

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2018/29

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1435	
Naslov projekta	Varstvena genetika avtohtone potočne postrvi v Sloveniji Conservation genetics of indigenous brown trout in Slovenia	
Vodja projekta	11906 Aleš Snoj	
Naziv težišča v okviru CRP	3.02.03 Trajnostno gospodarjenje z avtohtono potočno postrvjo v Sloveniji	
Obseg učinkovitih ur raziskovalnega dela	1468	
Cenovna kategorija	D	
Obdobje trajanja projekta	07.2014 - 06.2017	
Nosilna raziskovalna organizacija	510	Univerza v Ljubljani
	481	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke		
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4	BIOTEHNIKA
	4.02	Živalska produkcija in predelava
	4.02.01	Genetika in selekcija
Družbeno-ekonomski cilj	08.	Kmetijstvo
Raziskovalno področje po šifrantu FORD/FOS	4	Kmetijske vede in veterina
	4.02	Znanosti o živalih in mlekarstvu

2. Sofinancerji

	Sofinancerji	
1.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Slovenske avtohtone populacije potočne postrvi (*Salmo trutta*) so ogrožene zaradi ribogojniške atlantske linije potočne postrvi, s katero se križajo. Do sedaj je bilo odkritih devet čistih populacij. Zaradi nizke efektivne velikosti (N_e) in genetske pestrosti te populacije ne zadostujejo za repopulacijo celotnega območja potočne postrvi v Sloveniji. Glavni cilj raziskave je bil identifikacija dodatnih genetsko čistih virov in ugotoviti, ali pri potočni postrvi obstajajo teritorialno specifični genetski *pooli*.

Postrvi smo vzorčili na 80 lokacijah v savskem in dravskem rečnem sistemu. V raziskavo smo vključili tudi tri referenčne populacije atlantskih potočnih postrvi.

Analizirali smo točkovne polimorfizme na CR mtDNA, 15 nevtralnih mikrosatelitov in tri mikrosatelite z domnevno adaptivno vrednostjo. Ugotavljali smo introgresijo, genetsko pestrost, N_e , strukturo in medpopulacijsko diferenciacijo ter vpliv okolja na selekcijo. Populacije smo glede na stopnjo introgresije razvrstili v pet skupin: (i) $\geq 96\%$ nDNA, 17 populacij, (ii) 90 do 95% nDNA, 7 populacij, (iii) 84 do 89% nDNA, 4 populacije, (iv) 60 do 80% nDNA, 19 populacij, (v) $< 50\%$ nDNA. Genetska pestrost in N_e sta za prvi dve skupini podpovprečno nizki. F-statistika in PCA sta za prve tri skupine razkrili parne F_{st} vrednostmi od 0.52 do 0.81. Analiza populacijske strukture je razkrila pet genetsko homogenih in geografsko zaokroženih enot: (1) Bohinjsko območje, (2) sistem tržiške Bistrice, (3) sistem Sore, (4) sistem Savinje in (5) sistem Mislinje; preostalih šest lokacij predstavlja zelo diferencirane genetske skupine.

Analiza preživetja zaroda v ribogojnici je pokazala, da na to lastnost bistveno vpliva poreklo očetov; do faze iker z očmi so bile najbolj viabilne ikre, oplojene z divjimi samci, v fazi mladice so imele največje preživetje tiste, ki so jih oplodili ribogojniški samci.

Vse populacije z avtohtonim genetskim deležem $> 90\%$ nDNA imajo glede na ekstremno nizko genetsko pestrostjo in N_e še vedno preskromen evlucijski potencial, da bi z njimi repopulirali celotno Slovenijo, imajo pa lokalni pomen. Če se želi to genetsko in posledično fenotipsko raznolikost ohranjati, bo potrebno z lokalnimi populacijami upravljati oddvojeno. Za rehabilitacijo bi bilo torej nujno najti dodatne vire genetsko sprejemljivih lokalnih plemenskih rib, ki bi zagotavljale zadostno genetsko pestrost, adaptivnost in ohranjanje regijsko specifičnih fenotipov. To troje pa je mogoče doseči le z uporabo lokalnega materiala. Predlagamo, da se areal potočne postrvi v Sloveniji razdeli na smiselne geografske enote upravljanja. V okviru teh bi se neposredno iz cone križanja z genetskima testom izbralo najboljši material in se ga v kombinaciji z genetsko čistimi populacijami uporabilo za vzpostavitev plemenskih jat samic, ki bi se jih oplojevalo z genetsko primernimi lokalnimi samci iz divjine. Predlagamo, da bi za zaščito in varovanje genetsko čistih populacij ustvarjali njihove kopije in z njimi naselili prazne sosednje potoke.

ANG

Slovenian brown trout (*Salmo trutta*) are threatened due hybridization with introduced brown trout of Atlantic lineage. So far, nine non-introgressed populations were detected. These populations have very low genetic diversity and small effective population size (N_e) and are thus not acceptable for repopulation of entire brown trout range in Slovenia. The main goal of this investigation is identification of additional genetically pure sources and to assess the existence of territorially specific gene pools.

Brown trout were sampled in 80 locations in the Sava and Drava drainages. Three reference Atlantic populations were also included.

CR mtDNA single nucleotide polymorphisms, 15 neutral microsatellites and three microsatellites with adaptive value were analyzed. Introgression, genetic diversity, N_e , structure and inter-population differentiation were surveyed. The populations were regarding the rate of native nDNA sorted in five groups: (i) $\geq 96\%$, 17 populations, (ii) 90 do 95%, 7 populations, (iii) 84 do 89%, 4 populations, (iv), 60 do 80%, 19 populations, (v) $> 50\%$. Genetic diversity and N_e were below average for the first two groups; for the first three groups, F-statistics and PCA revealed high inter-population differentiation (F_{st} up to 0.81). Population structure analysis revealed genetically homogeneous and geographically

rounded units: (1) Bohinj area, (2) Tržiška Bistrica river system, (3) Sora river system, (4) Savinja river system and (5) Mislinja river system; the remaining six locations represented much differentiated genetic groups.

Analysis of offspring survival in hatchery showed that this trait was significantly influenced by male origin; in the stage of eggs with eyes, eggs fertilized with wild males were the most viable, while in the stage of fry, the highest survival rate was recorded in a group fertilized by hatchery males.

Considering extremely low genetic diversity and N_e , evolutionary potential of all the populations with native genetic share >90% is still insufficient to use them for extensive repopulation in Slovenia; rather, they should be used locally. If genetic and consequently phenotypic diversity is to be conserved, the local populations will need to be managed separately. To restore brown trout in Slovenia, it should be vital to find additional sources of genetically acceptable local genitors, which would assure sufficient genetic diversity, adaptiveness and perseveration of locally specific phenotypes. This can only be achieved using local fish.

We suggest brown trout range in Slovenia to be divided into reasonable geographic management units. Within each, the best genitors would be genetically selected directly from hybridization zone and, combined with non-introgressed populations, used to establish female genitors to be fertilized with genetically appropriate local males from the wild. To protect non-introgressed populations we suggest making their copies, which should be introduced into neighboring fishless streams.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta²

Cilji raziskovalnega projekta so bili sledeči:

- Poiskati dodatne vire genetsko čistih populacij.
- Vzpostaviti sistem molekularnih markerjev, s katerim bo mogoče ločevati med genetskimi profili, značilnimi za posamezne lokalne populacije oz. regijsko zaključene enote.
- Identificirati genetski profil (e.g., v okviru adaptivnih markerjev), ki je značilen za posamezno specifično okolje (e.g., ribogojnica, naravno okolje).
- Izdelati predloge ukrepov za obnovo populacije domorodne potočne postrvi.

Vsi cilji projekta so bili doseženi.

Ključne rezultati raziskovalnega projekta so naslednji:

- Našli smo 24 populacij potočne postrvi z avtohtonim genetskim deležem >90%.
- Vse populacije imajo izjemno nizko genetsko pestrost in majhno efektivno velikost.
- Analiza populacijske strukture je razkrila pet relativno homogenih genetskih in regijsko zaokroženih enot:
 - (1) Bohinjsko območje
 - (2) sistem tržiške Bistrice
 - (3) sistem Sore
 - (4) sistem Savinje
 - (5) sistem Mislinje
- Preostalih šest lokacij (posamezni izolirani potoki) predstavlja neodvisne in zelo diferencirane genetske skupine.
- Analiza vpliva različnega okolja na selekcijo potočne postrvi je pokazala, da je pri divjih populacijah alelna pestrost med adaptivnimi in nevtralni lokusi sorazmerna, medtem ko je pri ribogojniških populacijah to razmerje nagnjeno v prid alelni pestrosti nevtralnih lokusov, kar kaže, da v ribogojnici na nekatere alele adaptivnih lokusov deluje negativna selekcija.
- Analiza preživetja zaroda v ribogojnici je pokazala, da je na to lastnost bistveno vplivalo poreklo očetov; do faze iker z očmi so bile najbolj viabilne tiste ikre, oplojene s samci iz divjine, v fazi mladice pa so imele največje preživetje tiste, ki so jih oplodili ribogojniški samci.

Iz dobljenih rezultatov izhajajo naslednje ugotovitve:

Genetsko čiste populacije zaradi svojega zelo nizkega evolucijskega potenciala, ki smo ga ocenili preko genetske pestrosti in efektivne velikosti populacij, ekstremno visoke medpopulacijske diferenciacije in regijsko specifičnih genetskih profilov niso primerne za celostno

repopulacijo potočne postrvi v Sloveniji. Te populacije se zato lahko uporablja za namen repopulacije v omejenem obsegu le na lokalni ravni. Rezultat tega spoznanja je ugotovitev, da je za učinkovit celosten repopulacijski proces v Sloveniji vanj potrebno v kombinaciji z genetsko čistimi populacijami vključiti tudi lokalni material iz cone križanja in v okviru tega z genetskim testom odbrati genetsko najprimernejše osebkke za proizvodnjo zaroda za repopulacijo. Glede na negativno selekcijo, ki jo ima ribogojnica na divje populacije, kar smo pokazali v svoji raziskavi, je potrebno plemensko jato samic osveževati z ženskimi osebki iz divjine, za oploditev pa uporabljati izključno samce iz divjine.

Za zaščito in varovanje genetsko čistih populacij bi bilo potrebno ustvarjati njihove kopije in z njimi naseliti prazne sosednje potoke. Razširjanje lokalnih genetskih »poolov« z ustvarjanjem populacijskih kopij ima tudi repopulacijski učinek, saj genetski pretok, ki poteka nizvodno, postopno osvežuje introgresirane genome in jih strukturno spreminjajo v prid lokalnim domorodnim linijam.

Uporaba rezultatov:

(1) Prispevek k ohranjanju oz. varovanje naravne dediščine:

Rezultati raziskave v prvi vrsti predstavljajo znanstveno podlago, na osnovi katere lahko strokovne službe izdelajo izpopolnjen varstveni načrt za avtohtono potočno postrv v Sloveniji.

(2) Prenos obstoječih znanj v prakso in razvoj novih upravljaljskih rešitev:

Določena spoznanja raziskave lahko ribiški upravljaljci neposredno vključijo v svoje upravljaljske programe.

(3) Strokovna ocena stanja:

V okviru raziskave smo razvili orodja, ki omogočajo ocenjevanje stanja katerihkoli populacij potočne postrvi tudi drugje (izven Slovenije) in/ali v bodoče. Z manjšimi modifikacijami se to metodiko lahko aplicira tudi na druge sorodne salmonidne vrste v Sloveniji in širše.

(4) Varovanje okolja in trajnostni razvoj:

Učinek raziskave se lahko potencialno realizira preko vzpostavitve ustreznega upravljanja s potočno postrvjo in posledično skozi rehabilitacijo potočne postrvi v Sloveniji.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Cilji projekta so bili sledeči:

(1) Poiskati dodatne vire genetsko čistih populacij, (2) vzpostaviti sistem molekularnih markerjev, s katerim bo mogoče ločevati med genetskimi profili, značilnimi za posamezne lokalne populacije oz. regijsko zaokrožene enote, (3) identificirati genetski profil v okviru adaptivnih genov, ki je značilen za posamezno specifično okolje (e.g., ribogojnica, naravno okolje), (4) izdelati predloge ukrepov za obnovo populacije domorodne potočne postrvi.

V okviru realiziranega projekta smo odgovorili na vse zastavljene cilje:

Našli smo 24 genetsko pristnih populacij domorodne potočne postrvi.

Izpolnjen drugi cilj potrjuje identifikacija petih genetsko homogenih in hkrati geografsko zaokroženih enot, ki smo jih izenačili z enotami, primernimi za enovito ribiško upravljanje.

Kot je razvidno iz prijave projekta, je bil tretji cilj pilotne narave, saj smo analize adaptivnosti izvajali le na nekaj kandidatnih genih, poznanih iz literature. (Izolacija adaptivnih genov na osnovi RAD sekvenciranja ni bila predmet tega projekta.) Navkljub omejenemu naboru potencialno informativnih markerjev smo uspeli posredno in neposredno prikazati genetske razlike med ribogojniškim in divjim materialom, ki nastanejo kot rezultat selekcije na različna okolja.

V okviru četrtega cilja smo na osnovi rezultatov projekta podali svoja mnenja in priporočila za upravljanje s potočno postrvjo v Sloveniji z namenom rehabilitacije njenih avtohtonih virov.

6. Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine⁴

Ni bilo sprememb.

7. Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju⁵

Dosežek

1.	COBISS ID		
	Naslov	SLO	
		ANG	
	Opis	SLO	
		ANG	
	Objavljeno v		
Tipologija			

8. Najpomembnejši dosežek projektne skupine na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti⁶

Dosežek				
1.	COBISS ID		3934088	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Varstvena genetika avtohtone potočne postrvi v Sloveniji	
		ANG	Conservation genetics of native brown trout in Slovenia	
	Opis	SLO	Prispevek obsega detajlno poročilo projekta in se v celoti nahaja v prilogi.	
		ANG	The contribution contains detailed report of the Project and can be found in the attachment.	
	Šifra		D.11	Drugo
	Objavljeno v		Biotehniška fakulteta; 2017; 1 CD ROM; Avtorji / Authors: Snoj Aleš, Bravničar Jernej, Sušnik Bajec Simona	
Tipologija		2.12 Končno poročilo o rezultatih raziskav		
2.	COBISS ID		3991176	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Genetska pestrost in atlantska postrv v Sloveniji	
		ANG	Genetic diversity and Atlantic brown trout in Slovenia	
	Opis	SLO	Obravnavan je bil pomen genetske pestrosti kot osnovno merilo za ugotavljanje evolucijskega potenciala vrst in populacij s poudarkom na lokalnih genetsko čistih populacijah potočne postrvi, ki so bile predmet obravnave v tem projektu. Razpravljalo se je tudi o vplivu vnesenih atlantskih ribogojniških populacij potočne postrvi na slovenske domorodne populacije.	
		ANG	The role of genetic diversity as a basic measure for assessing evolutionary potential of species and populations was discussed with special emphasis on local genetically pure brown trout, studied in this project. The impact of introduced Atlantic hatchery-reared populations on Slovenian native brown trout populations was also discussed.	
	Šifra		F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)
	Objavljeno v		2017; Avtorji / Authors: Snoj Aleš	
Tipologija		3.15 Prispevek na konferenci brez natisa		
3.	COBISS ID		3991432	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Predstavitev rezultatov raziskave in izhodišč za upravljanje s potočno postrvjo v smeri njene rehabilitacije	
		ANG	Presentation of the results of the project and bases for managing the brown trout in the direction of its rehabilitation	
	Opis	SLO	Seminar je bil organiziran za ribiške upravljavce z namenom predstavitve rezultatov projekta in kot uvod v osnove genetskega menedžmenta na primeru potočne postrvi.	

