dve točki (dva osebka) skupaj, sta si genotipa teh dveh osebkov podobna. Če sta zelo narazen, sta genotipa zelo različna.
- Nagnetenost točk v gručo pomeni, da obstaja vsaj en alel, ki je tem osebkom skupen (velika utež nekega stolpca).
- Izhodišče koordinatnega sistema predstavlja "povprečni" genotip, točke daleč od izhodišča imajo alele, ki se pojavljajo z nizko frekvenco glede na vse obravnavane osebkke.
- Interpretacija ima tem večjo težo, čim večji delež celotne variance je pojasnjen na grafu (Härdle in Simar, 2003).

2.7.2 Matematično ozadje genetskega polimorfizma

Na osnovi zaporedij DNA lahko sklepamo na evolucijo v daljšem časovnem obdobju. Vendar so spremembe zaporedij DNA v davni preteklosti in genetski polimorfizem sedanjih populacij sestavni del istega evlucijskega procesa (Nei, 1987). Osnova analize genetskega polimorfizma je frekvenca izbranega alela. Frekvenco genotipa $A_i A_j$ označimo z X_{ij} . Frekvenca i -tega alela je torej:

$$x_i = X_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{j \neq i} X_{ij} \quad \dots (2)$$

Če je populacija v Hardy–Weinbergovem ravnotežju, sta frekvenci homozigotov A_iA_i in heterozigotov A_iA_j :

$$X_{ii} = x_i^2, \quad X_{ij} = 2x_ix_j \quad \dots (3)$$

Delež heterozigotnosti izračunamo na tri načine, opaženi delež heterozigotnosti ($H_{obs.}$) pričakovani delež heterozigotnosti ($H_{exp.}$) in pričakovani delež heterozigotnosti brez vpliva majhne populacije ($H_{n.b.}$) (Nei, 1978). Naj bo x_i frekvenca i -tega alela na lokusu k na vzorcu populacije. Analiziramo n organizmov na r lokusih.

$$H_{exp.} = \frac{1 - \sum x_i^2}{r} \quad \dots (4)$$

$$h = \frac{2n(1 - \sum x_i^2)}{2n - 1}, \quad H_{n.b.} = \sum_{k=1}^r \frac{\sum h_k}{r} \quad \dots (5)$$

Parametri F , F -statistika ali indeksi fiksacij opisujejo odstopanja od Hardy–Weinbergovega ravnotežja znotraj posameznih populacij (F_{IT}), med populacijami (F_{ST}) in znotraj vseh populacij (F_{IS}) (Wright, 1951). Socialna struktura populacij in migracije posameznih osebkov se odraža na genetski strukturi populacij, torej tudi na vrednostih parametrov F . Tako ima na primer notranja razdelitev populacije za posledico primanjkljaj heterozigotov ($H_{exp.} > H_{obs.}$) in pozitiven F_{IS} (de Jong in sod., 1994). Parametri F so med seboj povezani:

$$F_{IS} = \frac{F_{IT} - F_{ST}}{1 - F_{ST}} \quad \dots (6)$$

Čeprav se ti parametri na široko uporabljajo pri analizi genetskih podatkov, so zanesljivi le pri bialelnih lokusih. Raziskovalci si niso enotni, kateri model je najboljši za multialelne lokuse (Guinand, 1996). Trenutno najbolj obetavni sta oceni za F_{ST} in F_{IS} z oznakama $\hat{\Theta}$ in \hat{f} (Weir in Cockerham, 1984). Prilagojena sta za statistično obdelavo različno velikih populacij, sestavljena sta iz istih členov:

$$\hat{\Theta} = \frac{s^2 - \frac{1}{\bar{n}-1}[\bar{p}(1-\bar{p}) - \frac{r-1}{r}s^2 - \frac{\bar{h}}{4}]}{[1 - \frac{\bar{n}C^2}{r(\bar{n}-1)}]\bar{p}(1-\bar{p}) + [1 + \frac{(r-1)\bar{n}C^2}{r(\bar{n}-1)}]\frac{s^2}{r} + [\frac{C^2}{r(\bar{n}-1)}]\frac{\bar{h}}{4}} \quad \dots (7)$$

$$1 - \hat{f} = \frac{\bar{h}}{[\frac{2\bar{n}}{\bar{n}-1}]\bar{p}(1-\bar{p}) - [\frac{2\bar{n}(r-1)}{r(\bar{n}-1)}]s^2 - [\frac{1}{\bar{n}-1}]\frac{\bar{h}}{2}} \quad \dots (8)$$

Pri čemer so \bar{p} frekvenca alela A v populaciji, \bar{n} povprečno število osebkov v populaciji, \bar{h} povprečna frekvenca heterozigotov, v katerih je alel A, C koeficient variacije velikosti populacij, s^2 varianca frekvence alela A in r število populacij. Izračuna sta narejena na modelu med seboj izoliranih populacij, vendar sta formuli (7) in (8) uporabni tudi za populacije, med katerimi je ravnovesje migracij in naključnega genetskega drsa (Raufaste in Bonhomme, 2000). Pri vseh zgoraj omenjenih izračunih velja predpostavka, da je stopnja mutacij zanemarljivo majhna.

Odstopanja od Hardy–Weinbergovega ravnotežja so lahko tudi posledica prekrivanja homolognih kromosomov in rekombinacije vezanih markerjev pri mejozi. Vezani geni so tisti, ki so na istem kromosomu. Salmonidi imajo veliko število kromosomov, ocene raziskovalcev se sabo razlikujejo, *S. obtusirostris* in *S. trutta* imata na primer po 77 do 82 kromosomov (Allendorf in Thorgaard, 1984). Če uporabimo majhno število markerjev glede na število kromosomov je manj verjetno, da so markerji vezani. Test za vezavno neravnotežje je naslednji:

$$\hat{\chi}^2 = \frac{N(\hat{D}_{..}^{ij} + \hat{D}_{.j}^{i.})^2}{[\hat{p}_i(1 - \hat{p}_i) + \hat{D}_{i.}^{i.}][\hat{q}_j(1 - \hat{q}_j) + \hat{D}_{.j}^{.j}]}, \quad \dots (9)$$

pri čemer je \hat{p}_i ocena frekvence alela i na lokusu A, \hat{q}_j ocena frekvence alela j na lokusu B, \hat{D} odstopanja od Hardy–Weinbergovega ravnotežja (indeksi zgoraj in spodaj predstavljajo dve gameti, levi in desni indeks pa dva lokusa), ocene so dobljene na N organizmih (Weir, 1979).

2.8 PROBLEMATIKA KRIŽANCEV

Križanje nima večjega pomena za sistematiko, vendar je pomemben indikator sprememb v okolju, tako naravnih kot antropogenih (Kottelat, 1997). Najpogostejši antropogeni spremembi sta prenos organizmov iz enega okolja v drugo in spreminjanje okolja, zaradi česar je primerov križanj vse več. Pogosto so križanci fertilni, zato se čez nekaj generacij pojavi introgresija, to je vnos posameznih fenotipskih in/ali genetskih značilnosti neavtohtonih primerkov v naravno populacijo. Zakonodajca v ZDA pred

letom 1990 ni ščitila križancev, ker to ne bi koristilo ohranitvi ogroženih vrst. Vendar tudi križanci pripomorejo k večji genetski raznolikosti, raziskave so potrdile genetsko introgresijo pri velikem številu (neogroženih) vrst. Ker togi standardi "genetske čistosti" pri ohranjanju vrst lahko prej škodijo kot koristijo, so zakon leta 1990 umaknili (O'Brien in Mayr, 1999).

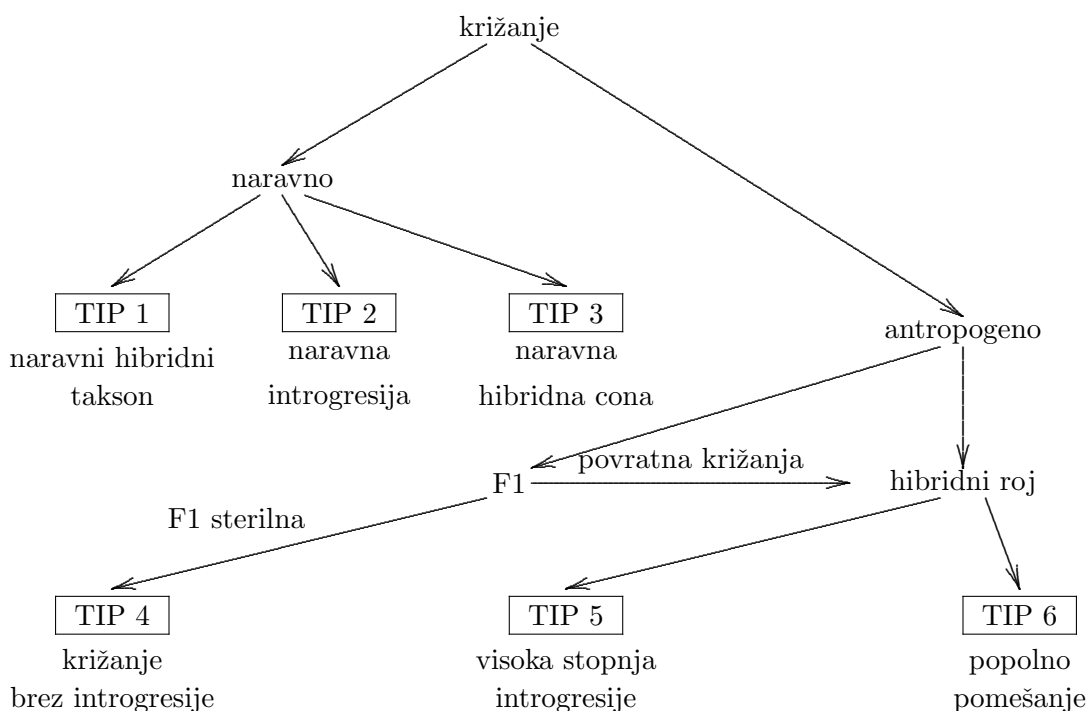
2.8.1 Različni tipi križanj

Allendorf in sod. (2001) so kategorizirali šest tipov križanj (Slika 11). Vpeljali so tudi pojem "hibridnega roja". To so generacije potomcev generacije F1 in potomci njihovih ponovnih križanj s starševskimi vrstami (t.i. povratna križanja ali "backcrosses"). Z genetskimi markerji je posamezne stopnje križanj za predstavnike hibridnega roja skrajno težko določiti, saj je potrebnih do 70 markerjev (Boecklen in Howard, 1997). Tipi križanj so naslednji:

- Naravni hibridni takson; Nastanek nove vrste kot rezultat križanja dveh vrst, tudi hibridna speciacija. *Gila seminuda* je kot kaže vrsta krapovca, nastala iz pleistocenskega križanja *G. elegans* in *G. robusta* (DeMarais in sod., 1992). Pri salmonidih sta podobna primera vrsti *Salmo carpio*, križanec *S. trutta* in *S. marmoratus* (Giuffra in sod., 1996) in *S. obtusirostris salonitana*, križanec *S. obtusirostris* in *S. trutta* jadranske linije (Odak, 2004).
- Naravna introgresija; Introgresija je vnos manjše količine genetskega materiala z eno vrsto v drugo s križanjem brez opazne spremembe fenotipa. Clarke in sod. (1998) so opisali "molekularno puščanje" (ang. molecular leakage) med vrstama otoških kač *Partula tainiata* in *P. suturalis* zaradi občasnega križanja.
- Naravna hibridna cona; Na stičišču dveh vrst se pojavi populacija križancev, ki je lahko stabilna več generacij, vendar ne povzroči zlitja starševskih vrst. Rdeče in rumeno obarvana detla vrste *Colaptes auratus* imata ozko hibridno cono v smeri sever–jug čez severnoameriške prerije. Starševski obliki se ohranjata zaradi spolne selekcije (Moore in Price, 1993).
- Križanje brez introgresije; Sterilni križanci, npr. mule in mezgi, križanci konjev (*Equus caballus*) in oslov (*E. asinus*).
- Visoka stopnja introgresije; Vnos genetskega materiala v takem obsegu, da je opazen vpliv na fenotip, vendar je še možno določiti čiste primerke starševskih vrst. Pred začetkom programa za ponovno naselitev soške postrvi je bilo v porečju malo čistih soških in potočnih postrvi ter veliko njihovih križancev (Berrebi in sod., 2000).

- Popolno pomešanje; Izginotje čistih starševskih populacij, primer križanja rac *Anas superciliosa* in *A. platyrhynchos* na Novi Zelandiji (Rhymer in sod., 1994).

Ugotovitev tipa križanja je bistveno za naravovarstvene programe. Naravni hibridi so del normalnega evlucijskega procesa, s tega stališča je zanimiva vloga križancev v ekosistemu. Za križance, ki so posledica človeškega posega v naravo je potrebna odločitev, ali je možno rešiti starševski vrsti ali vsaj zaščititi novo hibridno vrsto (Allendorf in sod., 2001).



Slika 11: Radzelitev različnih tipov križanj glede na nastanek (naravno ali antropogeno) in obseg (stopnja introgresije) (Allendorf in sod., 2001).

Figure 11: Categorisation of hybridisation (Allendorf *et al.*, 2001).

Sterilni križanci so pogost pojav, ki ga lahko enostavno določimo tudi z genetskimi markerji. Sterilna F1 generacija bo heterozigorna na lokusih, ki so značilni za starševske populacije. Sterilnost pa je lahko tudi drugačna. Zlasti pri pticah je pogost pojav sterilnost heterogametnih križancev (pri pticah so to samice) in fertilitnost homogametnih križancev (samcev), tako imenovano Haldaneovo pravilo. Na genetskem nivoju je

to pravilo vzrok za na spol vezano introgresijo jedrnih genov in za nižjo stopnjo divergencije mtDNA glede na jedrno DNA (Sætre in sod., 2001). Večinoma so pri ribah, tudi pri salmonidih, samice XX (samci so XY), torej homogametne. Pri nekaterih vrstah rib pa so samice ZW (samci ZZ), torej heterogametne. Fiziološka sprememba spola pri odraslih primerkih je tudi pogosta, lahko se sproži umetno, npr. s steroidnimi hormoni ali naravno, npr. s spremembo temperature okolice (Baroiller in sod., 1999).

2.8.2 Vlaganja rib in ohranitev avtohtonih vrst

V veliki meri je križanje posledica vlaganja rib, vplive posegov v okolje na križanje je težje oceniti. V območju severnega Sredozemlja je znanih 70 vloženi ribjih vrst, iz drugih evropskih porečij (translokacije) ali iz drugih kontinentov (eksotične vrste). Približno 60% teh vrst je bilo vloženi v zadnjih 40-ih letih. Razlogi za to so:

- večja uspešnost ribolova, torej več prodanih ribolovnih dovolilnic,
- povečanje donosa komercialnih ribogojnic,
- naključje (pobeg živih vab, akvarijskih rib in rib iz ribogojnic),
- upravljanje mokrišč in
- omejevanje razmnoževanja komarjev (Crivelli, 1995).

Zaščita biotske raznolikosti je predmet številnih mednarodnih konvencij pod okriljem Združenih narodov in Evropske unije. Njihov glavni namen je ohranitev in trajno izkoriščanje biološke raznolikosti za dobrobit sedanjih in prihodnjih generacij (Biber-Klemm, 1995). Kratkoročne rešitve ogroženih vrst so najprej zaščita same vrste, dolgoročno pa zaščita celotnega ekosistema. Predlagane rešitve so prenos ogroženih vrst v druga, zaščiten okolja (Minckley, 1995), razmnoževanje ogroženih vrst v ujetništvu in vlaganje njihovih potomcev v njihova naravna okolja (Philippart, 1995). Seveda pa je nujna tudi zakonska zaščita in vrnitev okolja v stanje, ki omogoča dolgoročno ohranitev vrst (Crivelli in Maitland, 1995).

Natančna opredelitev ogorženih vrst z morfološkimi in genetskimi markerji je drugotnega pomena, ker ne zavira izumiranja vrst. Samo takojšnja zaščita ogroženih vrst, tudi če so slabo opredeljene, jih lahko reši pred izumrtjem. Glavni faktor, ki vpliva na biotsko raznolikost, je čas (Fraser in Bernatchez, 2001). In čas nikjer na svetu ni na strani avtohtonih salmonidnih vrst.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorčenje

V letih 1999 in 2001 smo opravili večino zbiranja vzorcev (Preglednica 1). Ribe smo omamili z elektriko (Slika 12), jim odvzeli košček repne plavuti in ga shranili v 96 % etanolu, ribe pa vrnili v reko. Vsak odvzeti vzorec ima pripisan fenotip in lokacijo izlova (Priloga A). Vzorčenje je potekalo naključno, ne glede na fenotip, izjema so vzorci iz spodnjega dela Neretve (Jablanica–Metković), ki so bili izbrani na podlagi fenotipa (zubatak).

Izbrali smo med seboj različne lokacije, tako so lokacije na Neretvi (Đajići in Glavatičevo) habitati mehkoustne postrvi, saj je vode več, rečno dno je prodnato. Neretva pri Glavatičevem je drstišče glavatice. Krupac se izliva v Neretvo blizu kraja Glavatičevo, vendar predvidevamo, da v njem ni mehkoustnih postrvi. Neretva pri Ocrkavljah in potok Lađanica sta najbolj odročni lokaciji, izbrani zato, ker je tam vlaganje rib v preteklosti najmanj verjetno. V Bukovico so vlagali postrvi zadnjič leta 2001, ob Ljuti pa stoji ribogojnica, s katere občasno uhajajo postrvi. Rakitnica je od Neretve ločena s slapovi, zato migracija rib po toku navzgor ni mogoča. Za Rakitnico ni podatkov o vlaganju, ni habitat mehkoustnih postrvi in glavatic, predvidevamo, da jo naseljuje samo potočna postrv.

Oznake fenotipov so zaradi časovne omejitve (ribe smo vračali v reko) zelo splošne in nezadostne za točno identifikacijo vrste. Oznako zubatak so dobili primerki z izrazito majhno glavo glede na dolžino telesa in taki z ustrezno pigmentacijo (brez pik, obarvan samo zgornji del telesa). Oznako glavatica so dobili primerki z opazno marmorirano podlago ne glede na število in barvo peg po telesu. Mehkoustne postrvi smo določali po izrazito krajši spodnji čeljusti, križance mehkoustne in potočne postrvi ali kosorje, kot jim pravijo domačini, pa po malo krajši spodnji čeljusti (Slika 8). Vse ostale ribe, ne glede na raznoliko pigmentacijo, smo označili kot fenotipske potočne postrvi. V nadaljevanju bomo izraze glavatica, kosor, mehkoustna postrv, potočna postrv in zubatak uporabljali kot grob opis fenotipov, znanstvena imena pa za primerke, opredeljene z genetskimi markerji ali primerke, ki so jih opisali drugi raziskovalci.

V raziskavi smo uporabili tudi dva vzorca genetsko čiste soške postrvi *S. marmoratus* iz Zadlaščice (Slovenija) za primerjavo z glavatico *S. marmoratus* iz porečja Neretve.



Slika 12: Zemljevid z lokacijami vzorčenja (levo) in vzorčenje v Rakitnici s pomočjo elektrike, ki začasno omami ribe (desno).

Figure 12: A map of sampling locations (left) and electrofishing in the River Rakitnica (right).

Preglednica 1: Vzorčenje po lokacijah (navedena so imena rek oz. potokov) in fenotipih.

Table 1: Sampling by locations (names of rivers or streams) and by phenotypes.