	Dosežek	
	ANG	The seminar was organised for brown trout managers in order to present them the results of the project and to introduce them into the principles of genetic management using the studied brown trout as an example.
Šifra	F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
Objavljeno v	2017; Avtorji / Authors: Bravničar Jernej	
Tipologija	3.15 Prispevek na konferenci brez natisa	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Za analizo, izvedeno v tem ciljnem raziskovalnem projektu, smo uporabili že uveljavljena molekularna orodja, zato projekt ne prispeva neposredno k razvoju osnovnih znanosti. Z znanstvenega vidika so rezultati projekta doprinesli k širšemu poznavanju molekularne ekologije potočne postrvi, predvsem v smislu poznavanja filogeografije te vrste; za območje Slovenije predhodno namreč še ni bilo zadostnih podatkov o geografski razporejenosti evolucijskih linij potočne postrvi. Poleg tega smo natančno raziskali vrsto populacijsko genetskih parametrov divjih populacij potočne postrvi v Sloveniji in tako osvetlili predvsem njihovo populacijsko strukturo, genetsko pestrost in njihov evolucijski potencial ter s tem pripomogli k boljšemu poznavanju biologije vrste. Novost na področju genomike je zagotovo študija adaptivnih sprememb, izvedena v okviru poljskega poskusa, preko katerega smo spremljali vpliv različnih selekcijskih pritiskov na poskusne živali. Po našem vedenju tak poskus še ni bil izveden na salmonidih.

ANG

For the analysis performed in this target research project already well established molecular tools were used, so the project does not directly contribute to the development of basic science. Nevertheless, from the scientific perspective, the results of the project extended the general knowledge of molecular ecology of brown trout, especially in terms of the species phylogeography given the data on the distribution of evolutionary lineages of brown trout in Slovenia were previously insufficient. In addition, we carefully studied an array of population genetic parameters of wild populations in Slovenia, thus highlighting their population structure, genetic diversity and their evolutionary potential, thereby contributing to better knowledge of species biology. A novelty in the field of genomics surely represents the genetic study of adaptive variation that was performed through the field experiment, in which different selection pressures and corresponding genetic change were followed. According to our knowledge, such an experiment has not yet been implemented on salmonids.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Glavni pomen rezultatov predlaganega projekta je varovanje naravne dediščine, katere del v Sloveniji je nedvomno tudi avtohtona potočna postrv, ki je bila upodobljena celo na kovancu slovenskega tolarja. Projekt je izrazito praktično usmerjen in je namenjen kot neposredna pomoč pri izdelavi varstvenega načrta za avtohtono potočno postrv v Sloveniji s končnim ciljem njene repopulacije. Podatke o lokacijah genetsko čistih donavskih populacij smo posredovali MKO in ZZRS ter ribiškim družinam, ki bodo to informacijo implementirali v ukrepe za obnovo populacije avtohtone potočne postrvi, hkrati pa bo služila pri strateškem odločanju glede upravljanja rib v slovenskih celinskih vodah. Sistem molekularnih markerjev za regijsko in inter-populacijsko ločevanje osebkov bo omogočal ugotavljanje identitete

posameznih enot potočne postrvi in s tem tudi sledenje in nadziranje njihovega prenašanja izven dovoljenega geografskega območja. Predvidevamo, da se bo gospodarjenje s potočno postrvjo preselilo v okvir lokalnih območij upravljanja, kjer bodo za potrebe dopolnilnega vlaganja uporabljali izključno svoj lokalni material. Pričakujemo, da se lahko s takim upravljanjem in skupaj z drugimi priporočili, ki jih predlagamo, doseže, da bo v območjih, ki jih trenutno naseljuje hibridna združba donavskih in atlantskih potočnih postrvi, pri teh populacijah prišlo do znatne zamenjave neavtohtonih genov z avtohtonimi geni. Poleg tega predvidevamo, da se bodo ponovno vzpostavili regijsko značilni fenotipski profili potočnih postrvi, kar bo v okviru športnega ribolova predstavljalo dodano vrednost za posamezne regije v Sloveniji.

ANG

The main significance of the results of the proposed project is the protection of the natural heritage, which in Slovenia is undoubtedly also an autochthonous brown trout, which was even depicted on the one tolar coin of the former Slovenian currency. The project is very practically oriented and is intended as direct assistance in the development of a protective plan for autochthonous trout in Slovenia with the ultimate goal of its repopulation. Data on the locations of genetically pure Danube populations were forwarded to the Ministry of Agriculture, Forestry and Food, Fisheries Institute of Slovenia and angling clubs, which will implement this information in the measures for the restoration of the autochthonous brown trout populations, while serving as strategic decision makers for fish management in Slovenian inland waters. A system of molecular markers for regional and inter-population separation of specimens will enable the identification of individual units of brown trout and thus also track and monitor their transfer outside the permitted geographical area. It is assumed that the management of brown trout will be transferred to the local management areas, where they will use exclusively their local material for the needs of supplemental stocking. We expect that with such management and together with the other recommendations we suggest, it will be possible to achieve significant replacement of non-autochthonous genes with native genes in these populations in the areas currently occupied by the hybrid swarm of the Danube and Atlantic brown trout. In addition, it is anticipated that the regionally significant phenotypic profiles of brown trout will be restored, which will, in the context of sport fishing, be of added value for individual regions in Slovenia.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

1 v domačih znanstvenih krogih

2 pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?^{1.1}

Zavod za ribištvo Slovenije, Ribiške družine Bled, Tržič, Škofja Loka, Ljubno, HIDROSVET d.o.o., Zavod Umbra, Zavod Revivo.

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

1 v mednarodnih znanstvenih krogih

2 pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:^{1.2}

/

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:^{1.3}

/

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	

	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	

	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE

	Rezultat	Dosežen <input type="checkbox"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="checkbox"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	DA <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	DA <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	DA <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih <input type="checkbox"/>
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih <input type="checkbox"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	DA <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	DA <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	DA <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	DA <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	DA <input type="checkbox"/> DA <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

13.Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	1	2	3	4	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	1	2	3	4	
G.01.03.	Drugo:	1	2	3	4	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	1	2	3	4	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	1	2	3	4	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	1	2	3	4	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	1	2	3	4	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	1	2	3	4	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	1	2	3	4	
G.02.07.	Večji delež izvoza	1	2	3	4	
G.02.08.	Povečanje dobička	1	2	3	4	
G.02.09.	Nova delovna mesta	1	2	3	4	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	1	2	3	4	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	1	2	3	4	
G.02.12.	Drugo:	1	2	3	4	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	1	2	3	4	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	1	2	3	4	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	1	2	3	4	
G.03.04.	Drugo:	1	2	3	4	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	1	2	3	4	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	1	2	3	4	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	1	2	3	4	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	1	2	3	4	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	1	2	3	4	
G.04.06.	Drugo:	1	2	3	4	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj					
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	1	2	3	4	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	1	2	3	4	

G.07.03.	Energetska infrastruktura	1	2	3	4	
G.07.04.	Drugo:	1	2	3	4	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	1	2	3	4	
G.09.	Drugo:	1	2	3	4	

Komentar

14. Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi javnih razpisov za sofinanciranje raziskovalnih projektov za leti 2015 in 2016¹⁴

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni;
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki (v primeru, da poročilo ne bo oddano z digitalnima podpisoma);
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta;
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška
fakulteta

Aleš Snoj

ŽIG

Datum:

7.3.2018

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2018/29

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)

² Navedite cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Navedite morebitna bistvena odstopanja in spremembe od predvidenega programa dela raziskovalnega projekta, zapisanega v prijavi raziskovalnega projekta. Navedite in utemeljite tudi spremembe sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (t. j. v letu 2016). Če sprememb ni bilo, navedite »Ni bilo sprememb«. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite dosežke na raziskovalnem področju (največ deset), ki so nastali v okviru tega projekta.

Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite dosežke na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti (največ pet), ki so nastali v

okviru tega projekta.

Dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka, sistem nato sam izpolni podatke, manjkajoče rubrike o dosežku pa izpolnite.

Dosežek na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek dosežka na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. v sistemu COBISS rezultat ni evidentiran). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁴ Izvajalec mora za projekte, odobrene na podlagi Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2016« v letu 2016 in Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2016, na spletnem mestu svoje RO odpreti posebno spletno stran, ki je namenjena projektu. Obvezne vsebine spletne strani so: vsebinski opis projekta z osnovnimi podatki glede financiranja, sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS, faze projekta in njihova realizacija, bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta ter logotip ARRS in drugih sofinancerjev. Spletna stran mora ostati aktivna še 5 let po zaključku projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2018 v1.00

11-03-2E-A6-28-58-AF-B0-D6-97-AD-43-96-CC-73-19-59-45-BF-E3

Priloga h končnemu poročilu projekta

VARSTVENA GENETIKA AVTOHTONE POTOČNE POSTRVI V SLOVENIJI

Jernej Bravničar, Simona Sušnik in Aleš Snoj

ABSTRAKT

Slovenske avtohtone populacije potočne postrvi (*Salmo trutta*) so ogrožene zaradi domesticirane ribogojniške atlantske linije potočne postrvi, s katero so nekaj desetletij poribljali odprte vode, kjer se je le-ta križala z avtohtonimi osebki. Dosedanje genetske raziskave so pokazale, da prevladujoči del areala potočne postrvi naseljujejo križanci, medtem ko so genetsko čiste avtohtone populacije omejene le na izolirane zgornje tokove manjših potokov. Do sedaj je bilo odkritih devet čistih populacij, večina v dravskem porečju na Koroškem, vse imajo zelo nizko efektivno velikost in zelo nizko genetsko pestrost, kar kaže na njihov skromen evlucijski potencial, zaradi česar te populacije ne zadostujejo za repopulacijo celotnega območja potočne postrvi v Sloveniji.

Osnovni cilj raziskave je bil najti primerno strategijo za rehabilitacijo avtohtone potočne postrvi v Sloveniji. Ključen element tega je bila identifikacija dodatnih genetsko čistih virov, ki naj bi zagotovili zadostno genetsko pestrost in s tem možnost uporabe tega materiala za repopulacijo avtohtone potočne postrvi. Ugotavljali smo tudi, ali pri potočni postrvi obstajajo teritorialno specifični genetski »pooli«, s katerimi bi bilo potrebno oddvojeno upravljati in jih medsebojno ne mešati. Poleg tega v raziskavi preučujemo vpliv različnega okolja na selekcijo potočne postrvi. Na osnovi dobljenih rezultatov načrtujemo podati smernice za repopulacijo avtohtone potočne postrvi v Sloveniji.

Postrvi smo vzorčili na 80 lokacijah (po ca. 20 osebkov) v 20 ribiških družinah v savskem in dravskem rečnem sistemu. V raziskavo smo vključili tudi večino populacij, ki smo jih kot genetsko ustrezne prepoznali v predhodni raziskavi, poleg tega pa še tri plemenske jate in tri referenčne ribogojniške populacije atlantskih potočnih postrvi.

Analizirali smo posamezne točkovne polimorfizme (SNP-je) na kontrolni regiji mtDNA, 15 nevtralnih mikrosatelitnih lokusov in tri mikrosatelitne lokuse z domnevno adaptivno vrednostjo. Ugotavljali smo introgresijo neavtohtonih genov za populacije in osebke; populacijam smo določali genetsko pestrost, efektivno velikost, strukturo in medpopulacijsko diferenciacijo. Za analizo podatkov smo uporabljali programe Genetix, Populations, FSTAT, STRUCTURE in STRUCTURE Harvester.

Populacije smo glede na prisotnost donavskega in atlantskega genetskega deleža mitohondrijske in jedrne DNA razvrstili v pet skupin: (i) z zelo visokim donavskim genetskim deležem (100% mtDNA, $\geq 96\%$ nDNA), 17 populacij, (ii) z visokim donavskim genetskim deležem (100% mtDNA, 90 do 95% nDNA), 7 populacij, (iii) s solidnim donavskim genetskim deležem (100% mtDNA, 84 do 89% nDNA), 4 populacije, (iv) 100% mtDNA, 60 do 80% nDNA, 19 populacij, (v) introgresija z atlantskimi geni nad 50%. Genetska pestrost in efektivna velikost populacij (N_e) sta za prvi dve skupini ekstremno nizki ($H = 0.125$ do 0.350 ; $A = 1.42$ do 3.18 ; 1.26 haplotipa na populacijo; $N_e = 2-20$). F-statistika in analiza PCA sta za prve tri skupine razkrili zelo visoko medpopulacijsko diferenciacijo ($F_{st}=0.52$), podprto z visokimi parnimi F_{st} vrednostmi (do 0.81). Analiza populacijske strukture je razkrila pet relativno homogenih genetskih in geografsko zaokroženih enot: (1) Bohinjsko območje, (2) sistem Tržiške Bistrice, (3) sistem Sore, (4) sistem Savinje in (5) sistem Mislinje; preostalih šest lokacij (posamezni izolirani potoki) predstavlja neodvisne in zelo diferencirane genetske skupine.

Analiza vpliva različnega okolja na selekcijo potočne postrvi je pokazala, da je pri divjih populacijah alelna pestrost med adaptivnimi in nevtralnimi lokusi sorazmerna, medtem ko je pri ribogojniških populacijah to razmerje nagnjeno v prid alelni pestrosti nevtrálnih lokusov, kar nakazuje, da v ribogojnici na nekatere alele adaptivnih lokusov deluje negativna selekcija. Analiza preživetja zaroda v ribogojnici je pokazala, da je na to lastnost bistveno vplivalo poreklo očetov; do faze iker z očmi so bile najbolj viabilne tiste ikre, oplojene s samci iz divjine, v fazi mladice pa so imele največje preživetje tiste, ki so jih oplodili ribogojniški samci.

Ker imajo vse populacije z visokim avtohtonim genetskim deležem ekstremno nizko genetsko pestrostjo in N_e , menimo, da imajo kljub temu, da se pojavljajo v večjem številu kot v predhodni raziskavi, še vedno preskromen evlucijski potencial in da zato niso primerne za obsežno repopulacijo potočne postrvi v Sloveniji, temveč bi morale imeti zato le lokalni pomen. Specifične genetske profile populacij smo dokazali na osnovi nevtrálnih markerjev. Če naj bi to genetsko in posledično fenotipsko raznolikost ohranjali, bo potrebno z lokalnimi populacijami oddvojeno upravljati in se izogibati njihovem medsebojnemu mešanju. Za rehabilitacijo avtohtone potočne postrvi v Sloveniji bi bilo torej nujno najti dodatne vire genetsko sprejemljivih lokalnih plemenskih rib, ki bi zagotavljale zadostno genetsko pestrost, adaptivnost in ohranjanje regijsko specifičnih fenotipov. To troje pa je mogoče doseči le z uporabo lokalnega materiala. Mnenja smo, da je bolje uporabiti lokalni material, pa čeprav ta ni povsem genetsko čist, in na ta način ohraniti vsaj preostanek avtohtonih lokalnih genov, ki zagotavljajo adaptivnost in potencial za izražanje lokalnih fenotipov.

Predlagamo, da se areal potočne postrvi v Sloveniji razdeli na smiselna geografska območja, ki bodo predstavljala najmanjše enote upravljanja. V okviru teh območij bi neposredno iz cone križanja s pomočjo genetskega testa izbrale najboljše material in ga v kombinaciji z genetsko čistimi populacijami (kjer so na voljo) uporabili za vzpostavitev plemenskih jat samic s sprejemljivim donavskim deležem. Ikre teh samic bi vsakoletno oplojevali s semenom lokalnih samcev iz divjine. Kako visok delež neavtohtonih genov bi bil v neki lokalni populaciji sprejemljiv, je odvisno od konkretnih razmer v posameznem ribiškem območju oz. ribiški družini. Predlagamo, da bi za zaščito in varovanje genetsko čistih populacij ustvarjali njihove kopije in z njimi naselili prazne sosednje potoke. Razširjanje lokalnih genetskih »poolov« je tudi repopulacijski ukrep, saj genetski pretok, ki poteka nizvodno, postopno osvežuje introgresirane genome in jih strukturno spreminjajo v prid donavski liniji.