Lokacija	Fenotip	Št. osebkov	Po lokaciji
Bukovica	potočna postrv	9	9
Krupac	kosor	1	11
	potočna postrv	10	
Lađanica	potočna postrv	5	5
Ljuta	kosor	1	10
	potočna postrv	9	
Neretva (Đajići)	mehkoustna postrv	1	1
Neretva (Glavatičevo)	glavatica	8	61
	kosor	10	
	mehkoustna postrv	21	
	potočna postrv	22	
Neretva (Jablanica–Metković)	zubatak	4	4
Neretva (Ocrkavlje)	glavatica	1	60
	kosor	1	
	mehkoustna postrv	1	
	potočna postrv	57	
Rakitnica	potočna postrv	45	54
			Skupaj 206

3.1.2 Kemikalije

agaroz	FMC, ZDA
amonijev acetat	Sigma, ZDA
borna kislina	Sigma, ZDA
EDTA	Sigma, ZDA
etidijev bromid	Sigma, ZDA
etanol 96–odstotni	Merck, Nemčija
fenol	Fluka, Nemčija
formamid	Applied Biosystems, ZDA
HCl	Merck, Nemčija
izoamil–alkohol	Merck–Alkaloid, Makedonija
kalijev acetat	Kemika, Hrvaška
kalijev klorid	Kemika, Hrvaška
kloroform	Merck–Alkaloid, Makedonija
ledocetna kislina	Merck, Nemčija
magnezijev sulfat	Kemika, Hrvaška
mineralno olje	Sigma, ZDA
Na–acetat	Merck–Alkaloid, Makedonija
NaCl	Merck, Nemčija
Na–dodecil sulfat (SDS)	Merck, Nemčija
NaOH	Merck, Nemčija
magnezijev klorid	Merck–Alkaloid, Makedonija
Tris–baza	GATC, Nemčija
TSR	Applied Biosystems, ZDA
voda za celične kulture	Sigma, ZDA

3.1.3 Pripravljeni seti kemikalij

DNA sequencing Kit, BigDye TM Terminator	Perkin Elmer, ZDA
Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction	
Wizard [®] Genomic DNA	Promega, ZDA
Purification Kit	

3.1.4 Encimi

endonukleaze <i>AluI</i> , <i>BseGI</i> in <i>SatI</i>	Fermentas, Litva
endonukleaze <i>NdeI</i> , <i>RsaI</i> in <i>SmaI</i>	Promega, ZDA
rekombinantna <i>Taq</i> DNA–polimeraza	Fermentas, Litva
proteinaza–K	Life Technologies, ZDA
RNAza	Fermentas, Litva

3.1.5 Označevalci velikosti

100 bp	Fermentas, Litva	vsebuje fragmente DNA, ki so dolgi 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 in 1031 bp
1 kbp	Fermentas, Litva	vsebuje fragmente DNA, ki so dolgi 250, 500, 750 bp, 1, 1,5 2 2,5 3, 3,5, 4, 5, 6, 8 in 10 kbp
TAMRA350	Applied Biosystems, ZDA	vsebuje fragmente, označene s fluorescentno skupino TAMRA, ki so dolgi 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340 in 350 bp
ROX350	Applied Biosystems, ZDA	vsebuje fragmente, označene s fluorescentno skupino ROX, ki so dolgi 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340 in 350 bp

3.1.6 Rastopine

aplikacijski pufer	0,25–odstotno bromfenol modro 0,25–odstoten ksilen cianol 30–odstoten glicerol
50×pufer TAE	2 M Tris acetat 0,1 M EDTA (pH 8,0)
10×pufer TBE	0,5 M Tris baza 0,5 M borna kislina 10 mM EDTA (pH 8,3)
pufer TEN	1 M Tris–HCl 0,5 M EDTA 2 M NaCl

3.1.7 Laboratorijska oprema

ABI PRISM TM 310	Perkin Elmer, ZDA
avtomatske pipete (10–1000 μ l)	Gilson, Francija
centrifuga 5417C	Eppendorf, Nemčija
vakuumski koncentrador	Eppendorf, Nemčija
Gel Doc 1000	BioRad, ZDA
inkubatorji	Tehtnica, Slovenija; Eppendorf, Nemčija

kadičke za elektroforezo	Pharmacia, Švedska
konično mešalo (vortex)	Retsch, ZDA
magnetna mešala	Tehtnica, Slovenija
mikroprocesorsko vodeni termostati	MJ Research, ZDA
UV–transiluminator	Camag, Švica

3.1.8 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 2: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov in ustreznih temperaturnih programov.

Opis temperaturnih programov v Preglednici 3.

Table 2: A list of primers used in our survey with corresponding PCR programmes. For detailed PCR programmes see Table 3.

Oznaka	Nukleotidno zaporedje		Program
28Riba	CACCCCTTAACCTCCCAAAGCTAAG	Snoj in sod., 2000	1
cytR	GTGTTATGCTTTAGTTAAGC	Bernatchez in Danzmann, 1993	
LDH-F	GGCAGCCTCTTCCCTCAAACGCCCAA	McMeel in sod., 2001	2
LDH-R	CAACCTGCTCTCTCCCTCCTGCTGACGAA		
GH2C-F	ATCGTGAGCCCAATCGACAAGCAG	Oakely in Phillips, 1999	3
GH2C-R	GGGTACTCCCAGGATTC AATCAGG		
Ssa197-F	TET- GGGTTGAGTAGGGAGGCTTG	O'Reilly in sod., 1996	4
Ssa197-R	TGGCAGGGATTTGACATAAC		
Str24-F	FAM- CACGGGAATACACACACGTG	Poteaux 1995	4
Str24-R	GACAGGGTCATTGATGTCATC		
Str591-F	JOE- ATTCTTCGGCTTTCTCTTGC	Poteaux 1995	4
Str591-R	ATCTGGTCAGTTTCTTTATG		
BFRO002-F	HEX- ATGTTTTTGGACTGCACTATGTATTG	Sušnik in sod., 1997	5
BFRO002-R	GGAGATAAGAGTCAACGAGGC		

Začetne oligonukleotide smo uporabili za pomnoževanje kontrolne regije mtDNA (28Riba in cytR), dela gena, ki kodira laktat dehidrogenazo (LDH-F in LDH-R), dela gena, ki kodira rastni hormon (GH2C-F in GH2C-R) in štirih mikrosatelitnih lokusov (Ssa197-F in Ssa197-R, Str24-F in Str24-R, Str591-F in Str591-R ter BFRO002-F in BFRO002-R).

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija DNA

DNA, izolirano po treh različnih spodaj opisanih metodah, redčimo z vodo za celične kulture (Sigma) v razmerju 1:10 in uporabimo v verižni reakciji s polimerazo kot vzorčno DNA. Izolati DNA po hitri metodi niso primerni za pomnoževanje mtDNA.

3.2.1.1 Fenolna ekstrakcija

Košček repne plavuti smo sprali z destilirano vodo in prenesli v 1,5 ml reagenčno posodico. Dodali smo 200 μ l pufra TEN, 7 μ l 10–odstotnega SDS in 5 μ l proteinaze-K (Life Technologies), premešali mešanico z obračanjem reagenčne posodice in čez noč inkubirali pri 37°C.

Nastali lizat smo prečistili s fenolno ekstrakcijo, tako da smo mu dodali enak volumen mešanice fenola, kloroforma in izoamilnega alkohola (25:24:1), mešanico premešali z obračanjem, nato pa s 5 minutnim centrifugiranjem pri 10000 g ločili fazi. Zgornjo, vodno fazo, smo prenesli v novo reagenčno posodico in po enakem postopku ekstrahirali še z mešanico kloroforma in izoamil–alkohola (24:1). Genomsko DNA v vodni fazi smo oborili z dodatkom 2,5–kratnega volumna ledeno hladnega absolutnega etanola in obračali reagenčno posodico do nastanka oborine. Vzorce smo shranili za 1 uro pri -20°C , nato 10 min centrifugirali pri 10000 g. Odpipetirali smo supernatant in posušili oborino na zraku. DNA smo raztopili v $25\ \mu\text{l}$ vode za celične kulture (Sigma) in shranili v hladilniku pri 4°C .

Upešnost izolacije smo preverili v 1,5–odstotnem agaroznem gelu po barvanju z etidijevim bromidom.

3.2.1.2 Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit

Sledili smo navodilom proizvajalca Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit, uporabili smo protokol za izolacijo DNA iz mišjih repov.

3.2.1.3 Hitra metoda

Majhen košček repne plavuti speremo z destilirano vodo in prenesemo v 0,5 ml reagenčno posodico. Dodamo $50\ \mu\text{l}$ NaOH (0,2 M) in inkubiramo ob stresanju pri 97°C . Nevtraliziramo raztopino z dodatkom $50\ \mu\text{l}$ HCl (0,2 M) in $2\ \mu\text{l}$ Tris–base (1 M, pH 8,3).

3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Molekule DNA se v električnem polju gibljejo s hitrostjo, ki je predvsem odvisna od njihove velikosti in zamreženosti medija, v katerem potujejo. Zato lahko z gelsko elektroforezo ocenimo velikost molekul DNA po PCR ali po restrikciji z endonukleazami, preverjamo uspešnost izolacije DNA ter izoliramo fragmente DNA z določenim številom baznih parov.

Koncentracijo agaroze v gelu smo izbirali glede na pričakovano dolžino molekul DNA. Najpogosteje smo uporabljali 1,5–odstotni agarozni gel, ki je primeren za ločevanje fragmentov 200–4000 bp.

Agarozni gel smo pripravili iz agaroze in $0,5\times\text{TBE}$ pufru. Mešanico smo zavreli v mikrovalovni pečici in jo ohlajali na elektromagnetnem mešalu. Dodali smo $0,5\ \mu\text{l}$ etidijevega bromida ($0,5\ \mu\text{g}/\text{ml}$) in vlili še vedno tekoči gel v pripravljene modelčke. Strjevanje pri sobni temperaturi je trajalo 10–20 min.

Vzorcem DNA smo pred vnosom v gel dodali aplikacijski pufer (0,25–odstotno brom-fenol modro, 0,25–odstoten ksilen cianol, 30–odstoten glicerol v vodi) in jih previdno

odpipetirali v luknjice v agaroznem gelu. V $0,5 \times \text{TBE}$ elektroforeznem pufru in pri napetosti 120 V je elektroforeza tekla 30–60 min. Etidijev bromid (EtBr) v tem času interkalira med baze DNA in fluorescira pri vzbujevalni svetlobi valovne dolžine 302 nm, zato smo gele po elektroforezi fotografirali na UV–transiluminatorju.

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo ali PCR (ang. polimerase chain reaction) je metoda za *in vitro* pomnoževanje DNA. DNA–polimeraza sintetizira komplementarno verigo od mesta na vzorčni DNA, kamor se je vezal začetni oligonukleotid. S ponavljanjem denaturacije dvojne verige DNA molekul, vezave začetnih oligonukleotidov in sinteze komplementarne verige v ciklih lahko DNA, ki se nahaja med dvema primerno izbranim začetnima oligonukleotidoma, eksponentno pomnožujemo.

Reakcijsko zmes smo pripravljali v ločenem prostoru, kjer ne uporabljamo vzorcev, ki vsebujejo DNA. Vzorčno DNA smo dodajali v drugem prostoru. Uporabili smo dve različni mešanici, eno za pomnoževanje kontrolne regije mtDNA in drugo za pomnoževanje jedrne DNA.

mtDNA	jedrna DNA	
13,75	6,1	μl vode (Sigma)
2	1	μl $10 \times$ pufru PCR (Fermentas)
1,2	0,9	μl 2 mM mešanice dNTP (dATP, dCTP, dGTP in dTTP)
1	0,5	μl 25 mM MgCl_2
0,5	0,25	μl 10 pmol/ μl začetnega oligonukleotida 1
0,5	0,25	μl 10 pmol/ μl začetnega oligonukleotida 2
0,05	0,02	μl <i>Taq</i> DNA–polimeraze 5 U/ μl
1	1	μl vzorčne DNA
Σ 20 μl	Σ 10 μl	

Vzorci smo vstavili v mikroprocesorsko vodeni termostat in uporabili ustrezen temperaturni program, vsi programi se začnejo z denaturacijskim korakom (5 min pri 95°C) in končajo s korakom sinteze komplementarne verige DNA (5 min pri 72°C). Ponavljajoči koraki so opisani v Preglednici 3. Program 6 omogoča reakcijo določanja nukleotidnega zaporedja (glej poglavje 3.2.6).

Preglednica 3: Opis temperaturnih programov mikroprocesorsko vodenih termostatov.

Table 3: A description of PCR programmes.

Ime programa	Denaturacija	Vezava začetnih oligonukleotidov	Sinteza komplementarne verige	Število ciklov
1	95°C, 45 s	52°C, 45 s	72°C, 2 min	31
2	95°C, 1 min	62°C, 1 min	72°C, 1 min	31
3	94°C, 45 s	58°C, 45 s	72°C, 45 s	33
4	95°C, 30 s	53°C, 20 s	72°C, 10 s	33
5	94°C, 45 s	60°C, 25 s		36
6	96°C, 30 s	50°C, 15 s	60°C, 4 min	35

3.2.4 Izolacija fragmentov DNA iz gela z elektroelucijo

Po končani elektroforezi produktov PCR smo s skalpelom izrezali kvader agaroznega gela tik pred izbranim fragmentom DNA. Luknjico smo napolnili s pufrom $0,5\times$ TAE in pri napetosti 200 V podaljšali čas elektroforeze še za 45 s oziroma dokler se ni izbrani fragment DNA eluiral v pufer v luknjici. Raztopino smo odpipetirali iz luknjice, DNA smo oborili z dodatkom nasičene raztopine NaCl in 96-odstotnega ledeno hladnega etanola ($8\ \mu\text{l}$ NaCl/ $50\ \mu\text{l}$ $0,5\times$ TBE, 2,5-kratni volumen etanola). Obarjanje je trajalo 1 uro pri -70°C ali čez noč pri -20°C . Vzorce smo 15 min centrifugirali pri 20 000 g, odpipetirali etanol, oborino DNA posušili na zraku in jo raztopili v $24\ \mu\text{l}$ vode (Sigma).

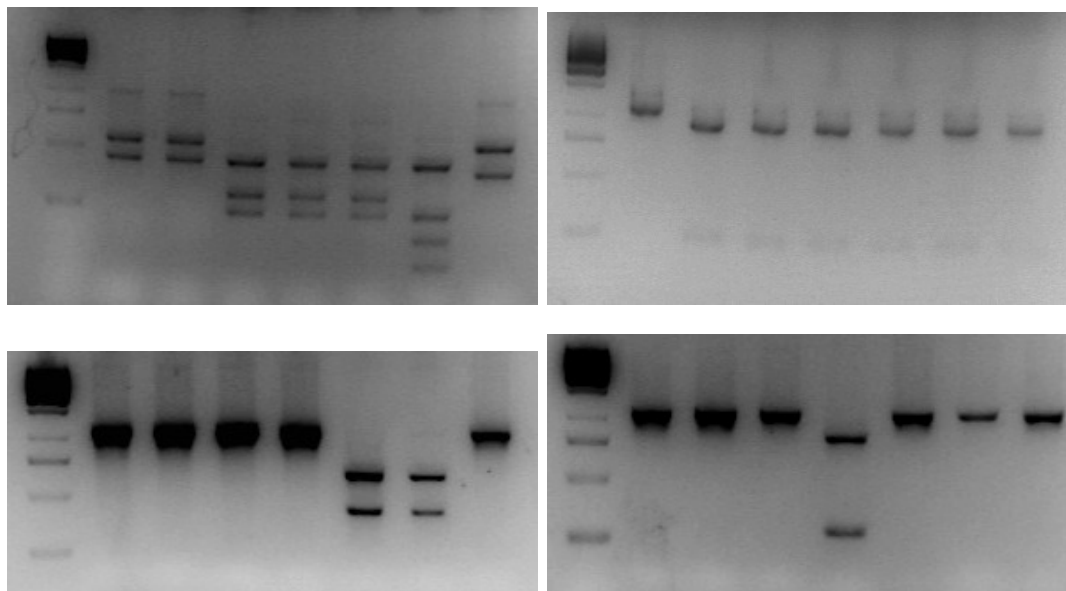
Namen izolacije DNA iz gela je odstranitev začetnih oligonukleotidov, ki se niso vgradili v produkt PCR. Iz gela izolirane fragmente lahko uporabimo v reakciji določanja nukleotidnega zaporedja (glej poglavje 3.2.6).

3.2.5 PCR-RFLP

Uporabljali smo šest endonukleaz, ki so bile izbrane na osnovi nukleotidnega zaporedja tako, da različno režejo različne mtDNA haplotipe in alele jedrnih lokusov. Vsakemu encimu ustreza restrikcijski pufer, kot ga priporoča proizvajalec encima. Pripravili smo restrikcijske mešanice s skupnim volumnom $20\ \mu\text{l}$:

- do $2\ \mu\text{g}$ DNA (produkt PCR)
- $2\ \mu\text{l}$ ustreznega 10-kratnega restrikcijskega puffra
- vodo (Sigma) do volumna $20\ \mu\text{l}$
- 1 U endonukleaze
- reakcije so tekle pri temperaturi, ki jo priporoča proizvajalec preko noči.

Z restrikcijskimi encimi *AluI* (37°C), *NdeI* (37°C), *SatI* (37°C) in *SmaI* (25°C) smo razrezali del kontrolne regije (po PCR z začetnima oligonukleotidoma 28R in CYTR) in glede na različne profile določili enega od šestih mitohondrijskih haplotipov (Slika 13).

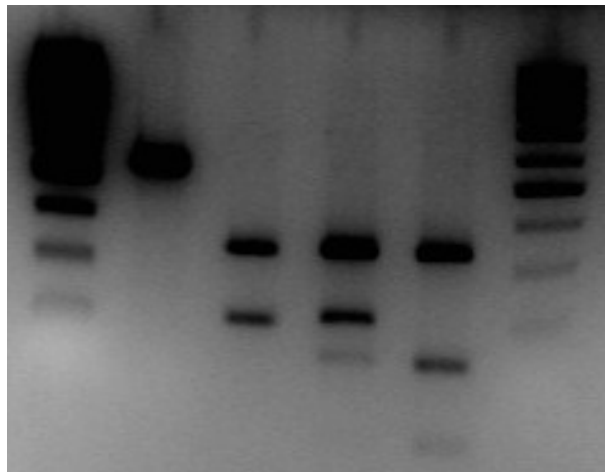


Slika 13: Profili kontrolne regije mtDNA po restrikciji z endonukleazami *AluI* (zgoraj levo), *NdeI* (zgoraj desno), *SatI* (spodaj levo) in *SmaI* (spodaj desno). V posameznih stolpcih so v vedno enakem vrstnem redu od leve proti desni: označevalce velikosti 1 kbp, haplotipi Ad-s3, AdN, Da-s1, Da-s2, At-s1, Soxy in Ma-s1.

Figure 13: Profiles of control region of mtDNA after restriction with *AluI* (above left), *NdeI* (above right), *SatI* (below left) and *SmaI* (below right). DNA samples in columns from left to right: 1 kbp size marker, haplotypes Ad-s3, AdN, Da-s1, Da-s2, At-s1, Soxy and Ma-s1.

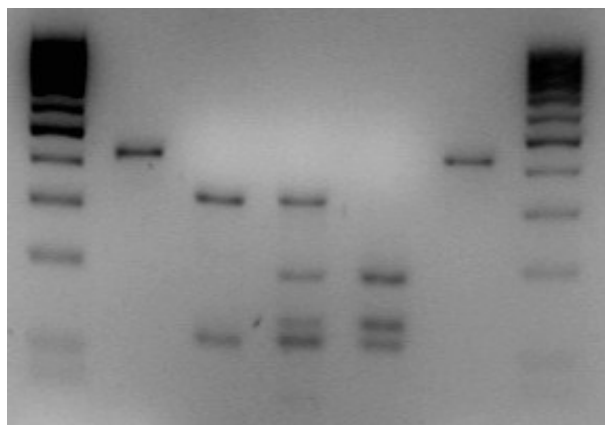
Z restrikcijskim encimom *BseGI* (55°C) smo ločili SNP (AF005912, 112. bp) v zaporedju C introna gena za rastni hormon (Slika 14). Alel C je točkovni polimorfizem, značilen za potočno postrv v porečju Neretve. Alel G je značilen za potočne postrvi iz drugih porečij in za mehkoustno postrv iz porečja Neretve.

Z restrikcijskim encimom *RsaI* (37°C) smo ločili SNP (AF488540, 259. bp) v zaporedju introna gena za laktat dehidrogenazo (Slika 15). Alel MP je značilen za mehkoustno postrv iz porečja Neretve, alel NP pa za vse ostale salmonide v tem porečju.



Slika 14: Profil C introna gena za rastni hormon (GH2C) po restrikciji z endonukleazo *BseGI*. Od leve proti desni: označevalec velikosti 100 bp, GH2C (nerezan), homozigot C, heterozigot, homozigot G, označevalec velikosti 100 bp.

Figure 14: Profile of intron C of the growth hormone gene (GH2C) after restriction with *BseGI*. In columns from left to right: 100 bp size marker, GH2C (uncut), C homozygote, heterozygote, G homozygote and 100 bp size marker.



Slika 15: Profil introna gena za laktat dehidrogenazo (LDH) po restrikciji z endonukleazo *RsaI*. Od leve proti desni: označevalec velikosti 100 bp, LDH (nerezan), homozigot MP, heterozigot, homozigot NP, LDH (nerezan), označevalec velikosti 100 bp.

Figure 15: Profile of the lactat dehydrogenase gene (LDH) after restriction with *RsaI*. In columns from left to right: 100 bp size marker, LDH (uncut), MP homozygote, heterozygote, NP homozygote LDH (uncut) and 100 bp size marker.

3.2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja

Reakcija določanja nukleotidnega zaporedja je različica verižne reakcije s polimerazo, pri kateri uporabljamo samo en začetni oligonukleotid in mešanico nukleotidov, ki

vsebujejo tudi dideoksiribonukleozid–trifosfate (ddNTP–je) s fluorescirajočo molekularno skupino. Polimeraza sintetizira vzorčni DNA komplementarno verigo dokler ne vstavi vanjo prve molekule ddNTP. Ko enoveržne molekule DNA, ki se končujejo z monomeri ddNTP, potujejo skozi električno polje, se razporedijo po velikosti. Laser oddaja svetlobo določene valovne dolžine (vzbujevalna svetloba), detektorji pa zaznajo svetlobo spremenjene valovne dolžine, ki jo oddajajo fluorescirajoče skupine molekul DNA (sevalna svetloba), ki se med seboj razlikujejo za dolžino enega nukleotida. Ker uporabljamo štiri različne fluorescirajoče skupine za vsako od štirih molekul ddNTP, lahko na osnovi fluorescirajoče svetlobe določimo zaporedje vzorčne DNA.

V reagenčno posodico smo odpipetirali 3–5 μl iz agaroznega gela izoliranega produkta PCR (glej poglavje 3.2.4), 1 pmol začetnega oligonukleotida, 4,5 μl redčene raztopine BigDye in dopolnili do 15 μl z vodo (Sigma). Reagenčno posodico smo vstavili v mikroprocesorsko vodeni termostat s temperaturnim programom 6 (Preglednica 3).

Po končanem programu smo oborili DNA z dodatkom 2 μl Na–acetata (3 M, pH 4,6) in 50 μl ledeno hladnega absolutnega etanola. Inkubirali smo 10 min v ledeni kopeli, 30 min centrifugirali pri 20000 g in sprali oborino DNA s 70–odstotnim etanolom. Oborino smo posušili na zraku in jo raztopili v 12 μl raztopine "Template Suppression Reagent". Raztopljeno DNA smo 3 min denaturirali pri 95°C, jo ohladili v ledeni kopeli, prenesli v reagenčne posodice ABI Prism in vstavili v napravo ABI Prism 310 za določanje zaporedja nukleotidov vzorčne DNA (modul "Seq POP6 Rapid (1 ml) E").

3.2.7 Ugotavljanje dolžine mikrosatelitov

Po 2 μl produkta PCR Ssa197 in BFRO 002 smo združili, dodali 0,7 μl označevalca velikosti TAMRA350 in 12 μl formamida. Mešanico smo prenesli v reagenčno posodico ABI, jo denaturirali 3 min pri 95°C, jo ohladili v ledeni kopeli in vstavili v napravo ABI Prism 310 za določanje dolžine označenih fragmentov DNA (modul "GS STR POP4 (1 ml) C").

Produkta PCR Str24 in Str591 smo pripravili enako, vendar smo uporabili označevalec velikosti ROX350 in modul "GS STR POP4 (1 ml) A". Vzorce z manj pogostimi aleli smo ponovili in preverili, prav tako tudi nekaj naključno izbranih vzorcev.

3.2.8 Analiza podatkov

3.2.8.1 Analiza mtDNA

Nukleotidna zaporedja smo uredili s programom Chromas 2.23 ©Technelysium Pty. Ltd.. S programom Clustal_X (Thompson in sod., 1997) smo jih poravnali z znanimi zaporedji iz baze podatkov GenBank.

Filogenetsko drevo smo narisali v programu MEGA (Kumar in sod., 2002). V skladu s

predhodnimi raziskavami (Bernatchez, 2001) smo uporabili metodo največje varčnosti (maximum parsimony) s 1000 samovzorčenji. Metoda temelji na neposredni primerjavi nukleotidnih zaporedij in sledi načelu, da je najbolj verjetna evolucija taka z najmanjšim številom sprememb. Pogosto pridemo po tej metodi do več kot ene rešitve, zato smo izvedli 1000 samovzorčenj in določili drevo, ki je bilo največkrat izračunano za končno rešitev. Drevo konstruiramo na vsakem informativnem mestu, to je mesto, ki daje prednost določenemu neukoreninjenemu drevesu pred drugimi (Jerman in Štern, 1999). Metoda ni uporabna za rekonstrukcijo filogenije znotraj posameznih linij.

3.2.8.2 Analiza jedrnih markerjev

Izračun deležev heterozigotnosti ($H_{obs.}$, $H_{exp.}$ in $H_{n.b.}$), ocen fiksacijskih indeksov ($\hat{\Theta}$ in \hat{f}), vezavnega neravnovesja ($\hat{\chi}^2$) in faktorielno korespondenčno analizo, kot so opisane v poglavju 2.7.1, smo izvedli s programom GENETIX 4.04 (Belkhir in sod., 2002).

Za določanje stopnje zaupanja smo uporabili metodo samovzorčenja (ang. bootstrap). Za vsako psevdopopulacijo naključno izbranih vzorcev program izračuna fiksacijski indeks. Pri analizi jedrnih markerjev smo izbrali 2500 psevdopopulacij, statistična značilnost je visoka, kadar so vrednosti za posamezne psevdopopulacije v ozkem intervalu v primerjavi s standardnim odklonom (Page in Holmes, 1998).

4 REZULTATI

4.1 TRENUTNO STANJE V POREČJU NERETVE

Glede na naša opažanja pri vzorčenju je slab nadzor nad ribolovom po državljanski vojni v Bosni in Hercegovini očiten. Ribolov z električno, dinamitom in mrežami je zdesetkal tudi glavatice v Neretvi v bližini mesta Konjic, našli smo samo 9 primerkov (4,4 % vseh vzorcev), ki so glede na fenotip križanci s potočno postrvjo. Ribiško društvo Konjic je zato že sprožilo samostojno akcijo za zaščito glavatice.

V porečju prevladuje potočna postrv (76,2 %), manj je mehokoustne postrvi (11,2 %) in kosorjev (6,3 %). V porečje so spet začeli vlagati ribe, predvsem potočne postrvi atlantske linije. Ribogojnice, kjer gojijo potočne postrvi te linije, kot je tista na reki Ljuti, še ne delujejo s polno zmogljivostjo.

Zubatka v zgornjem delu porečja Neretve ni. Alain Crivelli in Ivan Bogut sta nam prijazno priskrbela vsak po dva odrezka repne plavuti primerkov iz spodnjega dela Neretve (Jablanica–Metković). Tudi tam so najdbe zubatka redke, velja za trofejno ribo.

4.2 KONTROLNA REGIJA mtDNA

4.2.1 Haplotipi mtDNA v porečju Neretve

Od 206-ih vzorcev smo haplotipe 85-im (41 %) določili na osnovi nukleotidnega zaporedja, ostalim pa z metodo PCR–RFLP. Našli smo 6 različnih mitohondrijskih haplotipov (Preglednica 4). Najbolj pogost je AdN, (55,8 %) ki še ni bil objavljen v bazi podatkov Genbank (Priloga B).

Preglednica 4: Mitohondrijski haplotipi v porečju Neretve. V oklepajih število vzorcev, ki smo jim določili haplotip na osnovi nukleotidnega zaporedja.

Table 4: Mitochondrial haplotypes in the River Neretva drainage. Number of sequenced samples in parentheses.

Haplotip	Genebank oznaka	Št.
Ad-s3	M97967	23 (20)
AdN		115 (38)
At-s1	M97969	15 (4)
Da-s1	M97973	20 (2)
Da-s2	M97974	6 (3)
Soxy	AF488535	27 (21)
Skupaj		206 (85)

Uporabili smo oštevilčenje polimorfizmov kontrolne regije mtDNA po Bernatchezu (2001). Za haplotipe jadranske (Ad) linije sta značilna dva sinapomorfizma, nukleotida C₄₁ in C₂₇₈ (Bernatchez, 2001). Izjemi sta haplotipa Ad-s9 (delecija 41. nukleotida) in AdN (T₂₇₈). Običajno se haplotipi znotraj linije med seboj razlikujejo v posameznih nukleotidnih zamenjavah (Preglednica 5). AdN se od haplotipov Ad linije in vseh drugih linij razlikuje v dveh nukleotidnih zamenjavah, in sicer na pozicijah 141 (C→T) in 278 (C→T). To sta tudi edini razliki v primerjavi z najbolj podobnim haplotipom, Ad-s2.

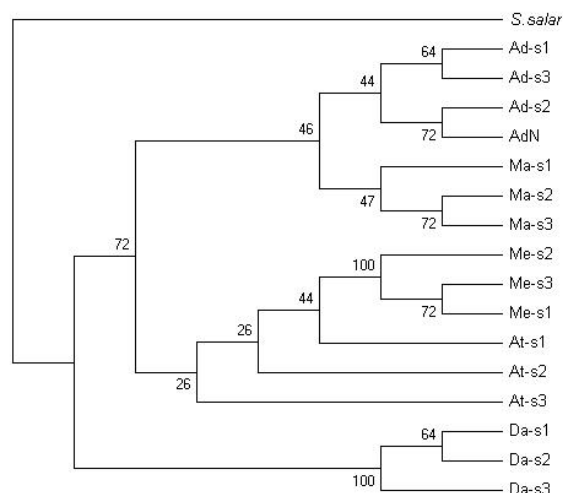
Preglednica 5: Primerjava zaporedja AdN (zadnja vrstica) z nekaterimi zaporedji iz baze podatkov Genbank. Polimorfna mesta so oštevilčena po Bernatchezu (2001).

Table 5: A comparison of AdN haplotype (last row) with some sequences from Genebank. Polymorphic sites are numbered in accordance with Bernatchez (2001).

Haplotype	Polimorfna mesta																			
	7	16	22	41	59	69	86	95	128	141	162	194	212	250	251	252	259	278	279	280
At-s1	T	T	A	T	C	A	T	T	/	C	G	T	A	G	A	T	T	G	C	T
At-s2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-
At-s3	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Da-s1	-	C	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-
Da-s2	-	C	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	-	-	-	-
Da-s3	-	C	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	G	-	-	-	-
Ma-s1	-	-	-	C	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-
Ma-s2	-	-	-	C	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T
Ma-s3	-	-	-	C	-	-	-	-	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	A	T
Me-s1	-	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Me-s2	-	-	-	T	-	-	-	-	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Me-s3	C	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
Ad-s1	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
Ad-s2	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	-
Ad-s3	-	-	-	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
Ad-s4	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
Ad-s5	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-
Ad-s6	-	-	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
Ad-s7	-	-	-	C	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
Ad-s8	-	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
Ad-s9	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
Ad-s10	-	-	-	C	-	G	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-
AdN	-	-	-	C	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	C	T	-

Zamenjava 278. sinapomorfne nukleotida, je verjetno ponovna nukleotidna zamenjava ali sekundarna mutacija. Pri donavski, atlantski in sredozemski liniji je na tej poziciji G, pri marmoratus pa A. Kljub tej zamenjavi smo s programom MEGA haplotip AdN uvrstili v jadransko filogeografsko linijo (Slika 16), zato smo ga poimenovali AdN (Ad-jadranska linija N-Neretva). Verjetnosti za razvejanje filogenetskega drevesa znotraj linij so nizke zaradi majhnih razlik med haplotipi.

Dva haplotipa jadranske linije iz porečja Neretve, Ad-s3 in AdN, se razlikujeta v štirih nukleotidnih zamenjavah (pozicije 59, 141, 259 in 278). V porečju sta prisotna dva haplotipa donavske linije, Da-s1 in Da-s2, ki se razlikujeta v enem nukleotidu (pozicija 251), haplotip atlantske linije At-s1 in haplotip Soxy, značilen za podvrsto mehokoustne postrvi, ki živi v porečju Neretve (*S. obtusirostris oxyrhynchus*).



Slika 16: Filogenetsko drevo z novim haplotipom AdN na osnovi nekaterih zaporedij 5' dela kontrolne regije mtDNA. Metoda največje varčnosti (maximum parsimony), 1000 samovzorčenj.

Figure 16: Phylogenetic tree based on some sequences from GeneBank with the newly discovered AdN haplotype. Maximum parsimony method, 1000 bootstrap replications.

4.2.2 Distribucija haplotipov

Vzorci iz različnih lokacij se zelo razlikujejo po frekvenci posameznih haplotipov (Preglednica 6). Na lokacijah z največjim številom vzorcev, Neretva Ocrkavlje, Neretva Glavatičevo in v Rakitnici, prevladuje haplotip AdN. Frekvenca haplotipa Soxy je nižja v zgornji lokaciji na Neretvi pri Ocrkavljah (5 %) kot na spodnji pri Glavatičevem (32,8 %). Haplotipi atlantske in donavske linije prevladujejo v Bukovici (100 %) in Ljuti (80 %), haplotip donavske linije Da-s1 pa ima visoko frekvenco tudi v Rakitnici (42,2 %).

Preglednica 6: Razporeditev mitohondrijskih haplotipov glede na mesto izlova.

Table 6: Geographical distribution of mitochondrial haplotypes.

Lokacija	Ad3	AdN	At1	Da1	Da2	Soxy
Bukovica			8		1	
Krupac	2	5			1	3
Lađanica		4				1
Ljuta	1	1	6		2	
Neretva (Đajici)		1				
Neretva (Glavatičevo)	5	32	1	1	2	20
Neretva (Jablanica–Metković)		4				
Neretva (Ocrkavlje)	14	43				3
Rakitnica	1	25		19		

Haplotip AdN je prisoten pri vseh fenotipih (Preglednica 7). Haplotipi atlantske in donavske linije so z eno izjemo, prisotni le pri potočnih postrveh. Mehkoustna postrv je edini fenotip, pri katerem najpogostejši haplotip ni AdN temveč Soxy (73,9 %).

Preglednica 7: Razporeditev mitohondrijskih haplotipov glede na fenotip.

Table 7: Distribution of mitochondrial haplotypes for different phenotypes.

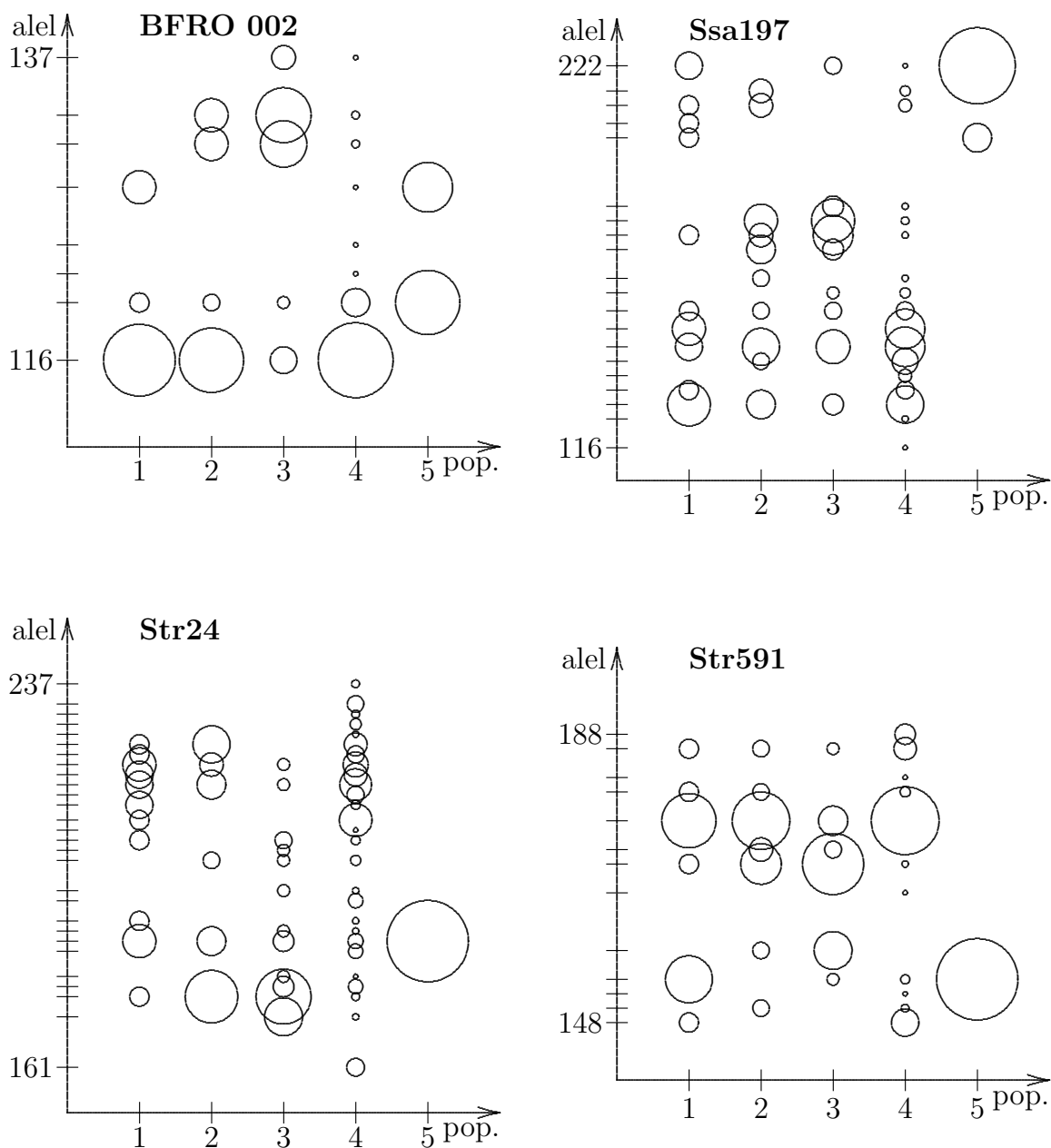
Fenotip	Ad3	AdN	At1	Da1	Da2	Soxy
Glavatica	1	7				1
Kosor	1	7		1		3
Mehkoustna postrv		6				17
Potočna postrv	21	91	15	19	6	6
Zubatak		4				

4.3 ANALIZA JEDRNIH MARKERJEV

4.3.1 Mikrosateliti

Na mikrosatelitnem lokusu BFRO 002 smo določili 8 različnih alelov (dolžin 116–137 bp), na lokusu Ssa197 20 (116–222 bp), na lokusu Str24 28 (161–237 bp) in na lokusu Str591 13 različnih alelov (148–188). Povprečno število alelov na mikrosatelitni lokus je 17,3.