ABSTRACT

Slovenian native brown trout (*Salmo trutta*) are threatened due to domesticated hatchery brown trout of the Atlantic lineage, which have been stocked in the wild for decades, hybridizing with native individuals. According to recent genetic tests, hybrids prevail in the vast area of brown trout range, whilst native purebreds are confined only to some upper isolated reaches of small streams. So far, nine apparently non-introgressed (genetically "pure", pristine) populations were detected, most of them found in the Drava river system in Slovenian Carinthia; all of these populations have very low genetic diversity and small effective population size (N_e) indicating their low evolutionary potential, for which these populations are not recommended to be used as a source for brown trout repopulation across its entire range in Slovenia.

The goal of this investigation is to invent a proper strategy for native brown trout rehabilitation in Slovenia, of which the main objective is to identify additional genetically pristine sources of brown trout in order to provide sufficient genetic diversity needed for brown trout repopulation. We also aim to determine if geographically specific genetic pools of brown trout, that should not to be mixed but rather managed separately, exist in Slovenia. In addition, we also tend to study the impact of different environments (wild vs. hatchery) on brown trout selection. On the basis of obtained results, we wish to suggest guidelines for brown trout repopulation in Slovenia.

Brown trout were sampled in 80 locations (ca. 20 individuals per location) in 20 angling clubs across the Sava and Drava river systems. Most of the populations considered as genetically pristine in previous investigation, three genitor stocks and three hatchery Atlantic reference populations were also included in the investigation.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) on mtDNA control region, 15 neutral microsatellite loci and three microsatellite loci with apparently adaptive value were analyzed. Introgression with non-native genes was assessed at the individual and population level; populations were tested for genetic diversity, effective population size, structure and inter-population differentiation. Data analysis was conducted using programs Genetix, Populations, FSTAT, STRUCTURE in STRUCTURE Harvester.

The populations were, regarding the presence of Danubian and Atlantic genetic proportion in mitochondrial and nuclear DNA, sorted in five groups: (i) with very high Danubian proportion (100% mtDNA, $\geq 96\%$ nDNA), 17 populations, (ii) with high Danubian proportion (100% mtDNA, 90 do 95% nDNA), seven populations, (iii) with fair Danubian proportion (100% mtDNA, 84 do 89% nDNA), four populations, (iv) with moderate Danubian proportion (100% mtDNA, 60 do 80% nDNA), 19 populations, (v) highly introgressed ($> 50\%$) with Atlantic genes. Genetic diversity and effective population size were on average very low, whilst the data for the first two groups show extremely low levels: $H = 0.125$ to 0.350 ; $A = 1.42$ to 3.18 ; 1.2 haplotype per population; $N_e = \text{ca. } 2\text{-}20$). For the first three groups, F-statistics and PCA revealed very high inter-population differentiation ($F_{st} = 0.52$), supported with extremely high pairwise F_{st} values (up to 0.81). Population structure analysis revealed five relatively homogeneous genetic and geographically rounded units: (1) Bohinj area, (2) Tržiška Bistrica river system, (3) Sora river system, (4) Savinja river system and (5) Mislinja river system; the rest six locations (single isolated streams) represented independent and much differentiated genetic groups. Analysis of different environmental impact on brown trout selection pointed out proportionate share of allelic richness between neutral and adaptive loci in wild populations, while in hatchery populations this ratio was in favor to allelic richness of neutral loci suggesting that in hatchery, certain alleles of adaptive loci are affected by negative selection. Analysis of offspring survival in hatchery showed that this trait was significantly influenced by male origin; in the stage of eyed eggs, the eggs fertilized with the wild males were the most viable, while in the stage of fry, the highest survival rate was recorded in a group fertilized by hatchery males.

As all the populations with high or very high native genetic share have extremely low genetic diversity and N_e , we reckon that despite higher number of genetically pristine populations comparing to previous study, their evolutionary potential is still not high enough to use them for extensive repopulation of brown trout in Slovenia; rather, they should be used only locally. Using neutral genetic markers, we proved specific genetic profiles for most populations. If this diverse pattern of genetic and consequently also phenotypic heterogeneity is to be conserved, the local populations will need to be managed separately. To restore brown trout in Slovenia, it should be vital to find additional sources of genetically acceptable local genitors, which would provide sufficient genetic diversity and adaptiveness, and assure perseveration of locally specific phenotypes. This can only be achieved by using local fish. We think that it is better to use local material even if it is partially introgressed; by doing so the remaining native genes with local adaptive value and with ability to express local phenotypes would be preserved.

We suggest the brown trout range in Slovenia to be divided into several reasonable districts representing the basic management units. Within each district, the best genitor material would be selected directly from the hybridization zone on the basis of genetic test and combined with non-introgressed populations (where available) to establish female genitor stocks with acceptable native genetic share. For egg fertilization, genetically appropriate males would be annually selected from the wild. The level of acceptable non-native genes would depend on specific circumstances within a fishing district or angling club. To protect non-introgressed populations, we suggest making their copies, which should be then introduced into neighboring fishless streams. The propagation of local genetic pools has also a repopulation meaning as downstream directed gene-flow gradually refreshes the introgressed genomes by replacing non-native genes with the local ones.

1 UVOD

Postrvi (*Salmo* sp.) so glede na porečja, od koder izvirajo, in glede na genetski profil mitohondrijske DNA (mtDNA) v grobem razvrstili v pet osnovnih razvojnih ali t.i. filogeografskih linij: v atlantsko, donavsko, jadransko, sredozemsko in linijo *marmoratus* (Bernatchez, 2001). Atlantsko linijo so na Zahodu domesticirali že pred ca. 150 leti. Ta domesticirana linija v ribogojniških razmerah dobro uspeva, medtem ko se zaradi selekcije na ribogojniško okolje v divjem okolju slabo prilagodi. Ogroženost avtohtonih potočnih postrvi, zaradi njihovega genetskega mešanja z ribogojniško atlantsko linijo, je v Evropi poznana že več desetletij. Ribogojci in ihtiologi opažajo, da je poribljanje odprtih voda z domesticirano linijo dokaj neučinkovito in škodljivo: več kot 90% vloženih rib se namreč ne uspe prilagoditi in propade (Weiss & Schmutz, 1999; Wills, 2006), tiste, ki se uspejo drstiti, pa svoje »slabe« gene zanesejo v avtohtone populacije, ki na tak način slabijo in izgubljajo svojo lastno genetsko identiteto (t.i. depresija zaradi »outbreeding-a«; Hansen & Loeschcke, 1994). Poleg tega domesticirana linija odraža značilen zunanji videz, ki je genetsko pogojen in ki skozi proces križanja popači originalno podobo avtohtone populacije (Slika 1).



Slika 1: Značilen zunanji videz domesticirane linije atlantske potočne postrvi (zgoraj) in divje avtohtone potočne postrvi iz zgornjesavskega porečja.

Tudi slovenske reke so bile podvržene mnogim zabeleženim in nezabeleženim vnosom neavtohtonih postrvi. Tako so potočne postrvi atlantskega porekla (iz Danske in Italije) od 80-ih let prejšnjega stoletja pa do nedavnega masovno vlagali v donavski rečni sistem.

S škodljivimi vplivi domesticirane atlantske postrvi na domače potočnice smo se v Sloveniji soočili šele v 90-ih letih prejšnjega stoletja. Genetsko mešanje med domačimi populacijami in vnesenimi osebki je bilo prvič opaženo l. 1997 na potočnicah iz spodnje lške in Cerknicišice (Snoj, 1997).

Nadaljnje genetske raziskave na potočnih postrvih v Sloveniji, ki so potekale v okviru treh diplomskih nalog (Jug, 1998; Melkič, 2000; Bogataj, 2010), v okviru projekta CRP (2008 – 2010), in avstrijsko-slovenskega projekta »Karafish« (l. 2012; Konar *et al.*, 2013) so vključevale nove oz. izboljšane metodološke pristope in 61 vzorčnih lokacij (Snoj, 2004; Snoj *et al.*, 2015), od katerih je bilo le devet takih z avtohtonim genetskim deležem 95% in več (t.i. genetsko »čiste« populacije). Vse so omejene na izolirane, težko dostopne zgornje tokove manjših pritokov. Večina genetsko čistih populacij je bila odkrita v dravskem porečju na slovenskem Koroškem. Vse čiste populacije imajo zelo nizko efektivno velikost in zelo nizko genetsko pestrost (poprečno število alelov na lokus $A = \text{ca. } 2.8$; heterozigotnost $H = \text{ca. } 0.36$; Jug *et al.*, 2005; Snoj *et al.*, 2015), kar kaže na njihov nizek evlucijski potencial. Glede na to in ker čiste populacije zastopajo le manjši del areala potočne postrvi v Sloveniji, le-te niso primerne, da bi z njimi repopulirali celotno območje Slovenije; zaradi nizkega evlucijskega potenciala je namreč vprašljiva njihova sposobnost prilagajanja na različna okolja, poleg tega obstaja nevarnost, da bi z njihovim prenosom v druga območja ogrozili genetsko integriteto tamkajšnjih lokalnih populacij.

Poleg negativnih učinkov, ki jih za avtohtone potočne postrvi v Sloveniji predstavlja vnašanje atlantske ribogojniške linije, se je treba zavedati, da do prilagojenosti na ribogojniško okolje in neprilagojenosti na življenje v divjini lahko ob neustreznem gospodarjenju hitro pride tudi pri domorodnih donavski postrvih, predvsem kadar proizvodnja zaroda temelji na plemenski jati, ki se jo dolgoročno ohranja v ribogojnici in ki se je ne obnavlja z materialom iz divjine. Selekcija na ribogojniško okolje se še dodatno povečuje z zadrževanjem zaroda v ribogojnicah. Poleg selekcije igra pomembno vlogo tudi efekt ozkega grla, do katerega pride, kadar se populacija močno zmanjša; ta efekt, ki je pogost v ribogojnicah, kjer plemensko jato predstavlja le nekaj rib, povzroči padec genetske pestrosti zaroda in s tem dodatno zmanjša njegovo sposobnost za preživetje v divjini.

Osnovni cilj raziskave je najti primerno strategijo za rehabilitacijo avtohtone potočne postrvi v Sloveniji.

To pomeni, da je potrebno najti ustrezen plemenski material, ki bo proizvajal potomce, primerne za repopulacijsko vlaganje.

Da bi bili potomci za repopulacijo čim bolj sposobni prilagajanja na različna okolja njihovega izpusta, bi morali vzpostaviti dosti širok nabor po poreklu ustreznega plemenskega materiala, (vir potomcev za repopulacijo), ki bi imel čim višjo genetsko pestrost. **To bi bilo možno doseči predvsem z identifikacijo večjega števila dodatnih genetsko čistih populacij, kar je tudi poglavitna naloga te raziskave.** Višjo genetsko pestrost je mogoče doseči tudi z odbiranjem genetsko ustreznih osebkov, ulovljenih v coni križanja, in z njihovimi spolnimi celicami osvežiti zarod, namenjene za repopulacijo.

Hkrati je treba biti pozoren, da ne bi vneseni osebki negativno interferirali z lokalnimi populacijami. **Zato smo v raziskavi ugotavljali tudi, ali obstajajo teritorialno specifični genetski »pooli«, s katerimi bi bilo potrebno oddvojeno upravljati in jih medsebojno ne mešati.**

Poleg omenjenega **je bil naš namen pričeti z genomskimi asociacijskimi študijami**, ki predstavljajo novo orodje za identifikacijo adaptivnega genetskega ozadja intraspecifičnih organizmov, **ki so prilagojeni na različna okolja.** V ta namen smo zasnovali poskus, katerega namen je bil ugotavljati, **ali različno okolje vpliva na genetsko strukturo in preživitveno sposobnost postrvi.** Za primerjavo smo izbrali dva ekstremna okolja, ribogojnico in naravni potok.

Na osnovi dobljenih rezultatov **načrtujemo izdelati priporočila in predloge ukrepov za obnovo populacije avtohtone potočne postrvi.**

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Material

Pri izbiri potencialnih lokacij z genetsko čisto potočnico smo se glede na lastne izkušnje osredotočili predvsem na tiste odseke potokov,

- kjer so si bile postrvi v določenem velikostnem razredu podobne po zunanjem videzu (obarvanost in oblika telesa). Če so bili osebki iz določenega potoka že na videz zelo različni, smo to smatrali kot precej zanesljivo znamenje, da populacija ni genetsko homogena.
- ki so bili od spodnjega toka razmejeni s pregrado (slap, zajetje, elektrarna...), ki trajno preprečuje prehod rib iz spodnjega toka navzgor. Upoštevali smo predvsem prepreke, starejše od 30 let (vnašanje atlantske postrvi se je v Sloveniji začelo v začetku osemdesetih let prejšnjega stoletja)
- ki so tako odročni, da od izvira do pregrade k potoku ne vodi lahko dostopna, urejena avtomobilska pot oz. da je vlaganje rib na takem odseku fizično težko izvedljivo
- za katere ni katastrskih podatkov, da so bili kadar koli poribljani.

Glede izbire lokacij smo upoštevali tudi mnenje lokalnih ribičev, saj nekateri v domačem okolju spremljajo ribe že desetletja in so zelo dober vir informacij o vlaganjih in morebitnih nahajališčih čistih potočnih postrvi.

Po teh kriterijih smo v okviru savskega in dravskega rečnega sistema v Sloveniji povzročili 80 lokacij, kar predstavlja 20 ribiških družin (Tabela 1) in v grobem pokriva v savskem porečju rečne sisteme zgornje Save (nad Kranjem), Sore, Ljublanice in Savinje, v dravskem pa rečne sisteme Meže, desnih pritokov med Radljami in Rušami in sistem Dravinje (Tabela 1, Slika 3). Omenjeni kriteriji niso bili izpolnjeni v pritokih spodnje Save, Krke in Kolpe, zato teh sistemov ni zajetih v pričujoči raziskavi.

Na vsaki izbrani lokaciji smo z elektro-izlovom naključno odlovili ca. 20 osebkov. Dejansko število je nihalo zaradi razpoložljivosti rib v konkretnem potoku.

V analizo smo zaradi metodološkega poenotenja vključili tudi večino populacij, ki smo jih kot genetsko sprejemljive prepoznali v raziskavi, ki je potekala od 1.1.2008—31.8.2010 v okviru projekta CRP V4-0538.

V treh primerih smo v analizo vključili tudi plemensko jato, prav tako po ca. 20 vzorcev.

Poleg tega smo v analizo vključili tudi tri referenčne populacije atlantskih potočnih postrvi iz danske in češke ribogojnice ter iz ribogojnice Povodje v Sloveniji.

Vse ribe, vključene v raziskavo, smo anestezirali, vsakemu osebku smo odrezali ca. 0.75 cm² velik košček analne plavuti in ga za namen genetske analize individualno shranili v 70% etanolu. Postrvi iz vsake divje lokacije smo foto-dokumentirali. Vse osebke smo po obravnavi in rekuperaciji vrnili na mesto izlova.

Tabela 1: Lokacije vzorčenja potočnih postrvi. Poševno so označene lokacije iz predhodne raziskave.