Specifičnih alelov za posamezne lokacije ni (Priloga C), izjema je lokacije Neretva Jablanica–Metković, od koder imamo vse štiri vzorce zubatka. Za fenotip specifičnih alelov tudi ni (Slika 17), izjema je zubatak z aleli 128 (BFRO 002), 154 (Str591) ter 202 in 222 (Str24). Kosor in večina glavatic so glede na fenotip križanci, zato zanje ni značilnih markerjev. Ob pomanjkanju referenčnih neintrogresiranih populacij smo ostale značilne alele določili po FCA (glej poglavje 1.4.1, Preglednica 9).



Slika 17: Polimorfizmi na posameznih mikrosatelitnih lokusih po posameznih fenotipih. Ploščina kroga označuje frekvenco posameznega alela. 1–glavatica, 2–kosor, 3–mehkoustna postrv, 4–potočna postrv in 5–zubatak. Natančnejši podatki so v Prilogi D.

Figure 17: Microsatellite length polymorphisms, bubble size corresponds with allele frequency. 1–glavatica, 2–kosor, 3–soft mouth trout, 4–brown trout and 5–zubatak. Full data in Appendix D.

4.3.2 LDH in GH2C

Frekvenca za *S. obtusirostris* značilnega alela MP gena LDH se opazno razlikuje med fenotipsko mehkooustno postrvjo (84,8 %) in potočno postrvjo (2,3 %). Kosor, križanec

med mehkoustno in potočno postrvjo, ima tudi visoko frekvenco tega alela, kot tudi zubatak, vendar pa ta dva podatka temeljita na manjšem številu vzorcev (Preglednica 8).

Alel C gena GH2C je značilen za *S. trutta* iz porečja Neretve, alel G pa je značilen za *S. obtusirostris* in vložene primerke *S. trutta* iz drugih porečij. Frekvenca alela G pri fenotipskih mehkoustnih postrveh znaša 89,1 %, pri ostalih fenotipih pa od 22,8–37,5 %.

Preglednica 8: Frekvenca alelov po fenotipih za gena, ki kodirata laktat dehidrogenazo (LDH) in rastni hormon (GH2C).

Table 8: Allele frequencies of lactat dehydrogenase (LDH) and growth hormone (GH2C) genes for different phenotypes.

Lokus	Alel	Glavatice (N=9)	Kosorji (N=12)	Mehkoustne (N=23)	Potočne (N=158)	Zubatak (N=4)
LDH	MP	0,1111	0,3333	0,8478	0,0285	0,2500
	NP	0,8889	0,6667	0,1522	0,9715	0,7500
GH2C	C	0,6667	0,6250	0,1087	0,7722	0,6250
	G	0,3333	0,3750	0,8913	0,2278	0,3750

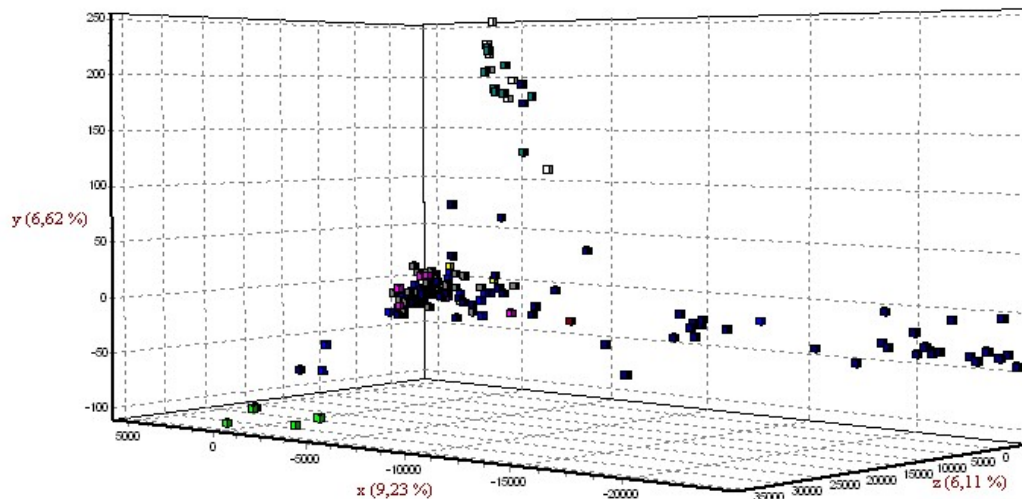
4.3.3 Statistična obdelava podatkov

V analizi s programom GENETIX smo uporabili jedrne markerje, torej mikrosatelite in SNP–je, povprečno število alelov na lokus je 12,2.

4.3.3.1 Faktorielna korespondenčna analiza

Faktorielna korespondenčna analiza vzorce razdeli v tri večje gruče. Gruče se ne ujemajo z lokacijami vzorčenj (Slika 18), zato pa se bolje ujemajo s fenotipi (Slika 19). Mehkoustne postrvi so v eni gruči, potočne postrvi pa v dveh. V manjši od teh dveh gruč potočnih postrvi prevladujejo vzorci iz Bukovice in Ljute, kjer so v preteklih letih vlagali potočne postrvi iz atlantskega povodja, kar smo potrdili tudi na osnovi mtDNA (Preglednica 5).

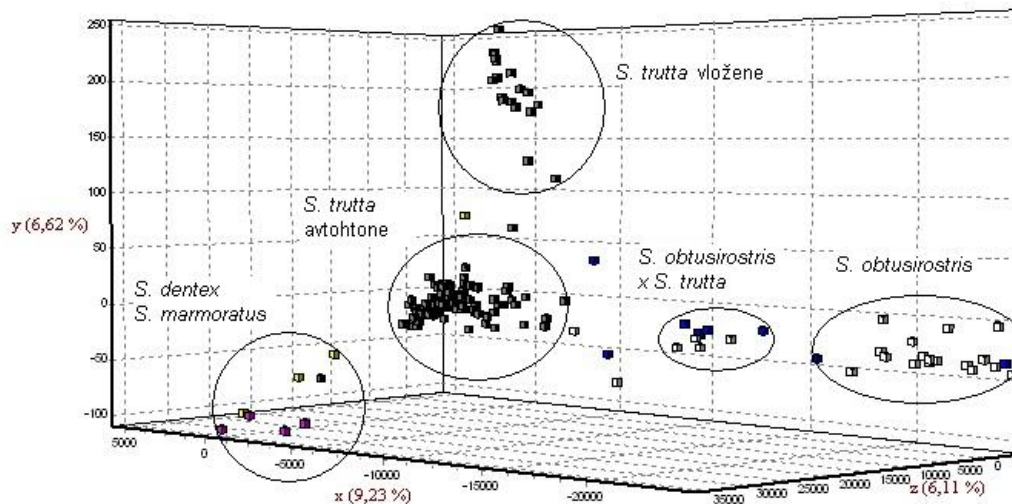
Po FCA lahko določimo vrste, ki so jih raziskovalci opisali v porečju Neretve, ki verjetno ustrezajo posameznim gručam (Slika 19). Vrste *S. marmoratus* in *S. dentex* na osnovi jedrnih markerjev ne moremo razlikovati, ločimo pa vložene in avtohtone linije *S. trutta*. Gručo med *S. obtusirostris* in avtohtono *S. trutta* smo zaradi vmesnih genotipov opredelili kot križance teh vrst, čeprav večina križancev, kot smo jih določili po fenotipu, sodi v gručo avtohtonih *S. trutta*. Dva vzorca neintrogresirane *S. marmoratus* iz Zadlaščice (Slovenija) tvorita povsem svojo gručo po FCA (ni vključeno v Slikah 18 in 19).



Slika 18: Faktorielna korespondenčna analiza po posameznih lokacijah. Od povprečnega genotipa (izhodišče) izstopajo lokacije Bukovica (temno zelene), Ljuta (bele), Neretva Jablanica–Metković (svetlo zelene) in del vzorcev iz Neretve pri Glavatičevem (temno modre). V oklepajih delež skupne variance, ki jo pojasnjuje posamezna koordinatna os (skupaj 21,96 %).

Figure 18: Factorial correspondance analysis of individuals from different sampling locations. Populations from the River Bukovica (dark green), Ljuta (white), Neretva between Jablanica and Metković (light green) and some individuals from the River Neretva at Glavatičevo (dark blue) are far away from average genotype (origin). Percentage of variance explained by axes in parentheses (total 21,96 %).

Ob pomanjkanju referenčnih neintrogresiranih vrst smo najverjetnejše specifične alele za posamezne vrste, opisane v porečju Neretve, določili glede na fenotip in genotip posameznih primerkov (Priloga A) in njihovega položaja po FCA (Slika 16). Alel 116 (BFRO 002) je skupni alel, značilen za *S. trutta* Ad in At linije. Alela NP (LDH) in G (GH2C) sta prav tako skupna za več linij (Preglednica 9). Ostali aleli imajo nizke frekvence ali pa so skupni vsem vrstam, predvsem aleli mikrosatelitnega lokusa Ssa197.



Slika 19: Faktorielna korespondenčna analiza po posameznih fenotipih in z vrstami, ki verjetno ustrezajo posameznem gručam. Od povprečja (izhodišče) izstopajo mehokoustne postrvi (bele), glavatice (rumene), zubatki (rožnate) in nekatere potočne postrvi (sive). V oklepajih delež skupne variance, ki jo pojasnjuje posamezna koordinatna os (skupaj 21,96 %).

Figure 19: Factorial correspondence analysis of individuals with different phenotypes. Soft mouth trout (white), glavatica (yellow), zubatak (pink) and some brown trout (grey) are far away from average genotype (origin). Percentage of variance explained by axes in parentheses (total 21,96 %).

Preglednica 9: Najverjetnejši za vrsto značilni jedrni markerji.

Table 9: Most probable species-specific nuclear markers.

Vrsta	BFRO 002	Str24	Str591	LDH	GH2C
<i>S. obtusirostris</i>	131, 133, 137	171, 175, 177	158, 170	MP	G
<i>S. trutta</i> (Ad linija)	116		176, 186	NP	C
<i>S. trutta</i> (At linija)	116		148, 150, 152	NP	G
<i>S. trutta</i> (Da linija)	120		188	NP	G
<i>S. marmoratus</i> in <i>S. dentex</i>	128	202, 222	154	NP	G

4.3.3.2 Deleži heterozigotnosti, F–statistika in vezava genetskih markerjev

Ravnotežje populacij smo ovrednotili s primerjavo deležev heterozigotnosti in parametra \hat{f} , ki je ocena za parameter F_{IS} . Z izjemo Bukovice je v vseh populacijah presežek heterozigotnosti. V Preglednici 9 so z zvezdicami označene populacije, ki z več kot 95–odstotno verjetnostjo niso v Hardy–Weinbergovem ravnotežju glede na parameter \hat{f} . Taki sta populaciji potočnih postrvi in zubatkov, od lokacij pa so v Hardy–Weinbergovemu ravnotežju le postrvi iz potokov Bukovica in Lađanica z vloženi

potočnimi postrvmi atlantske linije in iz spodnjega dela Neretve med Jablanico in Metkovićem.

Preglednica 10: Primerjava deležev heterozigotnosti (pričakovani, brez vpliva in opazovani) in \hat{f} glede na fenotip in lokacijo. % zaupanja izračunan na osnovi 1000 permutacij, oznake: n.z. – ni statistično značilno, * – značilno 95–99 %, ** – značilno 99,0–99,99 %, *** – značilno >99,99 %. Statistično značilne vrednosti pomenijo, da populacija ni v Hardy–Weinbergovem ravnotežju, v oklepajih so statistično značilne vrednosti populacij z manj kot 10 vzorci.

Table 10: A comparison of \hat{f} , expected, non biased and observed heterozygosity for salmonides from different sampling locations and of different phenotypes. Confidence calculated on the basis of 1000 replications, n.z. – non significant, * – 95–99 % confidence, ** – 99,0–99,99 % confidence, *** – >99,99 % confidence. Statistically significant values mark populations not in Hardy–Weinberg equilibrium, values for populations with less than 10 individuals in parentheses.

	$H_{exp.}$	$H_{n.b.}$	$H_{obs.}$	\hat{f}	st. znač.
Fenotip					
Glavatica	0,5710	0,6046	0,4444	0,2768	(***)
Kosor	0,6256	0,6528	0,6389	0,0222	n.z.
Mehkoustna postrv	0,5462	0,5583	0,5507	0,0139	n.z.
Potočna postrv	0,4856	0,4872	0,3386	0,3056	***
Zubatak	0,2552	0,2917	0,2917	0,0000	(n.z.)
Lokacija					
Bukovica	0,2767	0,2930	0,2963	–0,0119	(n.z.)
Krupac	0,3409	0,3571	0,2727	0,2453	**
Lađanica	0,3933	0,4370	0,4333	0,0095	(n.z.)
Ljuta	0,4000	0,4211	0,3167	0,2581	**
Neretva (Đajići)	0,3333	0,6667	0,6667	–	(–)
Neretva (Glavatičevo)	0,6911	0,6968	0,5109	0,2684	***
Neretva (Jablanica–Metković)	0,2552	0,2917	0,2917	0,0000	(n.z.)
Neretva (Ocrkavlje)	0,3775	0,3806	0,3028	0,2060	***
Rakitnica	0,4642	0,4695	0,3741	0,2050	***

Vrednosti $\hat{\Theta}$, ki je ocena parametra F_{ST} , razkrivajo, da so si populacije glede na jedrne markerje med seboj večinoma različne (Preglednica 11). Pari med seboj podobnih populacij pa praviloma vsebujejo majhno število vzorcev, npr. Neretva Đajići (1 vzorec), Neretva Jablanica–Metković (4 vzorci) in Lađanica (5). Osem vzorcev glavatica je po jedrnih markerjih podobnih kosorjem in potočnim postrvem, vendar so glavatice glede na pigmentacijo večinoma križanci. Od ostalih sta si po jedrnih markerjih podobni populaciji iz Ljute in Bukovice ter iz Krupaca in Lađanice.

Preglednica 11: Vrednosti $\hat{\Theta}$ po fenotipih (nad diagonalo) in % zaupanja (pod diagonalo) glede na lokacijo (zgoraj) in fenotip (spodaj). Izračunano na osnovi 1000 permutacij, oznake: n.z. – ni statistično značilno, * – značilno 95–99 %, ** – značilno 99,0–99,99 %, *** – značilno >99,99 %. Statistično značilne vrednosti pomenijo, da sta si dve populaciji različni glede na jedrne markerje, v oklepajih so statistično značilne vrednosti za pare, v katerih ima ena od populacij manj kot 10 vzorcev. Table 11: $\hat{\Theta}$ values (above the diagonal) and confidence level (below the diagonal) for sampling locations and different phenotypes. Confidence calculated on the basis of 1000 replications, n.z. – non significant, * – 95–99 % confidence, ** – 99,0–99,99 % confidence, *** – >99,99 % confidence. Statistically significant values mark pair of nonidentical populations, values for pairs with at least one population with less than 10 individuals in parentheses.

Lokacija	Bukovica	Krupac	Lađanica	Ljuta	Đajići	Glavatičevo	Jablanica	Ocrkavlje	Rakitnica
Bukovica		0,5191	0,4695	0,0382	0,3996	0,2418	0,6376	0,4822	0,4012
Krupac	(***)		0,0220	0,3533	0,1572	0,1446	0,5472	0,0315	0,0926
Lađanica	(**)	(n.z.)		0,2858	0,0758	0,4695	0,5270	0,0311	0,0960
Ljuta	(n.z.)	***	(*)		0,1057	0,1600	0,5256	0,3492	0,2867
Đajići	(n.z.)	(n.z.)	(n.z.)	(n.z.)		-0,1307	0,5031	0,1317	0,0739
Glavatičevo	(***)	***	(*)	***	(n.z.)		0,2805	0,4822	0,1340
Jablanica	(*)	(*)	(n.z.)	(***)	(n.z.)	(**)		0,5252	0,4250
Ocrkavlje	(***)	*	(n.z.)	***	(n.z.)	***	(***)		0,1161
Rakitnica	(***)	***	(**)	***	(n.z.)	***	(***)	***	
Fenotip	Glavatica	Kosor	Mehkoust	Potočna	Zubatak				
Glavatica		0,0373	0,3202	0,0235	0,2816				
Kosor	(n.z.)		0,1916	0,0978	0,3447				
Mehkoustna	(***)	***		0,4158	0,4430				
Potočna	(n.z.)	***	***		0,4203				
Zubatak	(*)	(*)	(**)	(***)					

Neravnotežje zaradi vezave genetskih markerjev na kromosomih (linkage disequilibrium) smo določali na vseh vzorcih. V analizi s 5000 permutacijami smo preverjali vezanost jedrnih markerjev v vseh možnih parih. V večini kombinacij smo z manj kot 0,01 % tveganja sprejeli hipotezo, da markerji niso vezani. Vrednosti, ki niso bile enake 0 so bile: BFRO 002 – Ssa197 1,04 %, BFRO 002 – Str24 0,02 %, Ssa197 – Str24 0,48 % in Ssa197 – Str591 0,04 %.

5 RAZPRAVA

5.1 TRENUTNO STANJE V POREČJU NERETVE

Naša opažanja in rezultati analiz kažejo, da je v zgornjem delu porečja (nad hidroelektrarno pri Jablanici), kjer smo vzorčili v letih 1999 in 2001, vpliv vlaganj najmanjši. V porečje poteka vlaganje *S. trutta*, *Salvelinus alpinus*, *Thymallus thymallus* in *Oncorhynchus mykiss* (Hamžić, 2002), vendar smo v zgornjem delu zasledili samo vlaganje atlantske in donavske linije *S. trutta*. Prisotnost teh postrvi je opazna na posameznih lokacijah, namreč v Bukovici, Ljuti in Rakitnici. V sami Neretvi (lokacija Glavatičevo), zlasti na težko dostopnih lokacijah (Ocrkavlje in Lađanica), je takih primerkov zamenljivo malo. Prevladujejo potočne postrvi jadranske linije (Slika 2). V spodnjem toku Neretve poteka tudi projekt gojenja teh rib v ribogojnici "NORFISH–Blagaj", zato bo verjetno kmalu prišlo do vlaganja teh rib v druge dele porečja Neretve.

Nedavno so v porečju Neretve vzorčili tudi drugi raziskovalci, ki so prišli do sklepa, da glavatice v zgornjem delu ni več (Delling, 2003), v spodnjem delu pa so samo še posamezni primerki (Hamžić, 2002). Med našimi vzorci smo našli posamezne primerke z opaznim marmoriranim vzorcem, ki je večinoma kombiniran s pigmentacijo, značilno za potočno postrv. Predvidevamo, da je marmorirana postrv v porečju Neretve na robu izumrtja zaradi nedovoljenih metod ribolova, zajezitve rek in hibridizacije z drugimi salmonidi.

V bližini Glavatičevega so raziskovalci (Delling, 2003) našli primerke, ki so jih opisali pod začasnimi imeni *S. cf. montenigrinus* in *S. cf. farioides*. Glede na kriterije, ki smo jih uporabili pri določanju fenotipov, so primerki *S. cf. montenigrinus* (Slika 6) in *S. cf. farioides* (Slika 7) križanci *S. obtusirostris* × *S. trutta*. Uspešno križanje teh dveh vrst je bilo potrjeno v ribogojnici (Kosorić in Vuković, 1968). Križancem domačini pravijo kosorji in so v reki prisotni že vsaj zadnjih 50 let.

5.2 UVRSTITEV SALMONIDOV IZ POREČJA NERETVE V FILOGEOGRAFSKE LINIJE PO BERNATCHEZU

Na osnovi 5' dela kontrolne regije mtDNA salmonidi iz porečja Neretve sodijo v jadransko, donavsko in atlantsko filogeografsko linijo *S. trutta* po Bernatchezu (2001). Odkrili smo nov haplotip, ki glede na primerjavo z drugimi haplotipi sodi v jadransko linijo, zato smo ga poimenovali AdN.