Območje	Zap. št.	Vodotok	Y	X	Datum
Plemenske jate	1	Ribogojnica Ljubno	-	-	CRP V4-0538
	2	Ribogojnica Povodje	-	-	CRP V4-0538
	3	Ribogojnica Železniki	-	-	-
Referenčne populacije Atlantske linije	4	Avstrija - Jezerke (AT)	-	-	-
	5	Cerkniščica (AT)	-	-	-
	6	Češka (AT)	-	-	-
	7	Danska (AT)	-	-	-
	8	Podbreg - Volarja - Soča (AT)	397112	121926	9.1.2015
	9	Zgornja Ložnica - Savinja - Sava (AT)	507166	127262	CRP V4-0538
RD Barje	10	Granjevica - Želimeljščica - Iščica	469612	80795	20.2.2015
	11	Iška - Ljubljanska – Sava (zgornji tok)	461907	78225	11.8.2015
	95	Iška - Ljubljanska – Sava (pri Domu)	461347	85193	17.7.2015
	96	Iška - Ljubljanska – Sava (pri Kamnu)	460971	83414	5.6.2015
	12	Pojaščica - Benšetov graben - Želimeljščica	466171	83993	2.3.2015
	13	Šumnik - Granjevica - Želimeljščica - Iščica	467564	80943	20.2.2015
	14	Zala - Iška - Ljubljanska - Sava	458019	80788	2014
RD Bled	15	Jezernica - Sava Dolinka	430783	135125	CRP V4-0538
	16	<i>Vlaganje Bled</i>	-	-	CRP V4-0538
RD Bohinj	17, 18	Ribnica - Mostnica - Sava Bohinjka	416681	130310	19.9.2016
	19	Suha - Sava Bohinjka	413971	125076	CRP V4-0538
RD Cerknica	20	Hruškarski potok - Cerkniško jezero	457097	77180	CRP V4-0538
	21, 22, 23	Mahnečica - Cerkniščica	455967	74244	30.9.2015
RD Dolomiti	24	Jernejčkov graben - Velika Božna - Gradaščica	440409	101346	23.4.2015
	25	Kolarica - Jernejčkov graben - Velika Božna	440962	102437	23.4.2015
	26	Kotarjev graben - Horjulka - Gradaščica	453249	99493	13.11.2015
RD Jesenice	27	Jerman - Sava Dolinka	411242	150238	11.6.2015
	28	Krotnjek - Sava Dolinka	404630	152193	11.6.2015
	29	Potok Martuljek - Sava Dolinka	410678	148625	11.6.2015
	30	Triglavska Bistrica - Sava Dolinka	417438	145433	11.6.2015
RD Koroška	31	Bistra - Meža - Mislijna - Drava	483991	144365	CRP V4-0538
	32	Glažuta - Izvirni del Mislinje - Drava	522176	148524	12.10.2016
	33	Koprivna - Meža - Drava	479396	148109	2013
	34	Koroška kramarica - Javorski potok - Meža - Drava	491376	144218	12.10.2016
	35	Meža - Drava	484739	146719	2013
	36	Bistra (izvirni del) - Meža - Mislijna - Drava	482699	143927	12.10.2016
	37	Podgorica - Jazbinski potok - Meža - Drava	493942	149138	12.10.2016

Območje	Zap. Št.	Vodotok	Y	X	Datum
	38	Šentanelski potok - Meža - Mislinja - Drava	490300	160754	12.10.2016
	39	Suhadolnica- Mislinja	499703	147384	CRP V4-0538
	40	Zelenobreški potok - Meža - Mislinja- Drava	494804	160226	12.10.2016
RD Kranj	41	Nemiljščica - Sava	439499	123642	CRP V4-0538
RD Ljubno	42	Gračnica - Savinja - Sava	490597	132646	11.10.2016
	43	Jurčef - Savinja	476752	142848	2013
	44	Kozlov graben - Krumpah - Ljubnica	489933	139854	11.10.2016
	45	Krumpah - Ljubnica - Savinja - Sava	490037	138894	11.10.2016
	46	Revsov graben - Savinja - Sava	485215	137592	11.10.2016
	47	Robanšek - Krumpah - Ljubnica	488729	140354	11.10.2016
RD Medvode	48	Malešnica - Sava	452853	108016	CRP V4-0538
RD Mozirje	49	Kramarica - Ljubija - Savinja - Sava	494578	141707	7.10.2016
	50	Leskovšek - Ljubija - Savinja - Sava	493885	139670	7.10.2016
RD Radovljica	51, 52	Begunjščica (desni krak) - Zgoša - Sava	440528	139776	7.9.2016
	53	Močilnik - Lipnica - Sava	440328	127565	12.6.2015
RD Radlje	54	Josipdolski potok - Velka - Drava	522712	152350	13.10.2016
	55	Kapusov potok - Drava	529028	158387	CRP V4-0538
	56	Krajnica - Velka - Drava	524344	153102	13.10.2016
	57	Vaški potok - Drava	521293	162026	13.10.2016
RD Ribnica	58	Črni graben - Robarica - Rašica	466837	79333	14.5.2015
	59	Kozariščica - Kozmanjka - Rašica	466977	74740	14.5.2015
	60	Lehnjak - Robarica - Rašica	466558	77080	14.5.2015
RD Ruše	61	Piklarica - Lobnica - Drava	532470	146704	5.10.2016
	62	Pritok Lamprehtovega potoka - Radoljna - Drava	532706	150729	5.10.2016
	63	Verna - Lobnica - Drava	535592	148860	5.10.2016
RD Sl. Bistrica	64	Izvir Dravnije - Drava	526815	143872	CRP V4-0538
	65	Resniški potok - Dravinja - Drava	527847	143788	CRP V4-0538
RD Sora	66	Bodoljska grapa - Poljanska Sora	443668	108230	12.11.2015
	67	Gabrški potok - Poljanska Sora	442038	110862	12.11.2015
	68	Petruzova grapa - Poljanska Sora	440562	110235	12.11.2015
	69	Pevenski potok - Selška Sora	446319	116647	19.5.2016
	70	Planica - Starološki potok - Selška Sora	445704	116307	19.5.2016
	71	Sopotnica - Poljanska Sora	441413	112603	12.11.2015
	72	Sovpot - Poljanska Sora	441223	107372	12.11.2015
	73	Žabnica (B.s.) - struga Reteče - Selška Sora	450415	113372	19.5.2016
	74	Zaplotnica - Poljanska Sora	444885	112680	12.11.2015
RD Tržič	75	Dovžanka - Tržiška Bistrica - Sava	449659	140456	14.9.2016
	76	Košutnik - Tržiška Bistrica - Sava	453931	141580	14.9.2016

Območje	Zap. Št.	Vodotok	Y	X	Datum
	77	Mošenik - Tržiška Bistrica - Sava	444247	141382	CRP V4-0538
	78	Stegovnik - Tržiška Bistrica - Sava	454347	139540	14.9.2016
	79	Zali potok - Tržiška Bistrica - Sava	451787	141504	14.9.2016
RD Visoko	80	Gabrška grapa - Poljanska Sora	438907	110133	27.5.2016
	81	Prileški potok (preleški) - Sovpaščica - Brebovščica - Poljanska Sora	436735	103546	27.5.2016
	82	Sevniščica - Ločivnica - Poljanska Sora	436040	112452	27.5.2016
	83	Srednska Grapa - Poljanska Sora	434862	109166	27.5.2016
RD Vrhnika	84	Hlevščica - Podliščica - Ljubljanica	439660	95902	2013
	85	Pečnikarca - Podlipščica - Ljubljanica	440335	94905	28.1.2015
RD Železniki	86, 87	Desni pritok - Zala - Davča - Selška Sora	429291	116062	20.5.2016
	88	Jahodnica - Selška Sora	437118	115539	CRP V4-0538
	89	Muštrova grapa (Osojnik) - Davča - Selška Sora	432308	116174	20.5.2016
	90	Plenšak - Selška Sora - Sora - Sava	431518	120479	20.5.2016
RD Žiri	91	Plastuhova grapa - Račeva - Poljanska Sora	433620	101303	28.9.2016
	92	Raskovec - Žirovnica - Poljanska Sora	430161	95633	28.9.2016
	93	Poljanska Sora	433883	95864	CRP V4-0538
	94	Radovna - Sava Dolinka	421552	142990	CRP V4-0538

2.2 Metode

2.2.1 Genetske analize

2.2.1.1 Analiza mitohondrijske DNA

Analiza mtDNA je potekala na osnovi številnih linijsko specifičnih točkovnih polimorfizmih (SNP) na kontrolni regiji mtDNA, kar se je v preteklih študijah pokazalo kot najprimernejši način za razčlenitev filogeografske strukture preučevanih populacij postrvi (e. g., Bernatchez, 2001). Ta pristop je bil primeren tudi kot prvi kriterij za ugotavljanje genetske kontaminiranosti avtohtonih populacij z geni vnesenih osebkov (atlantska linija potočne postrvi ali soška postrv).

Pri vseh vzorčenih ribah smo celotno kontrolno regijo mtDNA analizirali z genotipizacijo, ki je temeljila na alelni specifičnem PCR-pomnoževanju. V ta namen smo uporabili diagnostični protokol (Apostolidis *et al.*, 2007), ki omogoča ločevanje med zgoraj omenjenimi linijami potočne postrvi. Linijsko specifične PCR-profile smo prepoznavali s kapilarno elektroforezo (ABI 3100XL). Podroben postopek je opisan v Apostolidis *et al.*, 2007. Populacijam, ki so se pokazale kot genetsko sprejemljive, smo določili celotno nukleotidno zaporedje kontrolne regije mtDNA po Sangerjevi metodi in na ta način določili mitohondrijske haplotipe. Ta analiza je vključevala ca.

šest vzorcev na populacijo, konkretno število je bilo odvisno od tega, kako polimorfna je bila določena populacija. Glede na to, da v prehodnem projektu V4-0538 pri genetsko čistih populacijah nismo določali haplotipske strukture, smo v analizo nukleotidnih sekvenc mtDNA vključili tudi te populacije.

2.2.1.2 Analiza genomske DNA

V populacijskih študijah potočne postrvi, ki so jih izvajali v Evropi, je bilo osnovanih veliko mikrosatelitnih lokusov, od katerih so nekateri nevtralni in linijsko specifični (Lerceteau-Köhler & Weiss, 2006; Keenan *et al.*, 2013; Scheneker *et al.*, 2014), drugi pa so vezani na določene genske segmente, ki preko izražanja specifičnih genetskih variant proteinov ali preko regulacijskih funkcij vplivajo na različne fenotipske lastnosti (Meier *et al.*, 2011).

Nevtralni mikrosateliti

Za ugotavljanje genetskega deleža donavske in atlantske linije za posamezen osebek, za ugotavljanje genetske podobnosti oz. različnosti med populacijami (F-statistika, PCA analiza) ter za genetsko analizo strukture populacij (heterozigotnost, alelna pestrost, F-statistika) smo uporabljali 12 nevtralnih in med seboj nepovezanih mikrosatelitnih lokusov (Scheneker *et al.*, 2014). Z njimi smo analizirali vse vzorčene ribe.

Obdelavo podatkov smo izvajali s programi Genetix, Populations, FSTAT, STRUCTURE in Structure Harvester.

Mikrosateliti z adaptivno vrednostjo

Z vidika ugotavljanja primernosti osebkov za sonaravno ali ribogojniško vzrejo so potencialno informativni tisti mikrosatelitni lokusi, ki so funkcijsko ali fizično povezani z geni, ki vplivajo na adaptivne lastnosti. Geni poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) razreda I in II, ki imajo v okviru celične imunosti ključno vlogo pri prepoznavanju antigenov, so bistveni za imunski odziv in imajo zato neposreden vpliv na fitnes živali; so izjemno polimorfni in imajo precej zapleteno strukturo (Bernatchez & Landry, 2003; pregledni članek). Zato vpliv selekcije na te gene včasih raje preučujejo posredno preko markerjev (e.g., mikrosateliti), ki ležijo zelo blizu MHC genov ali celo na njihovih neprepisovanih odsekih, in se zato z njimi vezano dedujejo. Geni MHC in predvsem z njimi vezani markerji so se v zadnjem času uporabljali za ugotavljanje adaptivnih lastnosti tudi pri potočni postrvi (e.g. Coughlan *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2008; Meier *et al.*, 2011; O'Farrell *et al.* 2013). V teh študijah so analizirali zlasti mikrosatelitni lokus UBA, ki leži v MHC kompleksu v intronu gena UBA. Na podoben posreden način so preučevali tudi gene, ki fizično sicer ne spadajo v MHC kompleks, so pa funkcionalno z njim povezani, kot npr. geni TAP, ki imajo vlogo pri prehodu kompleksov antigen-MHC molekula iz endoplazmatskega retikuluma v citoplazmo. Tudi ti geni so pomembni za učinkovitost imunskega odziva in torej

za fitnes živali. Tudi v njihovi bližini se nahajajo mikrosatelitni lokusi, preko katerih naj bi bilo mogoče spremljati spremembe na genih TAP v odnosu do prilagojenosti živali na okolje.

Med kandidatnimi mikrosatelitnimi lokusi z domnevno adaptivno vrednostjo smo na vseh vzorčenih ribah analizirali sledeče:

- Satr-UBA (Coughlan *et al.* 2006)
- Satr-TAP2b (Grimholt *et al.* 2002)
- Ssa60NVH (Gharbi *et al.*, 2006)

Mikrosatelitne lokuse smo pomnožili s polimerazno verižno reakcijo (PCR) in dolžino pomnoženih alelnih fragmentov ugotavljali na sistemu kapilarne elektroforeze (ABI 3100XL).

2.2.2 Poskus preučevanj vpliva okolja na selekcijo alelov z adaptivno vrednostjo

Zgornjesavsko porečje

Seme smo odvzeli samcem iz treh populacij: Suha RD Bohinj, Mošenik RD Tržič in Malešnica RD Medvode in sicer po osem osebkov na populacijo. Samci iz prvih dveh lokacij so bili vzeti neposredno iz divjine, medtem ko so bili »samci iz Malešnice« dejansko vzrejeni v ribogojnici in predstavljajo F1 generacijo, ki je produkt križanja divjih samcev in samic iz Malešnice. S semenom vseh samcev smo oplodili 60 samic (potomke samic iz potoka Hudi potok in samcev iz potoka Suha) iz ribogojnice RD Bled.

Vsaki samici smo odvzeli čim bolj enako število iker (ca. 800). Nato smo podoben delež iker (ca. 100 iker) vsake samice oplodili s semenom vsakega izmed samcev. Tako smo od 3x8 samcev in 3x20 samic dobili 480 kombinacij teoretičnih skupin potomcev.

Vsem staršem v poskusu smo odvzeli genetski vzorec za DNA analize.

V fazi oči smo približno 7.000 oplojenih iker združili v enotno skupino in jih vložili v pet umetno pripravljenih drstnih jam v Bitenjski potok (ZZRS), ki nima nadzemnega stika z glavno reko Savo Bohinjko, in kjer so za namen tega poskusa predhodno odlovili lokalno prisotne postrvi.

Drugo polovico iker smo obdržali v valilnikih ribogojnice RD Bled.

Soško porečje

Vzporedno smo poskus izvajali na populaciji atlantske potočne postrvi. Za poskus smo uporabili populacijo, ki naseljuje zgornji tok (nad neprehodnim slapom) potoka Podbreg, ki je pritok potoka Volarja, ki teče v Sočo med Kobaridom in Bovcem, torej izven naravnega areala potočne postrvi v Sloveniji. S to populacijo ne upravljajo in je relikvint introdukcije potočne postrvi v areal soške postrvi v začetku prejšnjega stoletja.

Za poskus smo 24 samicam odvzeli cca. 4200 iker in seme 10 samcem. Ikre smo zmešali, jih razdelili na enake deleže ter vsak delež oplodili s semenom po enega samca.

Ribe so tekom poskusa rasle bazenih ribogojnice RD Tolmin in podjetja Faronika d.o.o.

Vzorci za DNA analize smo jemali po razporedu, kot je razvidno preko Tabele 2.

DNA analize so vključevale genotipizacijo s setom nevtralnih mikrosatelitov in tistih z adaptivno vrednostjo.

Tabela 2: Skupine v selekcijskem poskusu

RD Bled	Okolje	Lokacija	N (genotipizacija)	Datum vzorčenja
Potomci F1	Divjina	Potok Bitenj	47	11. 11. 2015
			39	24. 1. 2017
	Ribogojnica		3 x 20	24. 7. 2015
			60	17. 2. 2016
			20 zdravih; 20 plesnivih	27. 12. 2016
RD Tolmin				
Starši	Divjina	Potok Podbreg	66	25. 11. 2015
Potomci F1	Ribogojnica		44	22. 7. 2016
			40	16. 1. 2017

Vpliv selekcije na adaptivne lokuse smo neodvisno od poskusa ugotavljali tudi z analizo alelne pestrosti (A), pri čemer smo primerjali alelno pestrost ribogojniških atlantskih populacij z alelno pestrostjo prvih dveh skupin populacij z visokim avtohtonim genetskim deležem.

3 REZULTATI

Med 80 vzorčenimi lokacijami postrvi v desetih postrvi nismo našli. Gre za lokacije v ribiških družinah Vrhnika, Barje in Dolomiti.

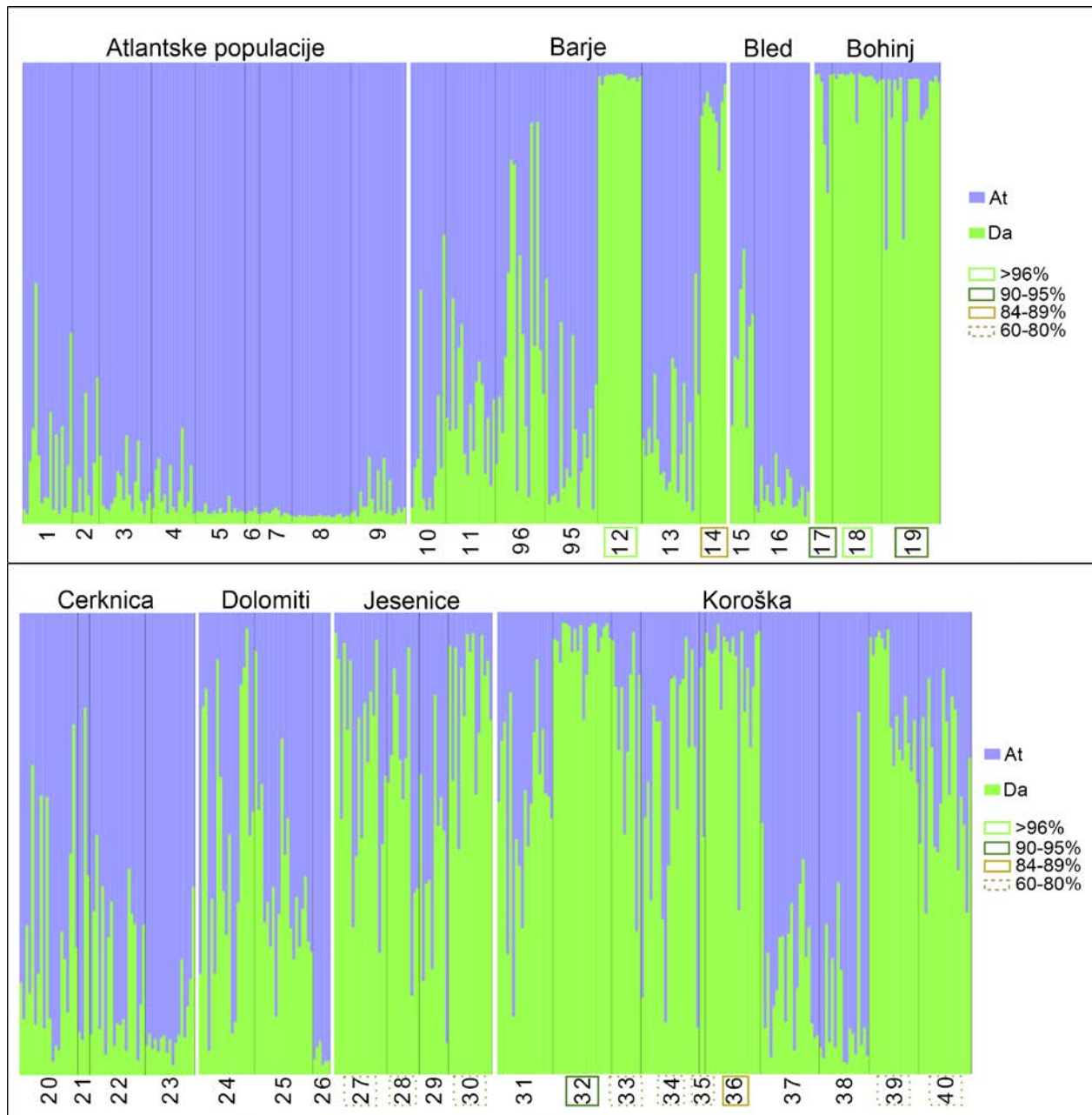
3.1 Razporeditev populacij glede na avtohtoni genetski delež

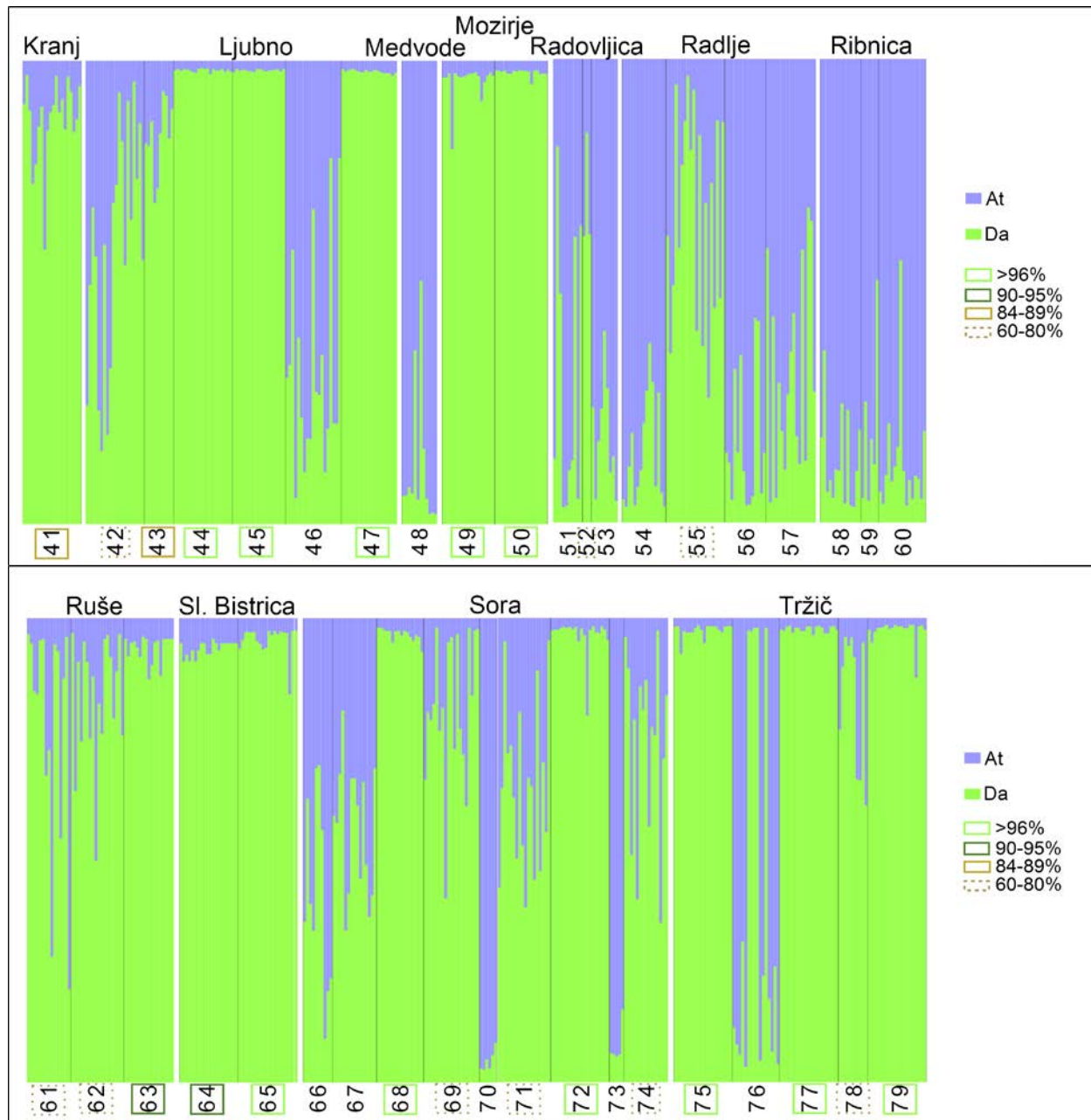
Glede na alelno specifično analizo mitohondrijske DNA smo za vsak vzorec določili, ali pripada donavski ali atlantski filogenetski liniji. Med 70 analiziranimi divjimi populacijami smo 100% donavski genetski delež našli pri 45 populacijah. Nizek donavski delež smo našli pri populacijah Vrh_Pečnikarca (10%), Vis_Prileški potok (20%), Kor_Podgorica (30%), Bar_Granjevica (33%) in Rib_ČrniG; pri vseh ostalih populacijah pa se je ta vrednost gibala nad 50% (Tabela 3).

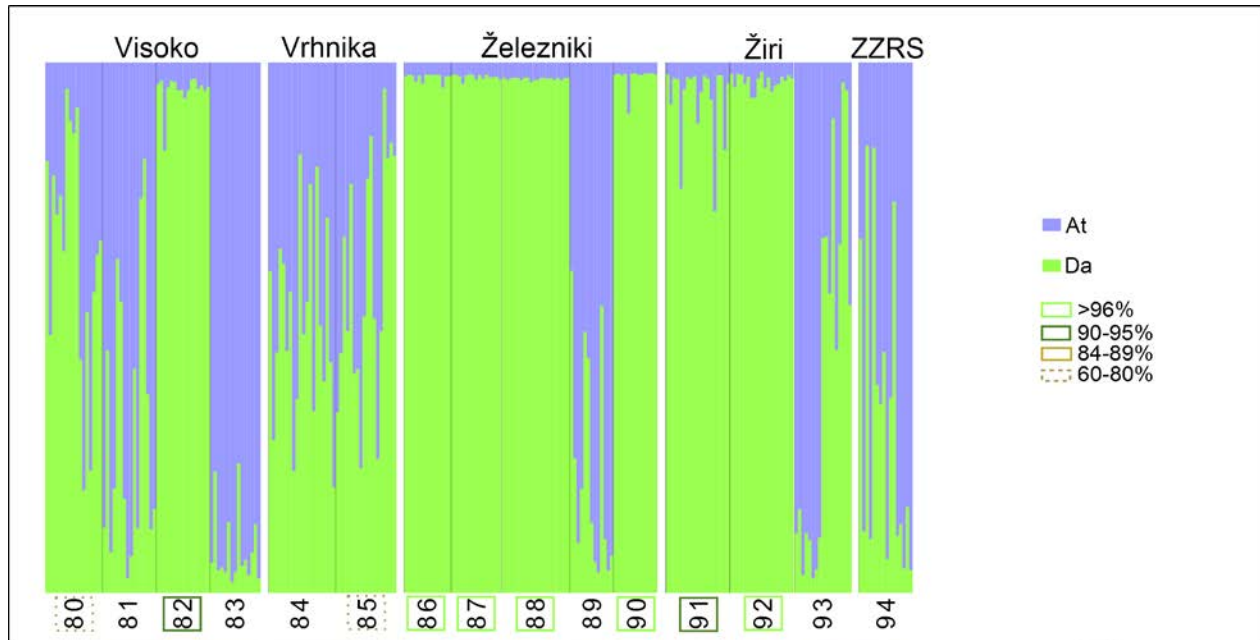
Donavski haplotipi, ki smo jih našli v slovenskih populacijah, ne odražajo značilne regijske razporeditve. To je očitno že na ravni savski vs. dravski rečni sistem kot tudi na bolj specifični ravni.

Tudi analiza jedrne DNA (nDNA) je pokazala, da areal potočne postrvi v Sloveniji naseljujeta dve genetski liniji in sicer avtohtona donavska in atlantska (Slika 2).

Z računalniškim programom Structure 2.3.4 smo določili genetski delež donavske in atlantske postrvi za vsak posamezen osebek in izračunali poprečen genetski delež za posamezno populacijo (Slika 2, Tabela 3). Upoštevati je treba, da računalniški algoritem deluje tako, da tudi povsem genetsko neoporečen osebek ne doseže 100% čistosti ampak 2 do 4 odstotke manj.







Slika 2: Rezultati STRUCTURE analize vzorčenih populacij z donavskimi in atlantskimi genetskimi deleži (K=2)

Populacije smo glede na prisotnost donavskega in atlantskega genetskega deleža mitohondrijske in jedrne in DNA razvrstili v pet skupin:

I. Populacije z **zelo visokim** donavskim genetskim deležem (**100% mtDNA, $\geq 96\%$ nDNA**). Takih je 14 (Tabela 3) in sicer:

1. Bar_Pojaščica (12)
2. Boh_Ribnica Zg. (18)
3. Lju_KozlovG (44)
4. Lju_Krumpah (45)
5. Lju_Robanšek (47)
6. Moz_Kramarica (49)
7. Moz_Leskovšek (50)
8. Sor_PetrG (68)
9. Sor_Sovpot (72)
10. Trž_Dovžanka (75)
11. Trž_ZaliPotok (79)
12. Žel_DPZale (86)
13. Žel_Plenšak (90)
14. Žir_Raskovec (92)

Iz projekta V4-0538 se v to skupino uvrščajo:

- SloB_ResPO (Resniški potok) (65)
- Trž_Mošnik (77)
- Žel_Jahodnica (88)

Za populaciji Koprivna in Malešnica, ki sta se predhodno uvrstili kot populaciji z zelo visokim avtohtonim genetskim deležem, ni podatkov.

II. Populacije z visokim donavskim genetskim deležem (100% mtDNA, 90 do 95% nDNA):

15. Boh_RibnicaSp (17)
16. Kor_Glažuta (32)
17. Ruš_Verna (63)
18. Vis_Sevniščica (82)
19. Žir_PlastuhG (91)
20. Boh_Suha (19)

Iz projekta CRP V4-0538 se v to skupino uvršča:

- SloB_Dravja (Izvir Dravinje) (64)

III. Populacije s solidnim donavskim genetskim deležem (100% mtDNA, 84 do 89% nDNA), vendar so prisotni posamezni osebki, ki precej odstopajo od poprečja in s tem »kvarijo genetsko čistost« populacije.

Sem so se uvrstile samo populacije, ki so bile v predhodni raziskavi (V4-0538) prepoznane kot nadpovprečne glede zastopanosti avtohtonega deleža:

- Bar_Zala (14)
- Kor_Mislinja (36)
- Kra_Nemilj (41)
- Lju_JurčevPO (43)

IV. Populacije, ki imajo sicer **100% donavski genetski delež po mtDNA**, medtem ko se giblje donavski genetski delež po **nDNA okrog 60 do 80%**.