Haplotipov marmoratus linije v porečju nismo našli med 206 analiziranimi vzorci. V reki so prisotne posamezne glavatice (*S. marmoratus*), postrvi z marmoriranim vzorcem. Genetsko čiste populacije *S. marmoratus* iz porečja Soče (Slovenija) imajo haplotipe marmoratus (Ma) linije (Snoj in sod., 2000). Haplotipi Ma so prisotni tudi v rekah, ki se izlivajo v morje severno od Neretve, namreč v Krki (Hrvaška) in v

rekah Acheloos, Moronos in Nestos (Grčija), ki se izlivajo v morje južno od Neretve (Bernatchez in sod., 2001; Apostolidis in sod., 1997). V teh rekah ni marmoriranih postrvi. Zaradi geografske lege med Krko in reko Acheloos dopuščamo možnost, da je marmoratus linija kolonizirala tudi porečje Neretve, vendar so zanjo značilni haplotipi prisotni z nizko frekvenco.

Haplotip Soxy je značilen za *S. obtusirostris* (Snoj in sod., 2000a) in ne sodi v filogenijo po Bernatchezu (2001).

5.3 RAZŠIRJENOST IN IZVOR LINIJ mtDNA

5.3.1 Jadranska linija

V porečju prevladujeta dva haplotipa jadranske linije *S. trutta* (67 % vseh vzorcev). Potočnih postrvi te linije ne vzrejajo v ribogojnicah in jih ne vlagajo v reke, prisotne pa so tudi v bližnjih hrvaških rekah Krki in Zrmanji, ki se izlivata v vzhodno Jadransko morje (Odak, 2004), zato sklepamo, da je jadranska linija *S. trutta* avtohton salmonid porečja Neretve. To je v nasprotju s predhodno raziskavo, ki temelji na samo dveh vzorcih in po kateri v porečju Neretve prevladuje donavska linija (Bernatchez, 2001).

Haplotip AdN je bolj razširjen od dveh haplotipov jadranske linije v porečju (83,3 % vseh haplotipov jadranske linije) in po do zdaj znanih podatkih ni prisoten izven porečja Neretve. Manj pogost je haplotip Ad-s3 (16,7 % haplotipov jadranske linije v porečju Neretve), ki je prisoten tudi v rekah v Grčiji in na Korziki (Bernatchez, 2001). V nukleotidnem zaporedju 5' konca kontrolne regije se haplotipa razlikujeta v štirih nukleotidnih zamenjavah. Običajno lahko različne haplotipe, ki so prisotni na nekem področju, razporedimo v vrstni red tako, da se sosednja haplotipa razlikujeta v enem nukleotidu (Melkič, 2000). Ponujamo dve razlagi za odsotnost vmesnih haplotipov med AdN in Ad-s3 v porečju Neretve:

- haplotipa AdN in Ad-s3 sta v porečje prišla z dvema ločenima naselitvenima valovoma jadranske linije *S. trutta*,
- zaradi naključnega genetskega drsa se vmesne stopnje niso ohranile oziroma so prisotne v porečju v zelo majhnem deležu.

5.3.2 Vnešene linije

Prisotnost haplotipov atlantske (At) in donavske (Da) linije (19,9 % vseh vzorcev) *S. trutta* v porečju je posledica vlaganja. Potočne postrvi atlantske linije smo našli v dveh pritokih Neretve, v Bukovici, kjer so jih vlagali zadnjič leta 2001, in v Ljuti, kjer je ribogojnica, v kateri gojijo postrvi atlantske linije, ki občasno uhajajo v reko. En sam

primerkek z atlantskim haplotipom v Neretvi pri kraju Glavatičevo je verjetno posledica migracije iz teh dveh potokov.

Našli smo 26 primerkov s haplotipi donavske linije, vendar smo jih 19 od teh našli v Rakitnici. Glede na jedrne markerje populacija v Rakitnici ni v Hardy–Weinbergovem ravnotežju, zato predvidevamo, da so v Rakitnico nedavno vlagali potočne postrvi donavske linije, posamezni primerki pa so migrirali po toku navzdol v Neretvo. Ker ni podatkov o vnašanju postrvi v Rakitnico, naselitev iz Neretve pa zaradi slapov ni mogoča, obstaja tudi možnost, da je prišlo do sladkovodne povezave Rakitnice z donavskim porečjem v obdobju po zadnji poledentvi (Durmić, 2004). Za zdaj ni trdnih podatkov o vzpostavitvi take povezave, raziskave o genetskih značilnostih postrvi na drugi strani razvodja še ni bilo.

Zaradi selekcije na razmere v ribogojnicah je stopnja preživetja vloženih rib nizka, zato je vpliv vlaganj na divje populacije majhen. Ob dolgotrajnem vlaganju pride do introgresije genov, pri čemer je vpliv vloženih samcev večji kot vpliv vloženih samic (Hansen in sod., 2000). Delež jedrnih markerjev vloženih potočnih postrvi v primeru križanja z avtohtonimi postrvmi je zato lahko večji od 19,8 %, kolikor znaša delež At in Da mtDNA haplotipov v porečju Neretve.

5.3.3 Haplotip Soxy

Haplotip Soxy je značilen za *S. obtusirostris*, vendar se ta vrsta križa z *S. trutta*, zato je prisoten tudi pri fenotipskih križancih in pri potočnih postrveh. Zaradi introgresije v *S. trutta* delež haplotipa Soxy ni dober marker za oceno deleža *S. obtusirostris* v porečju. Delež mehkoustnih postrvi smo morda podcenili tudi zaradi šibkega agregata, ki smo ga uporabljali pri vzorčenju (1,5 kW). Z močnejšim agregatom bi dosegli globlje vode, ki so naravni habitat teh postrvi.

Našli smo 27 rib s haplotipom Soxy (13,1 %). 17 od 23 primerkov, ki smo jih glede na fenotip označili za mehkoustno postrv, ima ta haplotip. Predvidevamo, da smo zlasti majhnim primerkom pogosto pripisali napačen fenotip. Glede na rezultate FCA imajo vsi vzorci gruče *S. obtusirostris* (18 primerkov) haplotip Soxy, en Soxy se nahaja v gruči *S. obtusirostris* × *S. trutta*, ostalih 8 pa v gruči avtohtonih *S. trutta*.

Zanimivo je, da populacija mehkoustne postrvi iz Žrnovnice in Jadra (Hrvaška) nima mtDNA haplotipa, ki bi bil enak ali podoben haplotipu Soxy. Postrvi teh dveh potokov imajo haplotip, ki sodi v jadransko linijo (Odak, 2004). Populacije mehkoustne postrvi iz Krke (Hrvaška) in Zete (Črna Gora) še niso raziskane. Po do zdaj znanih genetskih in morfoloških posebnostih mehkoustne postrvi iz porečij Neretve, Jadra in Žrnovnice sklepamo, da je to endemična predglacialna vrsta, ki je verjetno kot prvi salmonid naselila področje zahodnega Balkana.

5.4 VRSTE SALMONIDOV V POREČJU NERETVE KOT ESU

Ugotovili smo, da so salmonidi iz porečja Neretve genetsko zelo strukturirani. Groba razdelitev na fenotipe, kot smo jo uporabili pri opisu vzorcev, se pričakovano ne pokriva povsem z rezultati FCA. Če pa rezultate FCA, fenotipe in mtDNA haplotipe združimo, lahko določimo 4 osnovne gruče (Slika 19). Te gruče smo poimenovali z imeni, kot so jih uporabili sistematiki, ki so jih prvi opisali kot vrste. Ker njihovi kriteriji za opisovanje vrst med seboj niso skladni, bomo v nadaljevanju vrste obravnavali v najširšem smislu, torej kot evolucijsko pomembne enote (ESU).

Evolucijski koncept smo uporabili, ker v skladu z biološkim porečje naseljuje samo ena vrsta. Vsi ESU–ji se namreč križajo in imajo plodne potomce. Filogenetski koncept zgolj na osnovi mtDNA pa ni uporaben, ker ne pojasnjujejo dovolj dobro različnih fenotipov, ki smo jih našli v porečju.

Simpatrične vrste med seboj razlikujemo z značilnimi (diagnostičnimi) markerji, pri alopatričnih pa obstaja možnost, da imajo geografsko oddaljene populacije različnih vrst lahko iste značilne markerje (She in sod., 1987). Edini z jezovi in slapovi ločeni populaciji, za kateri obstaja možnost alopatrije, sta populacija zubatkov (lokacija Neretva Jablanica–Metković) in populacija postrvi iz Rakitnice.

Polimorfizma na genih za rastni hormon in laktat dehidrogenazo smo izbrali, da bi lahko ocenili čistost jadranske linije (alel C gena za rastni hormon) in mehkoustne postrvi (alel MP gena za laktat dehidrogenazo). Skupaj z mikrosatelitnimi aleli, ki so specifični za posamezne ESU je očitno, da vzorci, ki se po FCA analizi nahajajo med gručami ali pa so v gruči kosorjev, praviloma niso heterozigoti značilnih alelov drugih gruč. To pomeni, da vsi križanci *S. obtusirostris* × *S. trutta* niso generacija F1 starševskih ESU.

Mitohondrijska zaporedja, s katerimi najlažje definiramo vrste po filogenetskem konceptu, niso bila vključena v PCA. Razloga za to sta dva:

- razlike po spolu v uspešnosti razmnoževanja vložnih postrvi (Hansen in sod., 2000) in
- pretirana poenostavitev genetske raznolikosti (Zhang in Hewitt, 2003), v tem primeru bi bila analiza pristranska, ker bi morali haploidna zaporedja mtDNA obravnavati drugače kot diploidne jedrne markerje v FCA.

5.4.1 *S. obtusirostris*, *S. trutta* in njuni križanci

Kosorji so plodni križanci *S. obtusirostris* in *S. trutta*. Samo s pomočjo mtDNA haplotipov ni možno ugotoviti plodnosti ali neplodnosti križancev. Za mehkoustno postrv

smo določili značilne genetske markerje (Preglednica 8). V primeru, da je F1 generacija križancev *S. obtusirostris* × *S. trutta* neplodna, bi morali biti vsi križanci heterozigotni na lokusih LDH, BFRO 002, str24 in str591. Ker niso, pomeni, da so križanci plodni, saj ne pripadajo samo F1 generaciji.

Težava pri natančnejši študiji križanja je pomanjkanje neintrogresiranih starševskih populacij. V raziskavi nismo našli lokacije, kjer bi bile avtohtone potočne postrvi v Hardy–Weinbergovem ravnotežju, mehkoustna postrv pa živi simpatrično s potočno. Samo populaciji vloženih potočnih postrvi atlantske linije iz Bukovice in Ljute sta bili v Hardy–Weinbergovem ravnotežju.

Opazili smo, da so posamezni aleli, specifični za mehkoustno postrv, prisotni tudi pri potočni postrvi, medtem ko obratnih primerov ni. Tudi posamezni haplotipi Soxy so prisotni pri primerkih, ki so glede na jedrne markerje potočne postrvi, obratnih primerov ni. Glede na razpoložljive vzorce sklepamo, da introgresija poteka iz smeri mehkoustnih postrvi do potočnih postrvi. Haldaneovo pravilo pri ribah bi pomenilo plodne samice in sterilne samce križancev. Ker se tudi mtDNA deduje maternalno, tega s to raziskavo ne moremo dokončno potrditi. Vsekakor pa je večina kosorjev križancev tipa ♂*S. obtusirostris* × ♀*S. trutta*. Kosorić in Vuković (1969) sta kosorje generacije F1 dobila enako uspešno pri obeh kombinacijah staršev. Manj pogoste samice kosorjev tipa ♀*S. obtusirostris* × ♂*S. trutta* se kot kaže zelo uspešno križajo dalje z vrsto *S. trutta*, zato introgresija haplotipa Soxy v potočno postrv.

Po Allendorfu in sod. (2001) ne moremo jasno opredeliti tipa križanja. Verjetno je prisoten selekcijski pritisk, ki ohranja genetsko čistost mehkoustne postrvi (tip 3, naravna hibridna cona), prihaja do introgresije genetskih markerje, značilnih za mehkoustno postrv, v potočno postrv (tip 2, naravna introgresija). Glede na simpatrijo starševskih vrst, ki se je začela še pred poledenitvami (Bianco, 1990), ni verjetno, da grozi zlitje v nov naravni hibridni takson (tip 1).

Glede na fotografije iz morfometrične raziskave (Delling, 2003) sklepamo, da sta *S. cf. montenigrinus* in *S. cf. farioides* kosorja. Glede na lokacije, kjer smo našli kosorje je očitno, da jim ustreza okolje mehkoustnih postrvi, vendar se nahajajo tudi v manjših potokih s hitrejšo vodo, torej v okolju potočnih postrvi.

5.4.2 Vložene postrvi v Rakitnici

V Rakitnici je edina populacija, v kateri je opazno križanje vložene donavske in avtohtone jadranske linije *S. trutta*. Najverjetneje sta za donavsko linijo značilna markerja alela 120 (BFRO 002) in 188 (Str591). Ker nimamo referenčne neintrogresirane populacije donavske linije, ki so jo vlagali v Rakitnico, smo ta dva markerja dobili po primerjavi s populacijo iz Neretve pri Ocrkavljah, kjer nismo opazili vlaganja potočne postrvi

donavske linije. Vpliv teh dveh markerjev ni tako močan, da bi dobili gručo po FCA, ki bi ustrezala donavski liniji. Omenjena alela sta lahko tudi posledica naključnega genetskega drsa v zaprtem okolju, v katerega slap preprečuje migracijo rib iz Neretve. Kljub slapovom smo v Rakitnici našli en alel 133 (BFRO 001), kar je bil edini za mehokoustne postrvi značilen genetski marker v tem potoku.

Delež obeh linij v Rakitnici smo ugotavljali s pomočjo mtDNA in gena GH2C. V Rakitnici je delež donavskega haplotipa Da-s1 42 %, delež alela G na lokusu GH2C pa G 24,4 %. Vpliv mehokoustne postrvi na delež alela G je glede na druge genetske markerje, značilne za mehokoustno postrv zelo majhen. Razliko med frekvenco alela G in frekvenco haplotipa Da-s1 lahko razložimo na dva načina:

- V Rakitnici je bila prisotna postrv jadranske linije z majhnim deležem mehokoustne postrvi. V reko so vlagali postrvi donavske linije, zato ima današnja populacija velik delež haplotipa Da-s1 in velik delež alela G. Vlaganje rib ni bilo dokumentirano.
- V Rakitnici je v nedavni geološki preteklosti po zadnji poledenitvi morda prišlo do sladkovodne povezave z donavskim porečjem. V tem primeru so današnje razlike v deležih alelov gena za rastni hormon in mtDNA haplotipih posledica naključnega genskega drsa.

5.4.3 Posledice vlaganj v porečje Neretve

Vlaganja so omejena na posamezne lokacije, njihova uspešnost pri razmnoževanju izven ribogojnic in stopnja križanja z avtohtonimi postrvmi je nizka. Vložene postrvi smo našli v Bukovici, v Ljuti pa postrvi, ki so verjetno pobegnile ali bile izpuščene iz bližnje ribogojnice. V teh dveh potokih nismo našli križancev vloženi in avtohtonih postrvi. Edino populacijo križancev vložene donavske in avtohtone jadranske linije smo našli v Rakitnici.

5.4.4 *S. marmoratus* in *S. dentex*

Po FCA smo dobili gručo s primerki zubatka in nekaterimi glavaticami. Kljub očitni razliki v obarvanosti pa genetskih razlik med tema dvema fenotipoma nismo našli, zato smo ju po FCA obravnavali skupaj. Skupno je v gruči 8 primerkov, nekateri imajo jedrne markerje, značilne za *S. obtusirostris*, torej so križanci.

Haplotipov Ma in alela 124 (BFRO 002), ki sta značilna za *S. marmoratus*, ki živi v Posočju in v rekah severne Italije, v Neretvi nismo našli. Našli smo en sam alel 124 (BFRO 002), vendar pri vloženi postrvi v Bukovici. Marmorirane postrvi in zubatki iz Neretve imajo haplotip jadranske linije (AdN), ena glavatica pa haplotip Soxy. Možne

razlage za odsotnost mtDNA in jedrnih genetskih markerjev *S. marmoratus*, kot jih poznamo v Posočju in severni Italiji, so:

- *S. marmoratus* je v preteklosti naseljevala tudi Neretvo (tako kot reke severno in južno od nje), vendar je v njej redka ali pa je večina zanjo značilnih markerjev izginila zaradi križanja, ostal pa je marmoriran vzorec.
- *S. marmoratus* je v preteklosti kolonizirala tudi Neretvo, zaradi naključnega genskega toka ima druge značilne markerje kot *S. marmoratus* v Posočju.
- Glavatica iz Neretve ni *S. marmoratus*, ampak je postrv jadranske linije, ki je marmoriran vzorec razvila neodvisno od soške postrvi, na podoben način kot postrvi atlantske linije iz reke Otre na Norveškem (Delling, 2003).

Treba je poudariti, da so bili zubatki ulovljeni na zelo oddaljenih lokacijah glede na vzorce glavatice, večinoma v bližini Mostarja, zato obstaja možnost homoplazije mikrosatelitnih markerjev, zaradi česar so zubatki in glavatice v isti gruči po FCA. Genetska podobnost postrvi v tej gruči se lepo sklada z opisanimi migracijami *S. marmoratus* iz spodnjega v zgornji del Neretve, zato obstaja tudi možnost, da je različna obarvanost posledica različnega okolja v spodnjem in zgornjem delu porečja. Za preučevanje genetskih razlik med zubatkom, glavatico in soško postrvijo, če so to sploh samostojni taksoni, je nujno večje število neintrogresiranih vzorcev.

5.5 OHRANITEV BIOTSKE RAZNOLIKOSTI

Ugotovili smo, da vlaganje postrvi na naravno populacijo *S. trutta* jadranske linije v zgornjem delu porečja (nad Konjicem) nima večjega učinka. Izjema je potok Rakitnica, v kateri je prisotna populacija križancev jadranske in donavske linije. Mehkoustna postrv se lahko križa s potočno postrvijo, vendar se ohranja neintrogresirana populacija. Primerki glavatice in zubatkov so redki in skrižani s potočno in mehkoustno postrvijo.

V skladu s trendom ohranjanja biotske raznovrstnosti in zmanjševanju vnašanja tujih vrst so najenostavnejši in najcenejši predlogi za dolgoročno ohranitev biotske raznolikosti v porečju Neretve naslednji:

- zakonsko priznanje in zaščita avtohtone jadranske linije *S. trutta*,
- popolna prepoved vlaganja postrvi na področja, kjer do sedaj vlaganja ni bilo, torej zaščita genetsko neintrogresiranih potočnih postrvi,
- gojenje in vlaganje avtohtone *S. trutta* v porečje in
- izboljšanje varoval, ki preprečujejo pobeg neavtohtonih postrvi iz ribogojnic.

Mehkoustna postrv in kosorji so še dokaj neraziskani. Pozornosti sta vredni zlasti njuni ekološki vlogi, genetska podobnost z drugimi populacijami mehkoustnih postrvi in sam mehanizem križanja in selekcije križancev. Za slednje je potrebno nadaljevanje poskusa križanja, ki sta ga začela Kosorić in Vuković (1969). Nujno je tudi spremljanje populacije kosorjev skozi daljše časovno obdobje zaradi možnosti vpliva okolja in človeka na njihovo številčnost in morebitne negativne posledice na ohranitev obeh starševskih vrst.

Glede na redkost glavatice in zubatka in na zaježitev reke je položaj kritičen. Glede na stalno upadanje števila glavatic je verjetno edina rešitev izlov čim večjega števila glavatic in zubatkov in njihovo razmnoževanje in gojenje v ribogojnici. Na osnovi malo večjega števila vzorcev je možno nadaljevanje genetskih raziskav in pojasnitev sorodnosti ali identičnosti obeh vrst in njihovo sorodnost s soško postrvjo. Dolgoročna rešitev glavatice in zubatka pa je precej dražja, nujna je obnovitev naravnega okolja in ponovne vzpostavitve poti, ki bi omogočala migracije preko zaježitev med spodnjim in zgornjim delom Neretve.

6 POVZETEK

Porečje Neretve ima zaradi svoje geografske lege med jadranskim, egejskim in črnomo-rskim povodjem in vzpostavljanja sladkovodnih povezav med njimi v geološki preteklosti raznoliko ihtiofavno. Pozornost sistematikov so vzbudili predvsem morfološko različni salmonidi, v Neretvi so našli kar pet vrst, *S. dentex*, *S. farioides*, *S. marmoratus*, *S. cf. montenigrinus*, *S. obtusirostris* in *S. trutta*. V porečje so vlagali tudi druge linije *S. trutta*, ki se od avtohtonih razlikujejo predvsem po pigmentaciji. Križanci med vloženi in avtohtonimi *S. trutta*, kot tudi med drugimi salmonidi, so bili v preteklosti opaženi, vendar večkrat prezrti.

Zaradi nejasnega taksonomskega statusa *S. dentex*, *S. farioides* in *S. cf. montenigrinus*, kot tudi zaradi primerjave neretvanske s soško *S. marmoratus*, smo v raziskavi poskušali določiti genetske razlike med salmonidnimi vrstami v porečju Neretve. Primerke smo tipizirali na štirih mikrosatelitnih lokusih, dveh nekodirajočih delih jedrnih genov in na 5' delu kontrolne regije mtDNA.

Ugotovili smo, da v porečju prevladuje jadranska filogeografska linija potočne postrvi, največji delež ima haplotip z oznako AdN. Vložene in mehokoustne postrvi imajo značilne haplotipe, medtem ko zubatki in glavatice nimajo značilnega haplotipa. Raznolikost mtDNA haplotipov je posledica večkratne kolonizacije porečja v obdobju do konca zadnje poledenitve in vlaganj v preteklem stoletju preko sladkovodnih povezav s sosednjimi porečji.

Jedrne markerje smo vključili v faktorielno korespondenčno analizo (FCA), ki je vzorce grupirala na način, ki pojasni 22 % njihove variance. Rezultate FCA smo primerjali s haplotipi mtDNA in fenotipskimi oznakami posameznih primerkov. Odkrili smo, da se rezultati FCA ujemajo z vloženi in avtohtonimi linijami *S. trutta*, *S. obtusirostris*, križanci *S. obtusirostris* × *S. trutta* in s skupino vzorcev, ki po fenotipu ustrezata *S. marmoratus* in *S. dentex*. Ugotovili smo, da so primerki iz porečja Neretve, začasno poimenovani *S. cf. montenigrinus* in *S. cf. farioides* plodni križanci *S. obtusirostris* × *S. trutta*. Njihov vpliv na simpatrijo starševskih vrst še ni raziskan.

Vlaganje postrvi v zgornjem delu porečja nima večjega vpliva na avtohtono jadransko linijo, izjema je reka Rakitnica. V njej živi mešana populacija donavske in jadranske linije. Ni znano, ali je donavska linija v Rakitnico vložena ali je prišla po sladkovodni povezavi z donavskim porečjem.

Redkost zubatkov *S. dentex* in glavatic *S. marmoratus* ter njihovo križanje z drugimi vrstami otežuje njihovo natančnejšo opredelitev z genetskimi markerji. Glede na FCA obstaja možnost, da so zubatki in glavatice predstavniki iste evolucijsko pomembne enote, ki nima genetskih markerjev, značilnih za *S. marmoratus* iz Posočja in severne

Italije. Priporočamo njihovo zaščito in prenos v ribogojnice dokler se njihov taksonomski status ne pojasni oziroma dokler se ne vzpostavi nazaj njihovo naravno okolje.

7 SUMMARY

The River Neretva drainage is located between the Adriatic, Black sea and Aegean river systems. There were connections between these systems in geological history, resulting in diverse and numerous fish species in the region. Morphologically different salmonides were found in the River Neretva: *S. dentex* (zubatak), *S. farioides*, *S. marmoratus* (glavatica), *S. cf. montenigrinus*, *S. obtusirostris* (soft mouth trout) and *S. trutta* (brown trout). Stocking of *S. trutta* of Danubian and Atlantic lineages has caused in hybridisation of native and stocked brown trout. Hybridisation of other salmonides was also observed, but often ignored.

Taxonomic status of *S. dentex*, *S. farioides* and *S. cf. montenigrinus* is unclear, *S. marmoratus* from the River Soča was not compared with *S. marmoratus* from the River Neretva, yet. In this survey we tried to determine genetic differences between salmonid species in the River Neretva drainage. Sampled fish were genotyped using four microsatellite loci, two noncoding sections of nuclear genes and 5' end of control region of mtDNA.

Adriatic phylogeographic lineage of brown trout dominates the drainage, especially AdN haplotype. Stocked and soft mouth trout have characteristic haplotypes, while zubatak and glavatica don't. The diversity of mtDNA haplotypes is a result of repeated colonisation of the drainage in the last period of glaciations and of stocking in the recent history.

Nuclear markers were included in factorial correspondence analysis (FCA) that clustered individuals and explained 22 % of their total variance. FCA results were compared with mtDNA haplotypes and phenotypes. Clusters obtained with FCA match stocked and native *S. trutta*, *S. obtusirostris*, *S. obtusirostris* × *S. trutta* hybrids and a small number of *S. marmoratus* and *S. dentex*. The last two cannot be distinguished one from another using molecular markers. Individuals temporarily named *S. cf. montenigrinus* and *S. cf. farioides* were identified as fertile *S. obtusirostris* × *S. trutta* hybrids. The apparent sympatry of parental taxa is not fully explained.

Stocking of brown trout does not significantly influence the native brown trout in the upper part of the River Neretva drainage. The River Rakitnica is an exception and is inhabited by mixed population of the Danubian and Adriatic lineages of brown trout. It is not clear whether this is the consequence of stocking or freshwater connection with the River Danube drainage.

S. dentex and *S. marmoratus* can be found in the River Neretva only in small numbers. Their scarcity and hybridisation with other taxa make it almost impossible to characterise the two species with genetic markers. There is a possibility that *S. dentex* and

S. marmoratus are one unique evolutionary significant unit that does not share genetic markers with *S. marmoratus* from the River Soča drainage. We recommend protection of *S. dentex* and *S. marmoratus* in the River Neretva and their transfer into hatcheries until their taxonomic status is clarified and their natural habitat restored.

8 VIRI

- Allendorf F.W., Leary R.F., Spruell P., Wenburg J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 11: 613–622
- Allendorf F.W., Thorgaard G.H. 1984. Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. V: *Evolutionary genetics of fishes*. Turner B.J. (ed.). New York, Plenum Press: 1–53
- Angers B., Bernatchez L. 1997. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 3: 230–238
- Angers B., Gharbi K., Estoup A. 2002. Evidence of gene conversion events between paralogous sequences produced by tetraploidization in Salmonidae fish. *Journal of Molecular Evolution*, 54: 501–510
- Apostolidis A.P., Triantaphyllidis C., Kouvatsi A., Economidis P.S. 1997. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology*, 6: 531–542
- Avice J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press: 447 str.
- Banarescu P. 1973. Origin and affinities of the freshwater fish fauna of Europe. *Ichthyologia*, 5, 1: 1–8
- Baroiller J.-F., Guiguen Y., Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 910–931
- Behnke R.J. 1968. Süßwasserfische der Türkei. 6. Teil. A new subgenus and species of trout, *Salmo (Paltysalmo) platycephalus*, from southcentral Turkey, with comments on the classification of the subfamily Salmoninae. *Mitteilungen des Hamburgischen Zoologischen Museumsinstitutes*, 66: 1–15
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. 2002. GENETIX: version 4.04: logiciel sous Windows TM pour la genetique des populations. Montpellier, Universite de Montpellier II, Laboratoire Genome, Populations, Interactions.
- Bernatchez L., Guyomard R., Bonhomme F. 1992. DNA variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1: 161–173

- Bernatchez L., Danzmann R.G. 1993. Congruence in control–region sequence and restriction–site variation in mitochondrial DNA of brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Molecular biology and Evolution*, 10: 1002–1014
- Bernatchez L., Osinov A. 1995. Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most eastern native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Molecular Ecology*, 4: 285–297
- Bernatchez L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55, 2: 351–379
- Berrebi P., Povž M., Jesenšek D., Cattaneo–Berrebi G., Crivelli A.J. 2000. The genetic diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soca river, Slovenia. *Heredity*, 85: 277–287
- Bianco P.G. 1990. Potential role of the palaeohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Euro–Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 1, 2: 167–184
- Bibber–Klemm S. 1995. Legal aspects of the conservation of endemic freshwater fish in the northern Mediterranean region. *Biological Conservation*, 72, 2: 321–334
- Bojčić C., Debeljak L., Vuković T., Jovanović–Kršljanin B., Apostolski K., Ržaničanin B., Turk M., Volk S., Drecun Đ., Habeković D., Hristić Đ., Fijan N., Pažur K., Bunjevac I., Marošević Đ. 1982. Slatkovodno ribarstvo. Zagreb, Poslovna zajednica slatkovodnog ribarstva Jugoslavije, Ribozajednica, Jugoslavenska medicinska naklada: 605 str.
- Boecklen W.J., Howard D.J. 1997. Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology*, 78, 8: 2611–2616
- Clarke B., Johnson M.S., Murray J. 1998. How 'molecular leakage' can mislead us about island speciation. V: *Evolution on islands*. Grant P.R. (ed.). New York, Oxford University Press: 181–195
- Consuegra S., Garcia de Leaniz C., Serdio A., Gonzales Morales M., Straus L.G., Knox D., Verspoor E. 2002. Mitochondrial DNA variation in pleistocene and modern atlantic salmon from the iberian glacial refugium. *Molecular Ecology*, 11: 2037–2048
- Cracraft J., 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. V: *Speciation and its consequences*. Otte D., Endler J.A. (eds.). Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates: 28–59

- Crivelli A.J. 1995. Are fish introductions a threat to endemic freshwater fishes in the northern Mediterranean region? *Biological Conservation*, 72, 2: 311–320
- Crivelli A.J., Maitland P.S. 1995. Future prospects for the freshwater fish fauna of the north Mediterranean region. *Biological Conservation*, 72, 2: 335–337
- Danzmann R.G., Ihssen P.E. 1995. A phylogeographic survey of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) in Algonquin Park, Ontario based upon mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 4, 6: 681–697
- Delling B. 2002. Morphological distinction of the marble trout, *Salmo marmoratus*, in comparison to marbled *Salmo trutta* from river Otra, Norway. *Cybiurn*, 26, 4: 283–300
- Delling B. 2003. Species diversity and phylogeny of *Salmo* with emphasis on southern trouts (Teleostei, Salmonidae). Doctoral dissertation. Stockholm, Department of zoology, Stockholm University: 142 str.
- DeMarais B.D., Dowling T.E., Douglas M.E., Minckley W.L., Marsh P.C. 1992. Origin of *Gila seminuda* (Teleostei: Cyprinidae) through introgressive hybridization: implications for evolution and conservation. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 89: 2747–2751
- Durmić A. 2004. Populacija potočne postrvi v Rakitnici je posledica sladkovodne povezave med jadranskim in črnomořkim povodjem. Sarajevo, Univerzitet u Sarajevu, Prirodno–matematički fakultet Sarajevo. adurmic@yahoo.com (osebni vir, feb. 2004)
- Eanes W.F. 1999. Analysis of selection on enzyme polymorphisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30: 301–326
- Enciklopedija Leksikografskog zavoda. Zv. 4. 1968. 2. izdaja. Zagreb, Jugoslavenski leksikografski zavod: 506–506 .
- Ferguson A. 1994. Molecular genetics in fisheries: current and future perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 379–383
- Fernando P., Evans B.J., Morales J.C., Melnick D.J. 2001. Electrophoresis artefacts—a previously inrecognised cause of error in microsatellite analysis. *Molecular Ecology Notes*, 1: 325–328
- Fraser D.J., Bernatchez L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10: 274–2752

- Fumagalli L., Snoj A., Jesenšek D., Balloux F., Jug T., Duron O., Brossier F., Crivelli A.J. 2002. Extreme genetic differentiation among the remnant populations of marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Molecular Ecology*, 11, 12: 2711–2716
- García-Marín J.-L., Utter F.M., Pla C. 1999. Postglacial colonization of brown trout in Europe based on distribution of allozyme variants. *Heredity*, 82: 46–56
- GenBank. 2004. Maryland, Bethesda, NCBI.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html> (30. apr. 2004)
- Giuffra E., Bernatchez L., Guyomard R. 1994. Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology*, 3: 161–171
- Giuffra E., Guyomard R., Forneris G. 1996. Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Molecular Ecology*, 5: 207–220
- Goldstein D.B., Schlötterer C. 1999. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford, Oxford University Press: 352 str.
- Gridelli E. 1936. I pesci d'acqua dolce della Venezia Giulia. *Bollettino della Società Adriatica di Scienze Naturali in Trieste*, 35: 7–140
- Guinand B. 1996. Use of a multivariate model using allele frequency distributions to analyse patterns of genetic differentiation among populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 58, 2: 173–195
- Hadžišće S. 1960. Zur Kenntnis der Gattung *Salmothymus* Berg. *Publikacija Zavoda za ribarstvo na NRM – Skopje*, 3: 39–50
- Hamzić A. 2002. Protection of endangered salmonid species in B&H. V: Report of the symposium on inland fisheries and the aquatic environment. The effects of fisheries management on freshwater ecosystems. Windermere, Velika Britanija, 12–15 June 2002. Rim, Food and Agricultural Organization of the United Nations: 53–53
- Hansen M.M., Ruzzante D.E., Nielsen E.E., Mensberg K.-L.D. 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology*, 9: 583–594
- Härdle W., Simar L. 2003. *Applied multivariate statistical analysis*. Berlin, New York, Springer: 486 str.

- Heckel J. 1852. Fortsetzung des im Julihefte 1851 enthaltenen Berichtes über eine, auf Kosten der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften unternommene, ichtyologische Reise. Sitzungsberichte der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Classe der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, 8, I–V: 347–390
- ITIS, Integrated taxonomic information system. 2004. Washington D.C., Smithsonian Institution.
www.itis.usda.gov (30. apr. 2004)
- Jarne P., Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology & Evolution, 11: 424–429
- Jerman I., Štern A. 1999. Molekulska evolucija. Ljubljana, ŠOU, Študentska založba: 77–78
- de Jong G., de Ruiter J.R., Haring R. 1994. Genetic structure of a population with social structure and migration. V: Conservation genetics. Loeschke V., Tomiuk J., Jain S.K. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 147–163
- Jug T. 2002. Genetska raznolikost soške postrvi (*Salmo marmoratus*) v Sloveniji. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 93 str.
- Karaman S. 1926. Salmonidi Balkana. Glasnik Skopskog naučnog društva, 2: 253–268
- Karaman S. 1933. Prilozi ihtiologiji Crne Gore. Ribarski list, 8: 104–106
- Karaman S. 1937. 11. Beitrag zur Kenntnis der Süßwasserfische Jugoslaviens. Glasnik Skopskog naučnog društva, 6: 131–139
- Kosorić Đ., Vuković T. 1969. Ispitivanja mogućnosti hibridizacije salmonidnih vrsta sliva Neretva. Ichthyologia, 1, 1: 57–67
- Kosorić Đ., Kapetanović N., Guzina N., Mikavica D. 1983. Sastav naselja riba rijeke Neretve u Bosni i Hercegovini. Godišnjak Biološkog instituta Univerziteta Sarajevo, 36: 117–128
- Kottelat M. 1997. European freshwater fishes. Biologia, 52, 5: 1–271
- Kruglyak L., Nickerson D.A. 2001. Variation is the spice of life. Nature Genetics, 27: 234–236
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics, 17, 12: 1244–1245

- Laikre L., Antunes A., Apostolidis A., Berrebi P., Duguid A., Ferguson A., Garcia-Marin J.L., Guyomard R., Hansen M.M., Hindar K., Koljonen M.-L., Largiader C., Martinez P., Nielsen E. E., Palm S., Ruzzante D. E., Ryman N., Triantaphylidis C. 1999. Conservation genetic management of brown trout (*Salmo trutta*) in Europe. Report from the concerted action on identification, management and exploitation of genetic resources in brown trout (*Salmo trutta*), "TROUTCONCERT", EU-FAIR CT97 3882. Silkeborg, Danmarks fiskeriundersøgelser: 91 str.
- Ludwig A., Jenneckens I. 2000. A PCR test for mitochondrial heteroplasmy in sturgeon. *Animal Genetics*, 31, 2: 153–154
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia University Press: 512 str.
- Nelson J.S. 1994. *Fishes of the world*. 3rd ed. New York, John Wiley & Sons: 600 str.
- Mayden R.L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. V: *The units of biodiversity – species in practice*. Claridge M.F., Dawah H.A., Wilson M.R. (eds.). London, Chapman & Hall: 381–424
- Mayr E. 2000. The biological species concept. V: *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*. Wheeler Q.D., Meier R. (eds.). New York, Columbia University Press: 30–43
- Melkič E. 2000. Variabilnost nukleotidnih zaporedij dela kontrolne regije mitohondrije DNA pri postrveh *Salmo trutta*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 68 str.
- McMeel O.M., Hoey E.M., Ferguson A. 2001. Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1*90 and *100 alleles. *Molecular Ecology*, 10: 29–34
- Minckley W.L. 1995. Translocation as a tool for conserving imperiled fishes: experiences in western United States. *Biological Conservation*, 72, 2: 297–310
- Moore W.S., Price J.T. 1993. Nature of selection in the northern flicker hybrid zone and its implications for speciation theory. V: *Hybrid zones and the evolutionary process*. Harrison R.G. (ed.). New York, Oxford University Press: 196–225
- Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. 1987. Variable number of tandem

- repeat (VNTR) markers for human gene mapping science. *Science*, 235: 1616–1622
- Nilsson J., Gross R., Asplund T., Dove O., Jansson H., Kelloniemi J., Kohlmann K., Löytynoja A., Nielsen E.E., Paaver T., Primmer C.R., Titov S., Vasemägi A., Veselov A., Öst T., Lumme J. 2001. Matrilinear phylogeography of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Europe and postglacial colonization of Baltic sea area. *Molecular Ecology*, 10: 89–102
- Oakley T.H., Phillips R.B. 1999. Phylogeny of Salmonine fishes based on growth hormone introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) Salmon are not sister taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11: 381–393
- O'Brien S.J., Mayr E. 1999. Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies. *Science*, 251: 1187–1188
- Odak T. 2004. Molekularno–biološka obilježja endemske mekousne pastrve (*Salmothymus obtusirostris salonitana*). Magistrsko delo. Zagreb, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu: 147 str.
- O'Reilly P.T., Hamilton L.C., McConnell S.K., Wright J.M. 1996. Rapid analysis of genetic variations in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 2292–2298
- Page R.D.M., Holmes E.C. 1998. *Molecular evolution, a phylogenetic approach*. Oxford, Blackwell Science: 346 str.
- Patarnello T., Bargelloni L., Caldara F., Colombo L. 1994. Cytochrome *b* and 16S rRNA sequence variation in the *Salmo trutta* (Salmonidae, Teleostei) species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3, 1: 69–74
- Philippart J.C. 1995. Is captive breeding an effective solution for the preservation of endemic species? *Biological Conservation*, 72, 2: 281–296
- Phillips R.B., Oakley T.H. 1997. Phylogenetic relationships among the *Salmoninae* based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. V: *Molecular systematics of fishes*. Kochner T.D., Stepien C.A. (eds.). San Diego, Academic Press: 145–162
- Phillips R.B., Matsuoka M.P., Konon I., Reed K.M. 2000. Phylogenetic analysis of mitochondrial and nuclear sequences supports inclusion of *Acantholingua ohridana* in the genus *Salmo*. *Copeia*, 2: 546–550