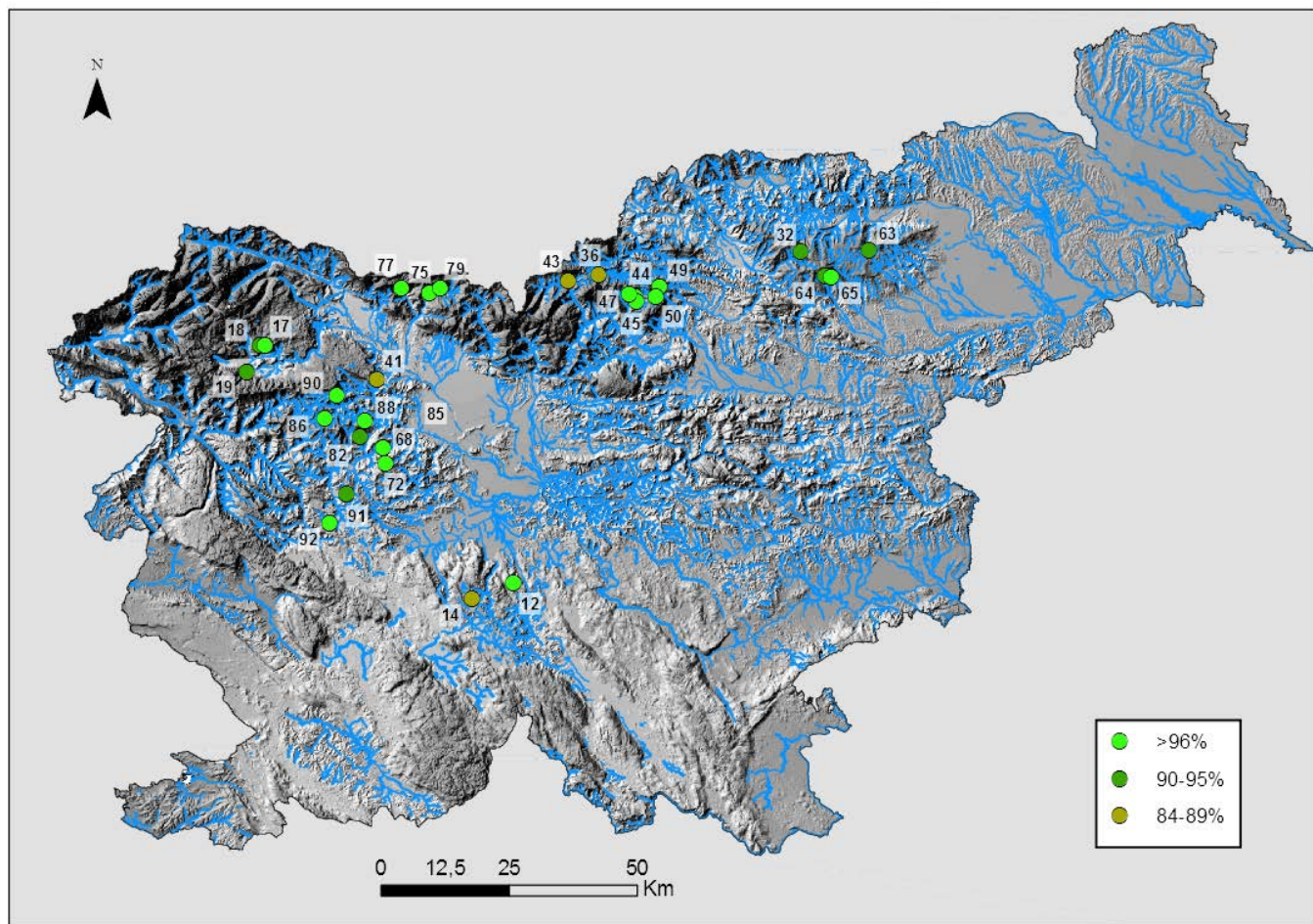
Značilnost teh populacij je, da so glede na donavski genetski delež precej heterogene, zaradi česar predstavljajo relativno dober material za odbiro ustreznih osebkov, temelječo na genetskem testu.

21. Jes_Jerman (27)
22. Jes_Krotnjek (28)
23. Jes_TriglBis (30)
24. Kor_KorKram (34)
25. Kor_ZelbreškiP (40)
26. Lju_Gračnica (42)
27. Rad_BegunjVel (52)
28. Ruš_Piklarica (61)
29. Ruš_PriLampP (62)
30. Sor_PevskiP (69)
31. Sor_Sopotnica (71)
32. Sor_Zaplotnica (74)
33. Trž_Stegovnik (78)
34. Vis_GabrG (80)
35. Vrh_Pečnikarca (85)

Populacije iz predhodne raziskave (V4-0538):

- Kor_Kop_Mež (33)
- Kor_Meža (35)
- Kor_Suhado (39)
- RadDR_KapuP (55)

V. Populacije, pri katerih je introgresija z **atlantskimi geni visoka (nad 50%)** in dokaj enakomerno razporejena. Pri teh populacijah je zelo težko oz. nemogoče najti posamezne osebkke z zadovoljivim donavskim genetskim deležem.



Slika 3: Zemljevid populacij potočne postrvi z donavskim genetskim deležem nDNA >84%

3.2 Genetska pestrost populacij

Analiza nukleotidne sekvence kontrolne regije mtDNA, ki smo jo izvajali na prvih štirih skupinah populacij, je razkrila devet mitohondrijskih haplotipov, od katerih štirje (slo1 – slo4) predhodno še niso bili opisani (Tabela 3). Najbolj zastopani haplotipi so Da1a (56%), slo1 (16%) in Da2a (12%), vsi ostali so bili zastopani v bistveno manjših deležih (od 2,5 do 0,5%).

Razporeditev haplotipov je bila v povprečju 1.26 haplotipa na populacijo, pri čemer nobena populacija ni imela več kot dva haplotipa. Ti podatki kažejo na zelo nizko genetsko pestrost testiranih populacij.

Genetsko pestrost posameznih populacij smo ocenjevali tudi z jedrno DNA. Ta se običajno ocenjuje glede na alelno pestrost (A; višja kot je njena vrednost, večja je genetska pestrost) in glede na heterozigotnost (H; vrednosti za heterozigotnost se gibljejo od 0 do 1, pri čemer 1 pomeni najvišjo stopnjo heterozigotov).

Omenjena parametra smo izračunali v programu FSTAT. Iz Tabele 3 je razvidno, da imajo populacije z visokim avtohtonim genetskim deležem praviloma zelo nizko genetsko pestrost; na primer, v prvi skupini (100% mtDNA, $\geq 96\%$ nDNA) se H giblje od 0.125 do 0.350, A pa od 1.42 do 3.18. Po nekoliko višjih vrednostih odstopa Mošenik (77; $H = 0.454$; $A = 3.42$), ki v okviru te skupine predstavlja največjo populacijo. Po drugi strani populacije z nižjim donavskim genetskim deležem (e.g. skupina z mtDNA donavskim deležem $< 100\%$), odražajo bistveno višje vrednosti: H od ca. 0.6 do 0.75 in A od ca. 3.7 do 9.0, kar je lahko sicer posledica introgresije.

Tabela 3: Populacijsko genetskih parametri vzorčenih populacij potočne postrvi; zaporedne številke se skladajo s Tabelo 1, Sliko 2, Sliko 3 in Sliko 4, Sliko 5, obenem pa so navedene okrajšave lokalitet. Podatki zajemajo rezultate analiz na mtDNA, nevtralnih jedrnih markerjih in adaptivnih jedrnih markerjih. *N*: število vzorcev, *Ne*: efektivna velikost populacije, *Da* %: donavski genetski delež, *He*: opažena heterozigotnost, *Fis*: koeficient inbreedinga, *A*: alelna pestrost. **Ne* statistično vprašljive vrednosti, z lila barvo obrobijene *Fis* vrednosti statistično signifikantno odstopajo od H-W ravnovesja

Lokalitete	Zap št.	N	Ne	Da %	haplotip	Da %	He	Fis	A	Da %	He	Fis	A
				mtDNA		Nevtralni jedrni markerji			Adaptivni jedrni markerji (MHC)				
Aqu_Ljubno	1	17	19,1 (11,2 - 42,6)	-		0,15	0,80	0,12	8,08	0,43	0,88	0,06	3,34
Aqu_Povodje	2	9	*47,1 (102 - *)	-		0,11	0,82	0,12	6,67	0,19	0,89	0,30	3,33
Aqu_Zelezniki	3	18	114,1 (44,2 - *)	-		0,08	0,77	0,01	8,50	0,23	0,88	0,01	3,32
AT_Autlez	4	15	2,1 (1,6 - 2,8)	-		0,08	0,64	-0,16	5,17	0,09	0,70	-0,01	2,68
AT_Cerkniscica	5	17	83,5 (17,2 - *)	-		0,03	0,67	0,16	5,36	0,06	0,70	-0,07	2,61
AT_Ceska	6	5	*10,8 (64,5 - *)	-		0,03	0,62	-0,05	3,58	0,10	0,77	-0,22	2,96
AT_Danska	7	11	59,3 (21,6 - *)	-		0,03	0,79	0,03	6,58	0,07	0,89	0,04	3,36
AT_Podbreg	8	20	11,4 (5,2 - 29,3)	-		0,02	0,50	0,00	3,08	0,05	0,59	-0,10	2,29
AT_ZgLoznica	9	19	16,4 (9,9 - 32,6)	75		0,05	0,76	0,09	7,67	0,29	0,82	0,24	3,12
Bar_Granjevica	10	12	18,2 (10,2 - 45,5)	33		0,18	0,79	0,07	8,25	0,44	0,86	0,07	3,25
Bar_Iska	11	17	19 (2,5 - *)	100	DA9, DA2a	0,25	0,35	0,09	2,83	0,28	0,59	0,37	2,22
Bar_Iska	95	18	42,3 (23,7 - 128,1)	-		0,18	0,75	0,18	7,67	0,27	0,84	0,18	3,14
Bar_Iska	96	17	7,4 (3,3 - 13,7)	-		0,42	0,62	0,17	5,58	0,20	0,68	0,09	2,56
Bar_Pojasnica	12	15	15,9 (1,3 - *)	100	DA1a	0,97	0,12	-0,27	1,42	0,98	0,30	-0,48	1,54
Bar_Sumnik	13	20	8,3 (6,3 - 10,8)	89		0,20	0,69	0,05	6,92	0,67	0,77	0,21	2,88
Bar_Zala	14	9	35,9 (6,2 - *)	100	DA2a	0,89	0,42	-0,04	3,08	0,98	0,29	0,24	1,56
Ble_Jezernica	15	8	7,1 (3,1 - 15,3)	100	DA1a, DA23c	0,39	0,60	-0,14	3,83	0,52	0,72	0,13	2,58
Bled_Vlaganje	16	19	17,8 (12,6 - 27)	-		0,07	0,74	0,00	7,67	0,14	0,84	0,07	3,18
Boh_RibnicaSp	17	6	300,9 (3,1 - *)	100	Slo1, DA1a	0,90	0,38	0,04	2,25	0,59	0,34	-0,15	1,76
Boh_RibnicaZg	18	17	*75,3 (11,8 - *)	100		0,96	0,26	-0,04	2,17	0,81	0,28	0,23	1,51
Boh_Suha	19	20	2,8 (1,8 - 7,6)	-	DA1a	0,91	0,36	0,13	3,17	0,92	0,49	0,36	2,07
Cer_HruskarPo	20	20	40,8 (21,7 - 147,5)	100	DA2a, DA1a	0,28	0,68	0,09	8,83	0,48	0,54	0,20	2,32
Cer_Mahnecica1	21	4	*3,6 (* - *)	100		0,35	0,58	0,17	2,42	0,13	0,63	0,01	2,42

Varstvena genetika avtohtone potočne postrvi v Sloveniji

Lokalitete	Zap št.	N	Ne	Da %	haplotip	Da %	He	Fis	A	Da %	He	Fis	A
Cer_Mahnečica2	22	19	75,3 (16,3 - *)	100		0,22	0,64	0,16	5,17	0,17	0,50	0,17	2,07
Cer_Mahnečica	23	17	40,5 (17,7 - *)	-	Slo1, DA1a	0,11	0,69	0,17	5,00	0,27	0,64	0,06	2,52
Dol_JernejckovG	24	19	26 (15,7 - 55)	79		0,51	0,62	0,07	6,67	0,43	0,68	0,10	2,56
Dol_Kolarica	25	20	6,2 (3 - 11,1)	100	slo2, DA1a	0,41	0,51	0,11	4,00	0,27	0,54	0,17	2,12
Dol_KotarjevGra	26	6	*156,4 (10,6 - *)	100		0,04	0,67	-0,04	3,92	0,11	0,65	0,03	2,39
Jes_Jerman	27	18	15,8 (10,8 - 24,7)	100		0,69	0,68	0,18	7,17	0,59	0,80	0,23	3,03
Jes_Krotnjek	28	11	33,8 (15,5 - 908,5)	100		0,62	0,66	0,07	6,17	0,60	0,77	-0,07	2,91
Jes_Martuljek	29	10	755,3 (55,1 - *)	100		0,45	0,70	0,06	7,17	0,55	0,78	0,30	2,97
Jes_TriglBis	30	15	28,8 (12,8 - 389,9)	100	DA1a	0,82	0,62	0,11	5,00	0,72	0,72	0,16	2,73
Kor_Bistra	31	19	119,5 (29 - *)	89		0,58	0,57	0,20	6,08	0,63	0,78	-0,04	2,93
Kor_Glazuta	32	20	6,1 (2,7 - 12,6)	100	Slo4	0,94	0,40	0,13	3,50	0,95	0,40	0,21	1,79
Kor_Kop_Meza	33	10	59,7 (21,1 - *)	100		0,75	0,50	0,15	4,17	0,93	0,52	0,02	2,12
Kor_KorKram	34	20	161,9 (24,1 - *)	100		0,62	0,54	0,17	5,58	0,55	0,76	0,08	2,82
Kor_Meza	35	2	*1 (* - *)	100		0,69	0,52	0,04	2,25	0,97	0,50	0,00	2,00
Kor_Mislinja	36	19	28,6 (14,6 - 112)	100	DA1a	0,87	0,54	0,10	4,83	0,94	0,39	0,22	1,81
Kor_Podgorica	37	20	13,3 (9,5 - 19,7)	30		0,23	0,69	0,06	8,50	0,55	0,80	0,12	3,03
Kor_SentanelP	38	17	21,7 (11,5 - 65,5)	55		0,16	0,80	0,13	8,92	0,38	0,89	-0,02	3,45
Kor_Suhado	39	17	1,6 (0,9 - 2,9)	100	DA1a	0,81	0,48	0,43	3,17	0,95	0,67	0,28	2,47
Kor_ZelbreskiP	40	18	5,2 (2,4 - 12)	100	DA22	0,62	0,40	-0,05	2,92	0,95	0,60	0,01	2,27
Kra_Nemilj	41	20	20,9 (9,2 - 106,6)	100	DA1a	0,87	0,51	-0,06	3,08	0,42	0,68	0,00	2,49
Lju_Gracnica	42	20	8,3 (5,4 - 12,5)	100		0,60	0,55	0,07	5,17	0,77	0,74	0,17	2,74
Lju_Jurcef	43	10	17,4 (3,3 - *)	100	Slo1, DA2a	0,84	0,33	-0,01	2,33	0,95	0,55	-0,22	2,09
Lju_KozlovG	44	20	8 (2 - 73,8)	100	Slo1	0,98	0,23	0,05	2,00	0,87	0,54	0,32	2,16
Lju_Krumpah	45	18	7,3 (1,6 - *)	100		0,98	0,23	0,13	1,83	0,98	0,27	-0,10	1,50
Lju_RevsovG	46	19	18,7 (11,4 - 37)	82		0,33	0,71	-0,01	7,42	0,77	0,77	0,15	2,85
Lju_Robansek	47	19	6,3 (2,4 - 17,6)	100	Slo1	0,98	0,35	-0,05	3,18	0,91	0,53	0,06	2,03
Med_Zlebe	48	12	69,3 (12,3 - *)	85		0,13	0,52	0,08	5,42	0,98	0,08	0,65	1,15
Moz_Kramarica	49	18	24,5 (5,4 - *)	100	DA2a	0,96	0,27	0,14	2,36	0,97	0,35	0,15	1,73
Moz_Leskovsek	50	18	*12,1 (83,5 - *)	100	DA2a	0,98	0,18	0,09	1,73	0,95	0,25	-0,15	1,45
Rad_Begunjsčica	51	10	3,1 (2,6 - 5,4)	93	Slo1, DA1a	0,31	0,70	0,19	5,42	0,18	0,61	0,05	2,40
Rad_BegunjVel	52	3	*1,9 (* - *)	100	Slo1, DA1a	0,69	0,48	-0,24	2,17		0,60	0,02	2,38
Rad_Mocilnik	53	9	2,1 (1,5 - 3,2)	100		0,19	0,48	-0,16	2,92	0,13	0,54	-0,09	2,12
RadDR_JosipdiP	54	15	*963,9 (27,2 - *)	82		0,15	0,67	0,20	5,67	0,47	0,57	0,09	2,38
RadDR_KapuP	55	20	26,1 (14,4 - 71,1)	100	DA1a,DA22	0,67	0,52	-0,01	5,42	0,85	0,67	-0,02	2,52
RadDR_Krajnica	56	14	10,6 (5,4 - 24,4)	100		0,18	0,68	0,23	5,42	0,55	0,64	0,53	2,47
RadDR_VaskiP	57	17	4,3 (2,6 - 8,4)	94		0,32	0,59	0,10	4,83	0,39	0,61	0,35	2,40
Rib_CrniG	58	14	5,3 (3,1 - 8)	43		0,14	0,70	0,11	6,75	0,41	0,79	-0,04	2,97
Rib_Kozariscica	59	6	822,9 (19,7 - *)	100		0,20	0,74	0,13	4,50	0,49	0,81	0,01	3,04
Rib_Lehnjak	60	16	21,2 (8,9 - 242,7)	100		0,13	0,56	0,08	5,08	0,76	0,70	0,12	2,70
Rus_Piklarica	61	15	10,1 (3,3 - 39,2)	100		0,77	0,39	0,03	4,00	0,94	0,68	0,05	2,55
Rus_PriLampP	62	18	110,3 (12,2 - *)	100	DA1a	0,83	0,24	0,14	2,20	0,94	0,49	-0,14	2,03
Rus_Verna	63	17	*13,1 (3,8 - *)	100	DA1a	0,94	0,22	0,00	1,80	0,98	0,00	NA	1,00

Varstvena genetika avtohtone potočne postrvi v Sloveniji

Lokalitete	Zap št.	N	Ne	Da %	haplotip	Da %	He	Fis	A	Da %	He	Fis	A
SloB_Dravja	64	20	1,3 (0,1 - *)	100	DA1a	0,94	0,11	0,18	1,45	0,97	0,16	0,12	1,28
SloB_ResP	65	20	740,3 (13,5 - *)	100	DA1a	0,96	0,32	-0,12	2,91	0,98	0,37	0,04	1,68
Sor_BodGr	66	10	16,8 (6,5 - 1139)	100		0,41	0,72	0,15	6,00	0,57	0,81	0,14	3,03
Sor_GabrskiP	67	15	5,8 (3,1 - 9,1)	100	Da1a, Slo1	0,55	0,56	-0,07	4,08	0,88	0,67	0,04	2,52
Sor_PetrG	68	16	13,9 (1,9 - *)	100	DA1a	0,97	0,29	-0,14	2,17	0,98	0,41	0,31	1,79
Sor_PevskiP	69	19	10,2 (6,4 - 17,1)	86		0,81	0,54	0,12	4,33	0,93	0,75	0,16	2,76
Sor_Planica	70	6	10,7 (5,4 - 27,7)	90		0,05	0,80	0,14	5,42	0,29	0,86	0,18	3,23
Sor_Sopotnica	71	18	17,2 (9,1 - 45,2)	100		0,64	0,56	0,07	4,75	0,97	0,55	0,14	2,27
Sor_Sovpot	72	20	13,6 (2,8 - *)	100	Slo1	0,96	0,30	0,06	2,17	0,98	0,42	0,09	1,76
Sor_Zabnica	73	5	*13,6 (* - *)	86		0,08	0,78	0,19	4,92	0,55	0,82	0,13	3,07
Sor_Zaplotnica	74	15	10,6 (3,2 - 51,2)	85		0,73	0,61	0,23	3,75	0,80	0,69	0,01	2,59
Trz_Dovzanka	75	20	12,8 (5,2 - 44,2)	100	DA1a	0,97	0,46	0,03	3,08	0,98	0,43	0,02	1,87
Trz_Kosutnik	76	16	0,9 (0,8 - 1)	100		0,39	0,67	0,04	4,42	0,53	0,78	0,04	2,92
Trz_Mosenik	77	20	14,8 (6,8 - 46,7)	100	DA1a	0,98	0,45	0,03	3,42	0,98	0,53	0,06	2,08
Trz_Stegovnik	78	10	*51,9 (9,9 - *)	100	DA1a, Slo1	0,83	0,63	0,36	3,27	0,72	0,69	0,35	2,56
Trz_ZaliPotok	79	20	5,8 (2,3 - 15,5)	100	DA1a	0,97	0,40	-0,05	2,58	0,98	0,27	0,06	1,52
Vis_GabrG	80	17	30,6 (10,8 - *)	100	DA1a	0,65	0,57	0,09	4,42	0,92	0,52	0,07	2,12
Vis_PrileskiP	81	16	7,5 (3 - 17,4)	22		0,32	0,51	0,14	3,50	0,30	0,64	-0,02	2,44
Vis_Sevniscica	82	16	7,4 (2,4 - 32,2)	100	DA2a, DA1a	0,95	0,38	0,10	2,50	0,98	0,48	0,02	1,94
Vis_SredenG	83	15	11,6 (6,6 - 23,2)	100		0,08	0,67	-0,07	4,17	0,87	0,67	-0,10	2,55
Vrh_Hlevscica	84	20	7,9 (4 - 14)	-	DA1a	0,51	0,56	0,08	4,25	0,93	0,55	-0,09	2,18
Vrh_Pecnikarca	85	18	1,8 (1,5 - 2,2)	10	ATcs21	0,59	0,56	-0,06	4,25	0,86	0,58	-0,18	2,38
Zel_DPZale	86	14	2,2 (0,8 - 28,1)	100	DA1a, DA2a	0,97	0,27	-0,02	2,00	0,98	0,46	0,19	1,89
Zel_DPZale	87	15	19,9 (1,7 - *)	100		0,97	0,24	-0,18	1,83	0,98	0,44	0,02	1,79
Zel_Jahodnica	88	20	6,8 (0,2 - *)	100	DA1a	0,97	0,08	-0,14	1,55	0,97	0,17	0,02	1,30
Zel_MustrovaG	89	13	9,4 (4,6 - 21,3)	75		0,24	0,70	0,15	5,75	0,55	0,83	-0,01	3,13
Zel_Plensak	90	13	2,1 (0,5 - *)	100	DA1a	0,97	0,22	0,13	1,75	0,98	0,05	0,65	1,10
Zir_PlastuhG	91	19	3,2 (2,2 - 8,2)	100	DA2a	0,93	0,35	-0,05	2,67	0,91	0,53	-0,17	2,07
Zir_Raskovec	92	19	*32,2 (26,3 - *)	100	Slo3	0,96	0,25	0,22	2,08	0,97	0,45	0,07	1,88
Zir_Sora	93	17	7,4 (4,2 - 12)	62	Da1a, ATcs21	0,42	0,74	0,09	9,08	0,54	0,87	0,10	3,30
ZZRS_Radovna	94	16	*186,4 (95,2 - *)	81	DA22	0,34	0,78	0,08	9,00	0,58	0,80	0,04	3,02

3.3 Populacijsko ravnotežje

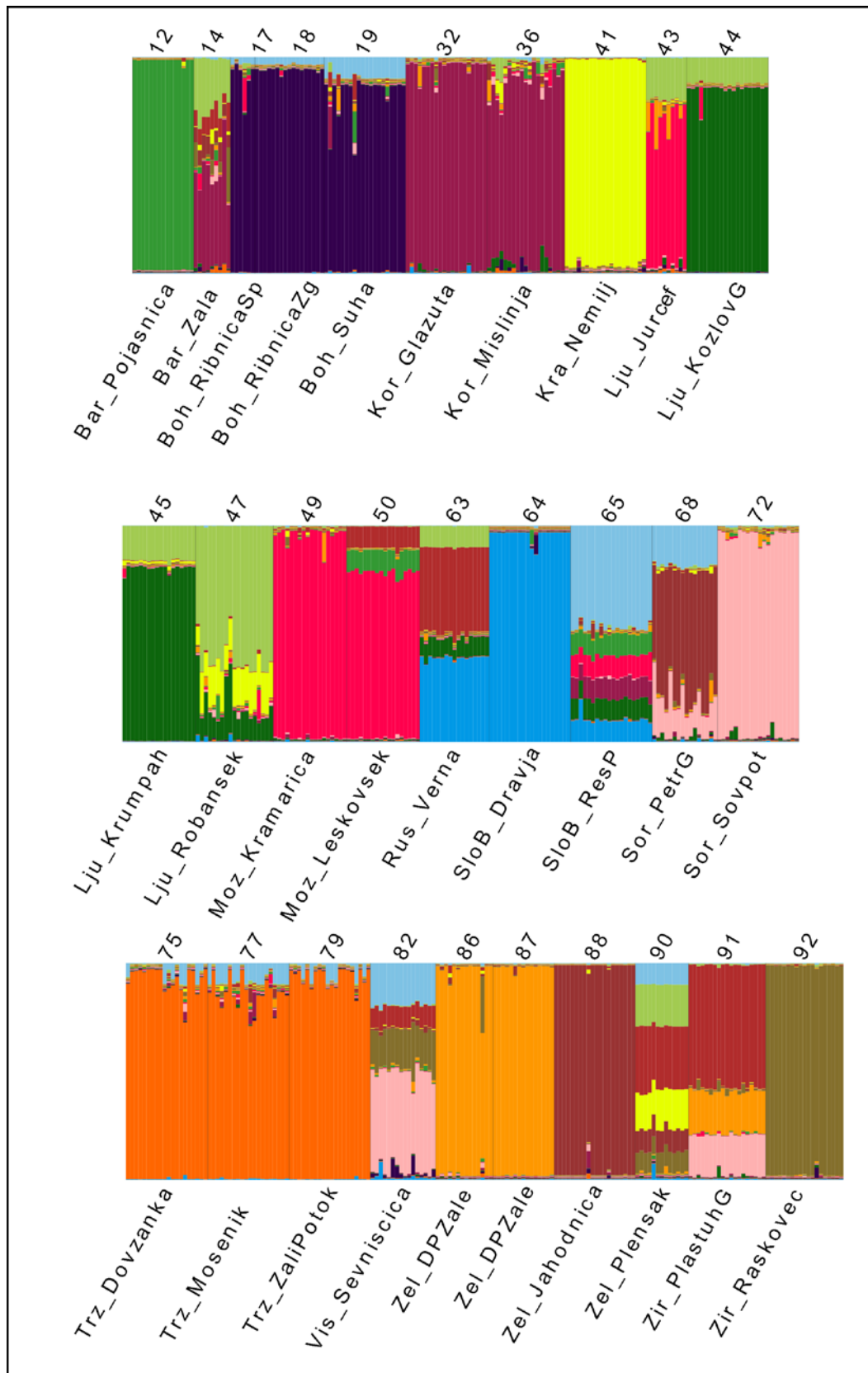
Vse divje testirane populacije smo z F-statistiko testirali glede na to, ali se nahajajo v Hardy-Weinbergovem (H-W) ravnotežju ali ne. To smo ocenjevali glede na vrednost F_{is} , katere signifikantno odstopanje od 0 nakazuje, da zaradi različnih vzrokov (e.g., migracije, selekcija) v testiranih populacijah ne prihaja do naključnega parjenja. Populacij, ki so imele F_{is} vrednosti signifikantno različne od nič, je bilo osem, vse se uvrščajo v skupino populacij z visoko introgresijo atlantskih genov (Tabela 3, rdeče obrobe F_{is} vrednosti). Vse preostale populacije so v H-W ravnotežju.