- Poteaux C. 1995. Interactions genetiques entre formes sauvages et formes domestiques chez la truite commune (*Salmo trutta fario* L.). Doktorsko delo. Montpellier, University Montpellier II: 110 str.
- Povž M., Sket B. 1990. Naše sladkovodne ribe. Ljubljana, Mladinska knjiga: 369 str.
- Povž M., Jesenšek D., Berrebi P., Crivelli A.J. 1996. The marble trout, *Salmo trutta marmoratus*, Cuvier 1817 in the Soča river basin, Slovenia. Arles, Tour du Valat: 65 str.
- Raufaste N., Bonhomme F. 2000. Properties of bias and variance of two multiallelic estimators of F_{ST} . *Theoretical Population Biology*, 57, 3:285–296
- Rymer J.M., Williams M.J., Braun M.J. 1994. Mitochondrial analysis of gene flow between New Zealand mallards (*Anas platyrhynchos*) and grey ducks (*A. superciliosa*). *The Auk*, 111, 4: 970–978
- Sætre G.-P., Borge T., Lindell J., Moum T., Primmer C.R., Sheldon, B.C., Haavie, J., Johnsen, A., Ellegren, H. 2001. Speciation, introgressive hybridization and nonlinear rate of molecular evolution in flycatchers. *Molecular Evolution*, 10: 737–749
- She X.J., Autem M., Kotulas G., Pasteur N., Bonhomme F. 1987. Multivariate analysis of genetic exchanges between *Solea aegyptiaca* and *Solea senegalensis* (Teleosts, Soleidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 32: 357–371
- Simpson G.G. 1961. Principles of animal taxonomy. New York, Columbia University Press: 247 str.
- Sokal R.R., Crovello J. 1970. The biological species concept: a critical evaluation. *American Naturalist*, 104: 127–153
- Snoj A., Jug T., Melkič E., Sušnik S., Pohar J., Dovč P., Jesenšek D., Budihna N. 2000. Mitochondrial and microsatellite DNA analysis of marble trout in Slovenia. *Quaderni ETP*, 29: 5–11
- Snoj A., Melkič E., Sušnik S., Muhamedagić S., Dovč P. 2002a. DNA phylogeny supports revised classification of *Salmothymus obtusirostris*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 77: 399–411
- Snoj A., Marčeta B., Sušnik S., Melkič E., Meglič V., Dovč P. 2002b. The taxonomic status of the 'sea trout' from the north Adriatic Sea, as revealed by mitochondrial and nuclear DNA analysis. *Journal of Biogeography*, 29: 1179–1185

- Sušnik S., Snoj A., Pohar J., Dovč P. 1997. The microsatellite marker (BFRO 002) characteristic for different geographically remote brown trout, *Salmo trutta* L., populations. *Animal Genetics*, 28, 5: 372
- Sušnik S., Snoj A., Dovč P. 2001. Evolutionary distinctness of grayling (*Thymallus thymallus*) inhabiting the Adriatic river system, as based on mtDNA variation. *Biological Journal of Linnean Society*, 74: 375–385
- Sušnik S., Schöffman J., Snoj A. 2004. Phylogenetic position of *Salmo* (*Platysalmo*) *platisalmo* Behnke 1968 from south–central Turkey, evidenced by genetic data. *Journal of Fish Biology*, 64: 947–960
- Šorić V. 1990. Salmonids in the Ohrid–Drim–Skadar system. *Acta Societatis Zoologicae Bohemoslovacae*, 54: 305–319
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 24: 4876–4882
- Weir B.S. 1979. Inferences about linkage disequilibrium. *Biometrics*, 35: 235–254
- Weir B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F –statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 6: 1358–1370
- Wiley E.O. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology*, 27: 17–26
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323–354
- Zhang D.–X., Hewitt G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563–584

9 ZAHVALA

Zahvala gre mojemu delovnemu mentorju dr. Alešu Snoju in drugim članom komisije, ki se niso ustrašili, da bi jih okužil v zadnjih tednih. Vsem, ki so sodelovali pri nabiranju postrvi v porečju Neretve, dr. Alainu Crivelliju in dr. Ivanu Bogutu za dragocene koščke repnih plavuti zobatkov. Simoni za dodaten pregled magisterija.

Vrlim knjižničarkam na Oddelku za Zootehniko za hitro dostavljanje člankov in knjig, Petri iz Knjižnice Domžale za Harryja Potterja (dostava na dom).

Prebivalcem naših laboratorijev v naključnem vrstnem redu: Tamari v.d. šefici, Brigiti, Poloni, Tomažu, Tini F., Tini L., Vidi, Tanji, Enotu, Heleni, Matjažu, Dušanu B., Dušanu T. in Ireni. Rozinam in drugim mikrobiologom s konca hodnika za moralno podporo, odbojko in bowling.

Jani, ki je v kritičnih trenutkih držala primerno varnostno razdaljo, 320 milj.

Še nekaj literature, ki je nisem vključil v sam magisterij, je bila pa verjetno najbolj prelistana:

Bartol T., Bradač J., Hočevar I., Koler-Povh T., Siard N., Stopar K. 2001. Navodila za oblikovanje pisnih diplomskih in podiplomskih izdelkov na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 23 str.

M.H. 2003. Kviz o ženskah: kaj poveča vašo očarljivost? Men's Health, december: 128–128

Razpet M. 1991. Sedi in piši z L^AT_EX–om! Ljubljana, Društvo matematikov, fizikov in astronomov Slovenije, Zavod Republike Slovenije za šolstvo: 60 str.

Jug T. 2001. Genetix za telebane. Montpellier, Delovni zapiski iz Francije: 35 str.

Mislím, da je čas za hribe.

Priloga A: Opis vzorcev iz porečja Neretve in Zadlaščice. Dodatne kratice: pot (potočna postrv), zub (zubatak), meh (mehkoustna postrv), gla (glavatica), sek (določitev nukleotidnega zaporedja), res (RFLP).

Lokacija	Oznaka		mtDNA		BFRO002	Ssa197	Str24	Str591	GH2C	LDH
Bukovica	N2	pot	At-s1	sek	116116	136140	161177	148148	G	NP
	N3	pot	At-s1	sek	116116	140154	161184	148148	G	NP
	N4	pot	At-s1	res	116116	132140	161161	148148	G	NP
	N5	pot	At-s1	res	116116	132140	175184	148148	G	NP
	N6	pot	At-s1	res	116116	132140	161184	148148	G	NP
	N7	pot	At-s1	res	116116	132140	161177	148148	G	NP
	N8	pot	At-s1	res	116116	140140	161161	148148	G	NP
	N9	pot	At-s1	res	116116	140154	184184	148148	G	NP
	N10	pot	Da-s2	res	120124	132149	175194	148152	G	NP
	Neretva (Jablanica– Metković)	Dx1	zub	AdN	sek	120128	222222	186186	154154	G
Dx2		zub	AdN	sek	120128	202222	186186	154154	G/C	MP/NP
Dx3		zub	AdN	sek	120128	222222	186186	154154	C	NP
Dx5		zub	AdN	sek	120120	222222	186186	154154	C	NP
Đajići	MP11	meh	AdN	sek	116116	175222	175202	158176	G/C	NP
Neretva (Glavatičevo)	1/1	pot	AdN	res	116116	128215	171223	176186	G/C	NP
	1/2	pot	AdN	res	116120	144144	210219	176176	G/C	NP
	1/3	pot	Ad-s3	sek	116131	128140	210221	176186	G/C	NP
	1/4	pot	AdN	res	116122	128144	208229	176176	C	NP
	G1	gla	AdN	sek	116116	128132	221221	148176	G/C	NP
	G2	gla	AdN	sek	116116	128149	190221	176176	C	NP
	G3	gla	AdN	sek	116116	154175	175225	154170	G	MP
	G4	gla	AdN	sek	116128	149222	186213	154154	G/C	NP
	G5	gla	AdN	sek	116116	128144	206210	176180	C	NP
	G6	gla	Soxy	sek	116116	128211	217217	176186	C	NP
	G7	gla	Ad-s3	sek	116116	128144	213223	176176	C	NP
	GK	gla	AdN	res	120128	206222	186186	154154	G	NP
	MK1	kosor	Soxy	sek	116133	128179	186186	170176	G/C	MP/NP
	MK2	kosor	AdN	sek	131133	163179	175225	158170	G/C	MP/NP
	MK3	kosor	AdN	sek	116133	175215	175225	170176	G/C	MP/NP
	MK4	kosor	Ad-s3	sek	116131	128171	175217	170176	G/C	MP/NP
	MK5	kosor	Soxy	sek	131131	171175	175202	172172	G	MP
	MP1	meh	Soxy	sek	133133	171175	175206	170170	G	MP
	MP2	meh	Soxy	sek	131131	175175	171175	158170	G	MP
	MP3	meh	Soxy	sek	131131	154154	171175	170170	G	MP
	MP4	meh	Soxy	sek	133133	175179	175204	170170	G	MP
	MP5	meh	Soxy	sek	131133	144179	171175	158170	G	MP
	MP6	meh	Soxy	sek	133133	175179	171186	170176	G	MP
	MP7	meh	Soxy	sek	131133	128144	175175	158170	G	MP
	MP8	meh	Soxy	sek	133137	159175	175196	170172	G	MP
	MP9	meh	Soxy	sek	133137	175179	171175	158170	G	MP
	MP10	meh	AdN	sek	116133	128179	171188	170176	G/C	MP/NP
	MP12	meh	Soxy	sek	131133	175183	175177	158176	G	MP
	MP13	meh	Soxy	sek	131133	179183	171177	170170	G	MP
	MP14	meh	Soxy	sek	133137	144144	175175	158172	G	MP
	MP15	meh	Soxy	sek	133133	144179	175179	170170	G	MP
MP16	meh	Soxy	sek	131131	179183	171175	170170	G	MP	
MP17	meh	Soxy	sek	131131	171171	175177	170170	G	MP	
MP18	meh	AdN	sek	116131	128179	171186	170176	G/C	MP/NP	
MP19	meh	AdN	sek	133137	144175	206221	158186	G/C	MP/NP	

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A

Lokacija	Oznaka	mtDNA	BFRO002	Ssa197	Str24	Str591	GH2C	LDH		
Neretva (Glavatičevo)	MP20	meh	AdN	res	120133	179222	175186	154158	G	MP/NP
	MP21	meh	AdN	sek	116131	175179	175217	158176	G/C	MP/NP
	N1	kosor	Da-s1	res	116116	211215	225225	176176	C	NP
	N11	kosor	AdN	res	116116	144179	175175	170176	G/C	MP/NP
	N12A	pot	At-s1	res	116116	132144	177177	148148	G	NP
	N12B	pot	Ad-s3	sek	116116	144144	215217	176186	C	MP/NP
	N13	meh	Soxy	res	131133	144179	171175	170170	G	MP
	N14	kosor	Soxy	res	116116	140179	175175	150176	G/C	NP
	N15	pot	Ad-s3	sek	116116	149183	210213	148176	C	NP
	N16	kosor	AdN	res	116116	144144	217221	176180	C	NP
	N17	pot	AdN	res	116116	149149	219223	176176	G/C	NP
	N18	pot	AdN	res	116116	128215	217221	176176	C	NP
	N19	pot	Da-s2	res	116116	140159	177223	148176	C	MP/NP
	N20	kosor	AdN	res	116120	144211	186217	176176	C	NP
	NP1	pot	AdN	sek	116116	128128	196223	176176	C	NP
	NP2	pot	AdN	sek	116116	128128	186223	176186	C	NP
	NP3	pot	AdN	sek	116137	128128	186225	176176	C	NP
	NP4	pot	AdN	sek	116116	128149	210219	170176	G	MP/NP
	NP5	pot	AdN	sek	116120	128128	229229	176186	C	NP
	NP6	pot	AdN	sek	116116	128179	217219	176176	C	NP
NP7	pot	AdN	sek	116116	144175	202221	170176	C	NP	
NP8	pot	AdN	sek	116116	128149	190225	176188	C	MP/NP	
NP9	pot	AdN	sek	116116	128144	217221	176176	C	NP	
NP10	pot	AdN	sek	131131	128128	223225	186186	C	NP	
NP11	pot	AdN	sek	116116	128175	206210	176176	G/C	NP	
NP12	pot	Da-s2	sek	116116	132140	177177	148148	G	NP	
Krupac	KP1	pot	Ad-s3	sek	116116	128140	221221	154176	C	NP
	KP2	pot	Da-s2	sek	116116	211211	186217	176176	C	NP
	KP3	pot	AdN	sek	116116	128140	219219	176186	C	NP
	KP4	pot	AdN	sek	116116	144144	210219	176176	C	NP
	KP5	pot	AdN	sek	116116	128128	219221	176176	C	NP
	KP6	pot	AdN	sek	116116	140149	188221	176180	C	NP
	KP7	pot	AdN	sek	116133	128149	179223	166176	C	NP
	KP8	pot	Soxy	sek	116116	149149	217225	176176	C	NP
	KP9	pot	Soxy	sek	116120	128128	217217	176176	C	NP
	KP10	pot	Ad-s3	sek	116116	128144	219219	176176	C	NP
	KP11	pot	Soxy	sek	116116	128128	206225	176176	C	NP
Lađanica	2/1	pot	AdN	res	116116	136215	221221	176176	C	NP
	2/2	pot	AdN	res	116116	140154	171202	176176	C	NP
	2/3	pot	AdN	res	116116	128149	210217	176180	C	MP/NP
	2/4	pot	AdN	res	116116	128215	210217	176180	C	NP
	2/5	pot	Soxy	res	116116	140215	217217	176186	G/C	NP
Ljuta	5/1	pot	At-s1	sek	116116	132132	161161	148148	G	NP
	5/2	pot	Da-s2	sek	116116	132132	161161	148148	G	NP
	5/3	pot	Ad-s3	sek	116116	140149	190223	176176	C	NP
	5/4	pot	At-s1	sek	116116	128132	161184	148148	G	NP
	5/5	pot	At-s1	res	116116	116140	161184	148148	G	NP
	5/6	pot	Da-s2	res	116116	136149	175177	148150	G	NP
	5/7	pot	At-s1	res	116116	132140	184184	148148	G	NP
	5/8	pot	At-s1	res	116116	132149	177184	148150	G	NP
	5/9	pot	At-s1	res	116116	132136	161177	148150	G	NP
	N26	kosor	AdN	res	116116	128144	221225	176186	C	NP
Neretva (Ocrkavlje)	3/1	pot	Ad-s3	sek	116116	128128	194221	176176	C	NP
	3/2	pot	Ad-s3	sek	116116	144149	221221	176176	C	NP
	3/3	pot	Ad-s3	res	116120	149149	221221	176176	C	NP
	3/4	pot	AdN	res	116116	149154	217217	176176	G/C	NP

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A

Lokacija	Oznaka	mtDNA	BFRO002	Ssa197	Str24	Str591	GH2C	LDH	
Neretva (Ocrkavlje)	3/5	pot	AdN res	116116	128149	221221	176176	C	NP
	3/6	pot	Ad-s3 sek	116116	149183	217225	176186	C	NP
	3/7	pot	Ad-s3 sek	116116	149149	217225	176176	C	NP
	3/8	pot	Ad-s3 sek	116116	149154	217217	176176	C	NP
	3/9	pot	AdN res	116116	149149	217217	176176	C	NP
	3/10	pot	AdN res	116116	144144	215215	176176	C	NP
	3/11	pot	AdN res	116116	144144	217217	176186	C	NP
	3/12	pot	AdN res	116116	149149	217217	176176	C	NP
	3/13	pot	AdN res	116116	149149	213221	176186	C	NP
	3/14	pot	AdN res	116116	149154	194221	176176	C	NP
	3/15	pot	Ad-s3 sek	116116	128154	225225	176176	C	NP
	3/16	pot	AdN res	116116	144144	221225	176176	C	NP
	3/17	pot	AdN res	116116	149154	194194	176176	G/C	NP
	3/18	pot	AdN res	116116	149149	217225	176176	C	NP
	3/19	pot	Ad-s3 sek	116116	128211	217225	176176	C	NP
	3/20	pot	AdN res	120133	128163	194225	176176	C	NP
	3/21	pot	Ad-s3 sek	116116	149154	217225	176176	C	NP
	3/22	pot	AdN res	116116	140149	210217	176186	C	NP
	3/23	pot	AdN res	116116	128149	215217	176176	C	NP
	3/24	pot	AdN res	116128	128149	217217	176176	C	NP
	3/25	pot	Ad-s3 sek	116116	144149	215217	176186	C	NP
	3/26	pot	AdN res	116116	136163	215215	176176	C	MP/NP
	3/27	pot	AdN res	116116	149154	194194	154176	C	NP
	3/28	pot	AdN res	116116	144149	215217	176176	C	NP
	3/29	pot	AdN res	116116	144144	202225	176176	C	NP
	3/30	pot	AdN res	116116	149149	219219	176176	C	NP
	3/31	pot	AdN res	116116	144149	219223	176176	C	NP
	4/1	pot	AdN res	116116	149149	225225	176176	C	NP
	4/2	pot	AdN res	116116	144154	210217	176176	C	NP
	4/3	pot	AdN res	116116	144149	215219	176186	C	MP/NP
	4/4	pot	AdN res	116116	128149	217219	176180	C	NP
4/5	pot	AdN res	116116	144149	215219	176176	C	NP	
4/6	pot	AdN res	116116	128154	217223	176176	C	NP	
4/7	pot	Soxy res	116116	149211	219219	176186	C	NP	
4/8	pot	AdN res	116116	136144	217219	176186	C	NP	
4/9	pot	Ad-s3 res	116116	128149	194202	176186	C	MP/NP	
4/10	pot	Soxy res	116116	128149	210215	176176	G/C	MP/NP	
4/11	pot	Ad-s3 res	116116	140154	229231	176176	C	NP	
4/12	pot	AdN res	116116	144211	210217	176176	C	NP	
4/13	pot	AdN res	116116	144149	210217	176176	C	NP	
4/14	pot	AdN res	116116	128149	202215	176176	C	NP	
4/15	pot	AdN res	116116	144149	217217	176176	C	NP	
4/16	pot	AdN res	116120	144222	186186	154154	G/C	NP	
4/17	pot	Ad-s3 sek	116116	144149	186223	176176	C	NP	
4/18	pot	AdN res	116116	149154	219219	176176	C	NP	
4/19	pot	AdN sek	116116	136154	210210	176176	C	NP	
4/20	pot	Ad-s3 sek	116116	140149	217217	176186	C	NP	
4/21	pot	AdN res	116116	149149	194227	176176	C	NP	
4/22	pot	AdN res	116116	128149	215215	176176	C	NP	
4/23	pot	AdN res	116116	149149	217217	176186	C	NP	
4/24	pot	AdN res	116116	128149	210210	176176	C	NP	
N21	pot	AdN res	116116	136144	221225	176186	C	NP	
N22	pot	AdN res	116116	144149	217221	176176	C	NP	
N23	gla	AdN res	116128	149202	219219	154176	C	NP	
N24	kosor	AdN res	116133	154171	175175	170176	G/C	MP/NP	
N25	meh	Soxy res	133133	144179	175175	170170	G	MP	

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A

Lokacija	Oznaka	mtDNA	BFR002	Ssa197	Str24	Str591	GH2C	LDH	
Rakitnica	6/1	pot	AdN sek	116120	144179	206225	176176	C	NP
	6/2	pot	AdN sek	116120	128128	237237	176176	G/C	NP
	6/3	pot	Da-s1 sek	116120	144144	217225	176188	G/C	NP
	6/4	pot	Da-s1 res	116116	124144	233233	176176	G/C	NP
	6/5	pot	AdN res	116120	149149	233233	176176	C	NP
	6/6	pot	AdN res	116116	144144	210233	176176	G	NP
	6/7	pot	Ad-s3 sek	116120	144159	213225	176182	C	NP
	6/8	pot	Da-s1 sek	116120	140159	219219	176188	G/C	NP
	6/9	pot	Da-s1 res	116120	124144	210210	176188	C	NP
	6/10	pot	Da-s1 res	116116	149149	233233	176176	C	NP
	6/11	pot	AdN res	116120	128144	186233	176176	C	NP
	6/12	pot	Da-s1 res	120120	140149	233233	176176	C	NP
	6/13	pot	Da-s1 res	116116	128140	221227	176188	C	NP
	6/14	pot	Da-s1 res	116120	149149	188237	176188	C	NP
	6/15	pot	AdN res	116116	144144	210210	176188	G/C	NP
	6/16	pot	AdN res	116120	128211	210210	176176	C	NP
	6/17	pot	AdN res	116116	144211	210210	176186	C	NP
	6/18	pot	AdN res	116120	128144	225225	176188	G/C	NP
	6/19	pot	AdN res	116120	128144	233233	176188	C	NP
	6/20	pot	Da-s1 res	116120	144144	221221	176176	G/C	NP
	6/21	pot	AdN res	116120	128144	210210	176180	C	NP
	6/22	pot	Da-s1 res	116120	140140	210210	176176	C	NP
	6/23	pot	Da-s1 res	116116	144144	213221	176188	C	NP
	6/24	pot	AdN res	116116	128144	225225	176176	G/C	NP
	6/25	pot	AdN res	116116	128144	186233	188188	G/C	NP
	6/26	pot	AdN res	116116	144149	186217	176176	G/C	NP
	6/27	pot	AdN res	116116	144149	229229	176176	C	NP
	6/28	pot	AdN res	116116	144144	210210	176188	G/C	NP
	6/29	pot	AdN res	116120	128211	210210	176188	C	NP
	6/30	pot	Da-s1 res	116116	144144	210210	176176	G/C	NP
	6/31	pot	Da-s1 res	116120	144144	231231	176176	C	NP
	6/32	pot	AdN res	116120	144144	186223	176188	C	NP
	6/33	pot	Da-s1 res	120120	128149	210210	176188	C	NP
	6/34	pot	Da-s1 res	116116	128179	210210	176176	G/C	NP
	6/35	pot	Da-s1 res	116116	140159	210210	176176	C	NP
	6/36	pot	AdN res	116116	128144	210210	176188	G	NP
	6/37	pot	AdN res	116133	128128	221223	176176	G	NP
	6/38	pot	AdN res	116116	140159	196223	176176	C	NP
	6/39	pot	Da-s1 res	116120	144144	186221	186188	C	NP
	6/40	pot	AdN res	116116	144144	219210	176186	G/C	NP
	6/41	pot	Da-s1 res	120120	128144	210210	176188	C	NP
	6/42	pot	AdN res	116120	128128	221221	176176	C	NP
	6/43	pot	AdN res	116120	144144	206219	176188	C	NP
	6/44	pot	Da-s1 res	120120	140144	210210	176176	G/C	NP
	6/45	pot	AdN res	120120	140144	210210	176176	G/C	NP
Zadlaščica	PS1	soška	Ma-s1 res	124124	154185	163186	156156	G	NP
	PS2	soška	Ma-s1 res	124124	161185	186186	154154	G	NP

Priloga B

Haplotip AdN (format FASTA)

>AdN

```
CTAAATTAAACTATCCTCTGATTTTTTCAGCTATGTACAATAACAACTGTTGT
ACCTTGCTAACCCAATGTTATACTACATCTATGTATAATATTACATATTATG
TATTTACCCATATATATAATATAGCATGTGAGTAGTACATTATATGTATTAT
CAACATTAGTGAATTTAACCCCTCATACATCAGCACTAACTCAAGGTTTACA
TAAAGCAAAACACGTGATAATAACCAACTAAGTTGTCTTAACCCGATTAATT
GCTATATCAATAAAACTCCATCTAACACGGGCTCCGTCTTTACCCACCAACT
TTCAGCATCAGTCCTGCTTAATGTAGTAAGAACCGACCAACGATATATCAGT
AGGCATACTCTTATTGATGGTCAGGGACAGATATCGTATTAGGTCGCATCTC
GTGAACTATTCCCTGGCATTGGTTCCCTATATCAAGGGCTATCCTTAAGAAAC
CACCCCCTGAAAGCCGAATGTAAAGCATCTGGTTAATGGTGTCAATCTTATT
GCCCCTTACCCACCAAGCCGGGCGTTCTTTTATATGCATAGGGTTCCTTTT
TTTTTTTTTCCTTTCAGCTTGCATATACAAGTGCAAGCAAAGAAGTCTAACA
AGGTCGAACTAGATCTTGAATTCAGAGAACCCATGTATCATGGTGAAATGA
TATTCTATAAAGAATCACATACTTGGATATCAAGTGCATAAGGTTAATATTT
CACTTCATATATCTCTAAGATAACCCCGGCTTCTGCGCGGTAAACCCCTA
CCCCCTACGCTGAAGGATCCTTATATTCCTGTCAAACCCCTAAACCAGGAA
GTCTCAAATCAGCGCCAATCTTTTTATATACATTAATGAACTTTTTTGCCAA
TTTTATAGCATTGGCACCGACTACACTATCATTGGCACCCTTTTATAATT
AAAGTATACATTAATNAACTTTTTTCGCTAAATTTTATAACATTTAGCACCGA
CTCCACTGTCATTAGCACCCCTGTCAATC
```

Priloga C: Frekvence alelov mikrosatelitnih lokusov in SNP-jev po lokacijah. Oz-nake populacij: 1–Lađanica, 2–Neretva Ocrkavlje, 3–Ljuta, 4–Rakitnica, 5–Krupac, 6–Bukovica, 7–Neretva Glavatičevo, 8–Đajići in 9–Neretva Jablanica–Metković.

Lokus	Lokacija								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BFRO 002									
(N)	5	60	10	45	11	9	61	1	4
116	1,0000	0,9250	1,0000	0,6444	0,9091	0,8889	0,5328	1,0000	–
120	–	0,0250	–	0,3444	0,0455	0,0556	0,0410	–	0,6250
122	–	–	–	–	–	–	0,0082	–	–
124	–	–	–	–	–	0,0556	–	–	–
128	–	0,0167	–	–	–	–	0,0164	–	0,3750
131	–	–	–	–	–	–	0,1803	–	–
133	–	0,0333	–	0,0111	0,0455	–	0,1803	–	–
137	–	–	–	–	–	–	0,0410	–	–
<i>H_{exp.}</i>	–	0,1424	–	0,4659	0,1694	0,2037	0,6474	–	0,4688
<i>H_{n.b.}</i>	–	0,1436	–	0,4712	0,1775	0,2157	0,6528	–	0,5357
<i>H_{obs.}</i>	–	0,1000	–	0,4889	0,1818	0,1111	0,4098	–	0,7500
Ssa197									
(N)	5	60	10	45	11	9	61	1	4
116	–	–	0,0500	–	–	–	–	–	–
124	–	–	–	0,0222	–	–	–	–	–
128	0,2000	0,1250	0,1000	0,2111	0,4545	–	0,2377	–	–
132	–	–	0,4000	–	–	0,2778	0,0246	–	–
136	0,1000	0,0333	0,1000	–	–	0,0556	–	–	–
140	0,2000	0,0250	0,1500	0,1000	0,1364	0,5000	0,0328	–	–
144	–	0,2000	0,0500	0,4556	0,1364	–	0,1721	–	–
149	0,1000	0,4250	0,1500	0,1111	0,1818	0,0556	0,0574	–	–
154	0,1000	0,1083	–	–	–	0,1111	0,0246	–	–
159	–	–	–	0,0444	–	–	0,0164	–	–
163	–	0,0167	–	–	–	–	0,0082	–	–
171	–	0,0083	–	–	–	–	0,0410	–	–
175	–	–	–	–	–	–	0,1230	0,5000	–
179	–	0,0083	–	0,0222	–	–	0,1393	–	–
183	–	0,0083	–	–	–	–	0,0328	–	–
202	–	0,0083	–	–	–	–	–	–	0,1250
206	–	–	–	–	–	–	0,0082	–	–
211	–	0,0250	–	0,0333	0,0909	–	0,0246	–	–
215	0,3000	–	–	–	–	–	0,0328	–	–
222	–	0,0083	–	–	–	–	0,0246	0,5000	0,8750
<i>H_{exp.}</i>	0,8000	0,7490	0,7700	0,7215	0,7149	0,6543	0,8683	0,5000	0,2188
<i>H_{n.b.}</i>	0,8889	0,7553	0,8105	0,7296	0,7489	0,6928	0,8755	1,0000	0,2500
<i>H_{obs.}</i>	1,0000	0,7500	0,8000	0,5778	0,4545	0,8889	0,7869	1,0000	0,2500
LDH-G									
(N)	5	60	10	45	11	9	61	1	4
100	0,1000	0,0583	–	–	–	–	0,4098	–	0,2500
200	0,9000	0,9417	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,5902	1,0000	0,7500
<i>H_{exp.}</i>	0,1800	0,1099	–	–	–	–	0,4837	–	0,3750
<i>H_{n.b.}</i>	0,2000	0,1108	–	–	–	–	0,4877	–	0,4286
<i>H_{obs.}</i>	0,2000	0,0833	–	–	–	–	0,2295	–	0,5000

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge C

Lokus	Lokacija								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Str24									
(N)	5	60	10	45	11	9	61	1	4
161	–	–	0,3500	–	–	0,4444	–	–	–
171	0,1000	–	–	–	–	–	0,0902	–	–
175	–	0,0333	0,0500	–	–	0,1111	0,2213	0,5000	–
177	–	–	0,1500	–	–	0,1111	0,0656	–	–
179	–	–	–	–	0,0455	–	0,0082	–	–
184	–	–	0,2500	–	–	0,2778	–	–	–
186	–	0,0250	–	0,0556	0,0455	–	0,0902	–	1,0000
188	–	–	–	0,0111	0,0455	–	0,0082	–	–
190	–	–	0,0500	–	–	–	0,0164	–	–
194	–	0,0750	–	–	–	0,0556	–	–	–
196	–	–	–	0,0111	–	–	0,0164	–	–
202	0,1000	0,0250	–	–	–	–	0,0164	0,5000	–
204	–	–	–	–	–	–	0,0082	–	–
206	–	–	–	0,0222	0,0455	–	0,0328	–	–
208	–	–	–	–	–	–	0,0082	–	–
210	0,2000	0,0750	–	0,3778	0,0455	–	0,0492	–	–
213	–	0,0083	–	0,0222	–	–	0,0246	–	–
215	–	0,1083	–	–	–	–	0,0082	–	–
217	0,4000	0,2833	–	0,0222	0,1818	–	0,0820	–	–
219	–	0,1083	–	0,0444	0,2727	–	0,0328	–	–
221	0,2000	0,1000	0,0500	0,0889	0,1818	–	0,0738	–	–
223	–	0,0250	0,0500	0,0333	0,0455	–	0,0574	–	–
225	–	0,1083	0,0500	0,0778	0,0909	–	0,0656	–	–
227	–	0,0083	–	0,0111	–	–	–	–	–
229	–	0,0083	–	0,0222	–	–	0,0246	–	–
231	–	0,0083	–	0,0222	–	–	–	–	–
233	–	–	–	0,1444	–	–	–	–	–
237	–	–	–	0,0333	–	–	–	–	–
<i>H_{exp.}</i>	0,7400	0,8600	0,7800	0,8123	0,8388	0,6975	0,9038	0,5000	–
<i>H_{n.b.}</i>	0,8222	0,8672	0,8211	0,8215	0,8788	0,7386	0,9113	1,0000	–
<i>H_{obs.}</i>	0,6000	0,5333	0,7000	0,3556	0,6364	0,6667	0,8033	1,0000	–
Str591									
(N)	5	60	10	45	11	9	61	1	4
148	–	–	0,6500	–	–	0,9444	0,0574	–	–
150	–	–	0,1500	–	–	–	0,0082	–	–
152	–	–	–	–	–	0,0556	–	–	–
154	–	0,0333	–	–	0,0455	–	0,0492	–	1,0000
158	–	–	–	–	–	–	0,0820	0,5000	–
166	–	–	–	–	0,0455	–	–	–	–
170	–	0,0250	–	–	–	–	0,2623	–	–
172	–	–	–	–	–	–	0,0328	–	–
176	0,7000	0,8333	0,1500	0,7333	0,8182	–	0,4098	0,5000	–
180	0,2000	0,0083	–	0,0111	0,0455	–	0,0164	–	–
182	–	–	–	0,0111	–	–	–	–	–
186	0,1000	0,1000	0,0500	0,0333	0,0455	–	0,0738	–	–
188	–	–	–	0,2111	–	–	0,0082	–	–
<i>H_{exp.}</i>	0,4600	0,2938	0,5300	0,4163	0,3223	0,1049	0,7439	0,5000	–
<i>H_{n.b.}</i>	0,5111	0,2962	0,5579	0,4210	0,3377	0,1111	0,7500	1,0000	–
<i>H_{obs.}</i>	0,6000	0,2667	0,4000	0,4667	0,3636	0,1111	0,5574	1,0000	–
GH2C									
(N)	5	60	10	45	11	9	61	1	4
100	0,9000	0,9417	0,2000	0,7556	1,0000	–	0,4836	0,5000	0,6250
200	0,1000	0,0583	0,8000	0,2444	–	1,0000	0,5164	0,5000	0,3750
<i>H_{exp.}</i>	0,1800	0,1099	0,3200	0,3694	–	–	0,4995	0,5000	0,4688
<i>H_{n.b.}</i>	0,2000	0,1108	0,3368	0,3735	–	–	0,5036	1,0000	0,5357
<i>H_{obs.}</i>	0,2000	0,0833	–	0,3556	–	–	0,2787	1,0000	0,2500

Priloga D: Frekvence alelov mikrosatelitnih lokusov in SNP-jev po fenotipih. Oznake populacij: 1–glavatica, 2–kosor, 3–mehkoustna, 4–potočna postrv, 5–zubatak.

Lokus	Lokacija				
	1	2	3	4	
BFRO 002					
(N)	9	12	23	158	4
116	0,7778	0,6250	0,1087	0,8481	–
120	0,0556	0,0417	0,0217	0,1203	0,6250
122	–	–	–	0,0032	–
124	–	–	–	0,0032	–
128	0,1667	–	–	0,0032	0,3750
131	–	0,1667	0,3261	0,0095	–
133	–	0,1667	0,4565	0,0095	–
137	–	–	0,0870	0,0032	–
<i>H_{exp.}</i>	0,3642	0,5521	0,6654	0,2660	0,4688
<i>H_{n.b.}</i>	0,3856	0,5761	0,6802	0,2669	0,5357
<i>H_{obs.}</i>	0,3333	0,5000	0,5652	0,2152	0,7500
Ssa197					
(N)	9	12	23	158	4
116	–	–	–	0,0032	–
124	–	–	–	0,0063	–
128	0,2778	0,1250	0,0652	0,2089	–
132	0,0556	–	–	0,0475	–
136	–	–	–	0,0253	–
140	–	0,0417	–	0,1013	–
144	0,1111	0,2083	0,1739	0,2373	–
149	0,1667	–	–	0,2342	–
154	0,0556	0,0417	0,0435	0,0475	–
159	–	–	0,0217	0,0158	–
163	–	0,0417	–	0,0063	–
171	–	0,1250	0,0652	–	–
175	0,0556	0,0833	0,2391	0,0063	–
179	–	0,1667	0,2826	0,0095	–
183	–	–	0,0652	0,0063	–
202	0,0556	–	–	–	0,1250
206	0,0556	–	–	–	–
211	0,0556	0,0833	–	0,0253	–
215	–	0,0833	–	0,0158	–
222	0,1111	–	0,0435	0,0032	0,8750
<i>H_{exp.}</i>	0,8519	0,8715	0,8157	0,8284	0,2188
<i>H_{n.b.}</i>	0,9020	0,9094	0,8338	0,8310	0,2500
<i>H_{obs.}</i>	1,0000	0,9167	0,8261	0,6772	0,2500
LDH					
(N)	9	12	23	158	4
100	0,1111	0,3333	0,8478	0,0285	0,2500
200	0,8889	0,6667	0,1522	0,9715	0,7500
<i>H_{exp.}</i>	0,1975	0,4444	0,2580	0,0553	0,3750
<i>H_{n.b.}</i>	0,2092	0,4638	0,2638	0,0555	0,4286
<i>H_{obs.}</i>	–	0,5000	0,2174	0,0570	0,5000

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge D

Lokus	Lokacija				
	1	2	3	4	
Str24					
(N)	9	12	23	158	4
161	–	–	–	0,0475	–
171	–	–	0,2174	0,0063	–
175	0,0556	0,4167	0,4565	0,0095	–
177	–	–	0,0652	0,0316	–
179	–	–	0,0217	0,0032	–
184	–	–	–	0,0316	–
186	0,1667	0,1250	0,0652	0,0348	1,0000
188	–	–	0,0217	0,0063	–
190	0,0556	–	–	0,0063	–
194	–	–	–	0,0316	–
196	–	–	0,0217	0,0063	–
202	–	0,0417	0,0217	0,0158	–
204	–	–	0,0217	–	–
206	0,0556	–	0,0435	0,0127	–
208	–	–	–	0,0032	–
210	0,0556	–	–	0,1614	–
213	0,1111	–	–	0,0127	–
215	–	–	–	0,0443	–
217	0,1111	0,1250	0,0217	0,1519	–
219	0,1111	–	–	0,0791	–
221	0,1667	0,0833	0,0217	0,0949	–
223	0,0556	–	–	0,0443	–
225	0,0556	0,2083	–	0,0791	–
227	–	–	–	0,0063	–
229	–	–	–	0,0190	–
231	–	–	–	0,0095	–
233	–	–	–	0,0411	–
237	–	–	–	0,0095	–
<i>H_{exp.}</i>	0,8889	0,7431	0,7306	0,9158	–
<i>H_{n.b.}</i>	0,9412	0,7754	0,7469	0,9187	–
<i>H_{obs.}</i>	0,5556	0,5833	0,8696	0,5633	–
Str591					
(N)	9	12	23	158	4
148	0,0556	–	–	0,1139	–
150	–	0,0417	–	0,0095	–
152	–	–	–	0,0032	–
154	0,3333	–	0,0217	0,0127	1,0000
158	–	0,0417	0,2174	–	–
166	–	–	–	0,0032	–
170	0,0556	0,2500	0,5652	0,0063	–
172	–	0,0833	0,0435	–	–
176	0,4444	0,5000	0,1304	0,6930	–
180	0,0556	0,0417	–	0,0158	–
182	–	–	–	0,0032	–
186	0,0556	0,0417	0,0217	0,0759	–
188	–	–	–	0,0633	–
<i>H_{exp.}</i>	0,6790	0,6736	0,6134	0,4964	–
<i>H_{n.b.}</i>	0,7190	0,7029	0,6271	0,4980	–
<i>H_{obs.}</i>	0,5556	0,7500	0,6087	0,3544	–
GH2C					
(N)	9	12	23	158	4
100	0,6667	0,6250	0,1087	0,7722	0,6250
200	0,3333	0,3750	0,8913	0,2278	0,3750
<i>H_{exp.}</i>	0,4444	0,4688	0,1938	0,3519	0,4688
<i>H_{n.b.}</i>	0,4706	0,4891	0,1981	0,3530	0,5357
<i>H_{obs.}</i>	0,2222	0,5833	0,2174	0,1646	0,2500