3.4 Genetska diferenciacija med populacijami

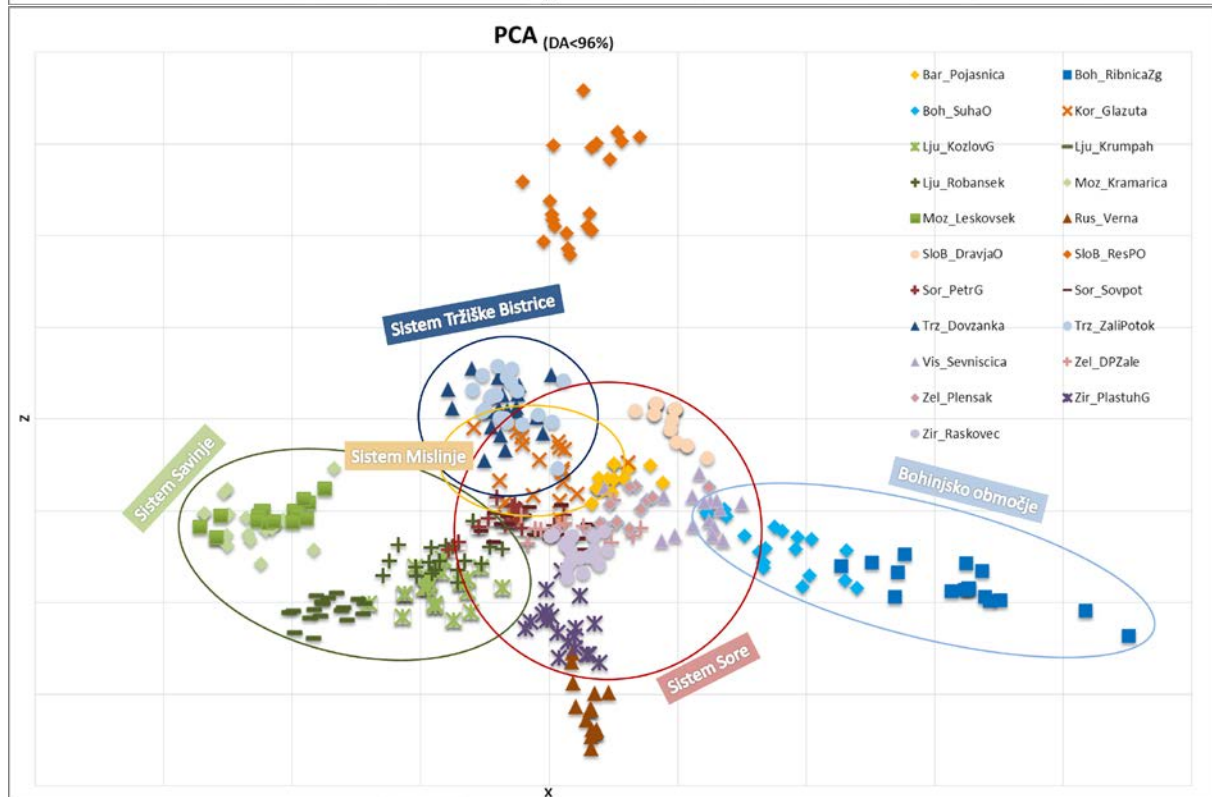
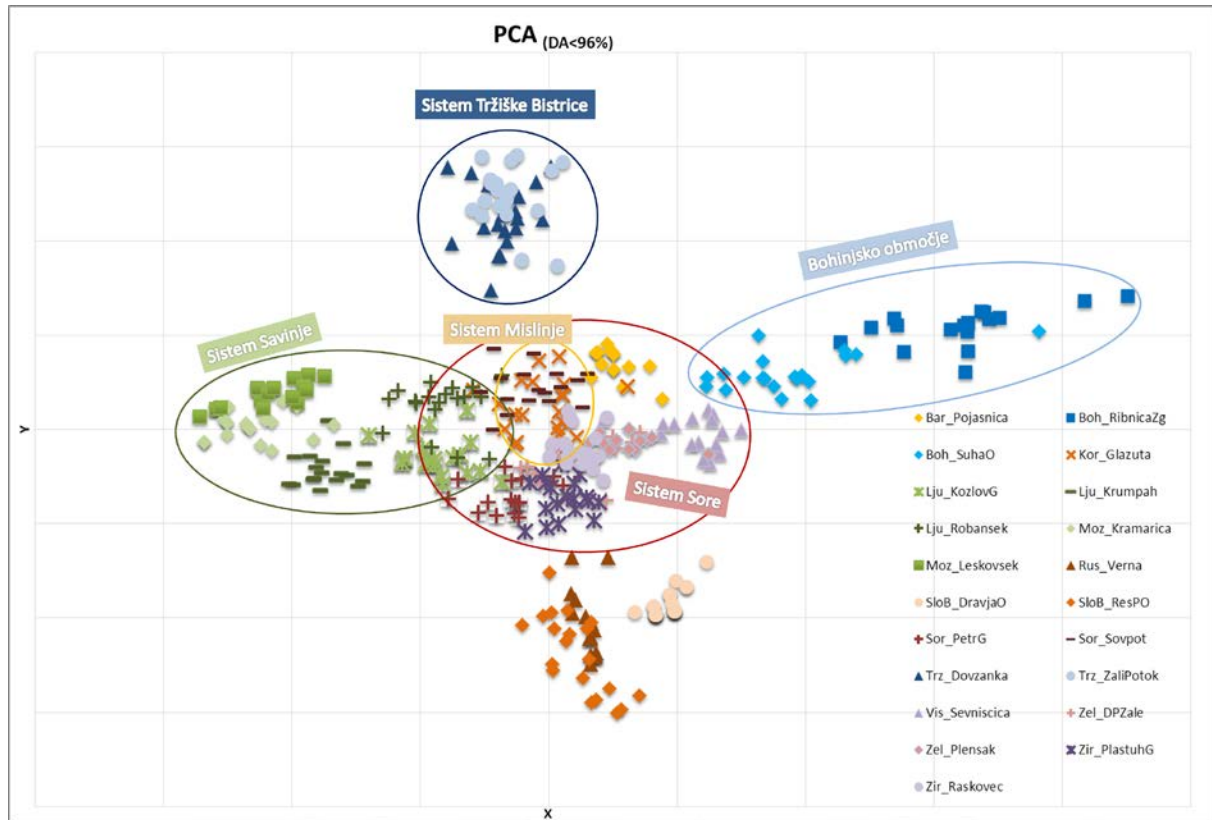
Medpopulacijska genetska diferenciacija, ki smo jo ocenjevali za prve tri skupine populacij (100% mtDNA, $\geq 84\%$ nDNA, $N = 24$), je bila zelo visoka, kar je razvidno preko F-statistike, ki je pokazala zelo visoko poprečno F_{st} vrednost, $F_{st} = 0.52$. Ocene genetske diferenciacije glede na populacijske pare (parne F_{st} vrednosti; izvzeta je primerjava med Dovžanko in Zalim potokom, saj gre za kopiji populacije iz Mošenika) so se gibale od 0.30 do 0.81.

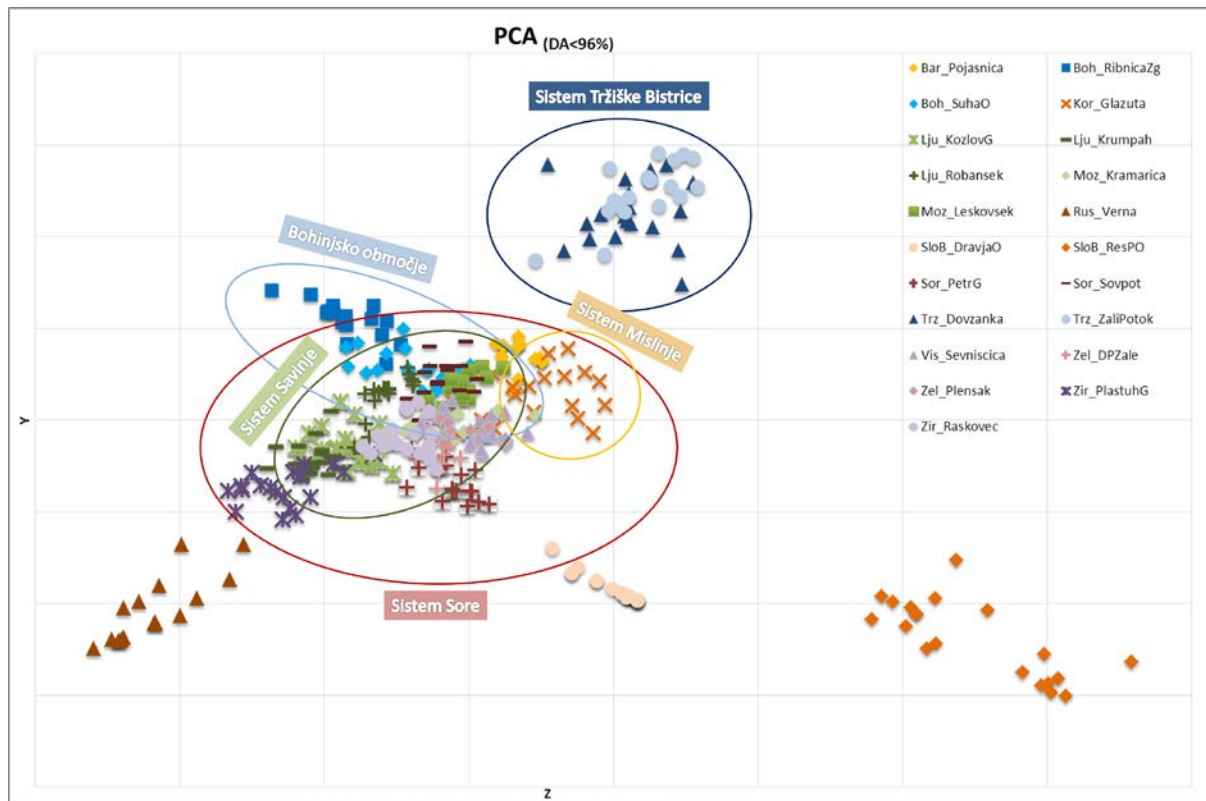
Visoko medpopulacijsko genetsko diferenciacijo so potrdili rezultati, dobljeni s programom STRUCTURE. Pri omenjeni analizi prvih treh skupin populacij je bilo glede na ΔK metodo (Evanno *et al.*, 2005) statistično najbolj verjetno, da analizirane populacije predstavljajo 15 genetsko homogenih enot (vrednost $K = 15$). Na grafu je skoraj vsaka populacija predstavljena s svojo barvo oz. s sebi lastnim vzorcem barvnih kombinacij, ki se med osebki ne spreminja, kar kaže na njihove specifične genetske profile (Sliki 4 in 5).

Slika 5 prikazuje pozicije analiziranih populacij v prostoru PCA grafa (izračunano v programu Genetix), ki ga definirajo tri glavne osi Y, X in Z. Iz diagrama je razvidno, da večina populacij predstavlja genetsko homogene enote; nekatere so jasno ločene od ostalih (e.g., Resniški potok, Dravinja, Verna), druge, ki izhajajo večinoma iz enotnega geografskega območja, se združujejo v večje genetske enote (e.g., Ribnica in Suha), nekatere (predvsem populacije iz Sore) tvorijo osebki, katerih pozicija se delno prekriva.



Slika 4: Rezultati STRUCTURE analize za prve tri skupine populacij (100% mtDNA, $\geq 84\%$ nDNA), K=15





Slika 5: Analiza glavnih komponent (PCA) treh dimenzij za prvi dve skupini populacij (100% mtDNA, >90% nDNA)

Skozi presek rezultatov vseh treh zgoraj navedenih analiz lahko prepoznamo naslednje relativno homogene genetske enote:

SAVSKO POREČJE

Bohinjsko območje:

1 Boh_Ribnica Zg. (18)/ Boh_Suha (19), $F_{st} = 0.35$;

Sistem Tržiške Bistrice:

2 Trž_Mošnik (77) Trž_Dovžanka (75) in Trž_ZaliPotok (79), $F_{st} = 0.025 - 0.071$

V tem primeru gre za populacijo iz Mošenika, ki je bila prenesena v Dovžanko in Zali potok.

Sistem Sore:

Skupina petih populacij iz Poljanske Sore in treh iz Selške Sore (Jahodnica se ne uvršča v to skupino); med njimi obstajajo določene genetske razlike, vendar proti preostalim populacijam tvorijo relativno homogeno genetsko enoto, značilno za rečni sistem Sore. Na PCA grafikonu zavzemajo centralni položaj.

Sistem Savinje:

Dve genetski enoti, ki se povezuje v relativno homogeno skupino.

3 Lju_Robanšek (47)/ Lju_KozlovG (44)/ Lju_Krumpah (45), $F_{st} = 0.37 - 0.39$;

4 Moz_Kramarica (49)/ Moz_Leskovšek (50), $F_{st} = 0.4$

Relativno neodvisne genetske strukture:

5 Bar_Pojašnica (12) /Ljubljana/

6 Kra_Nemilj (41) /zgornja Sava/

7 Žel_Jahodnica (88) /Selška Sora/

DRAVSKO POREČJE

Sistem Mislinje

8 Kor_Glažuta (32)/ Kor_Mislinja (36), $F_{st} = 0.08$

Relativno neodvisne genetske strukture:

9 Ruš_Verna (63) /Drava/

10 SloB_Dravinja (64) /Drava/

11 SloB_Resniški potok (65) /Dravinja/

Izpostaviti velja, da so nekatere geografsko bližnje populacije genetsko zelo diferencirane, npr. populaciji iz Selške Sore, Žel_DPZale (86)/ Žel_Jahodnica (88), $F_{st} = 0.66$. V nekaterih primerih pa so populacije medsebojno geografsko zelo oddaljene pa vendar genetsko dokaj podobne (Kor_Mislinja (36)/Kra_Nemilj (41), $F_{st} = 0,23$).

3.5 Poskus preučevanj vpliva okolja na selekcijo alelov z adaptivno vrednostjo

Populaciji zaroda iz poskusa na zgornjesavskem območju, od katerih smo eno vložili v divjino, drugo pa gojili v ribogojniških razmerah, smo testirali na genetsko podobnost z mikrosateliti z adaptivno vrednostjo in s tem ugotavljali, ali je med njima prišlo do genetskih sprememb zaradi selekcije na specifično okolje. Test genetske podobnosti, ki je vključeval F-statistiko, STRUCTURE analizo in preverjanje odstopanja pojavnosti posameznih alelov med populacijama, je na vseh treh ravneh pokazal, da se osebkii obeh skupin med seboj genetsko ne razlikujejo statistično značilno. Do enakega rezultat smo prišli, če smo obravnavali vsak lokus posebej ali če smo vse tri lokuse združili in analizirali kot celoto.

Do enakih zaključkov smo prišli na osnovi poskusa v Posočju, kjer smo primerjali genetski profil divje populacije, iz katere so izhajali starši, ki so dali zarod, ki smo ga gojili v ribogojnici, in genetski profil omenjenega zaroda.

Analiza preživetja zaroda v vališču RD Bled je pokazala različno preživetje mladic glede na izvor očetov. Tako mladice iz Suhe intenzivneje poginjajo v primerjavi z mladice iz Mošenika ter Malešnice (Tabela 4). Vpliv očetov je bil statistično analiziran s testom χ^2 v programu SAS in v vseh primerih potrjen z verjetnostjo $>0,9999$.

Tabela 4: Delež preživetja postrvi v ribogojnici v selekcijskem poskusu

Datum vzorčenja	27.11.2014	7.1.2015	24.7.2015
	Delež preživetja (št. oplojenih iker)	Delež preživetja do faze iker z očmi	Delež preživetja do mladice
RD Bohinj Suha	100 % (20600)	80.5 % (16583)	10.7 % (2218)
RD Tržič Mošenik	100 % (21300)	73.9 % (15655)	19.6 % (4173)
RD Medvode Malešnica	100% (21800)	76 % (16568)	31.3 % (6808)

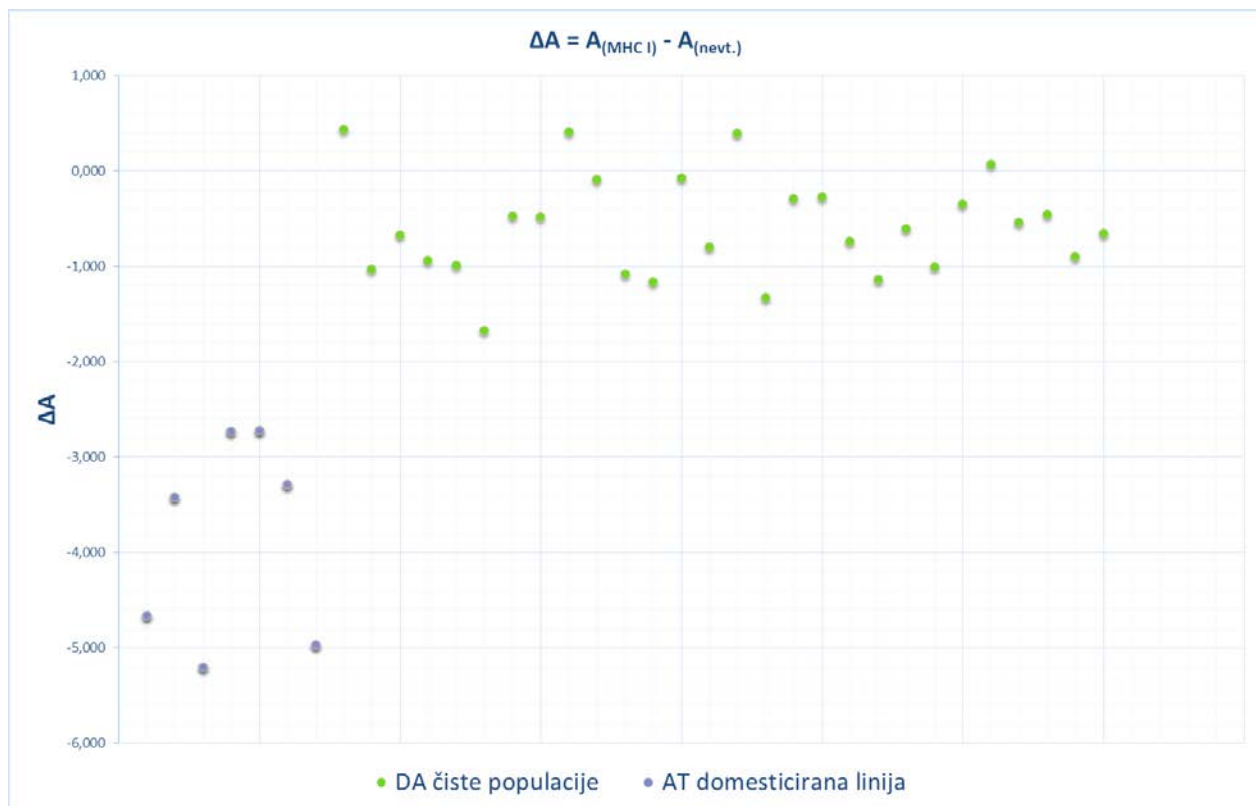
Vpliv selekcije na adaptivne lokuse z analizo alelne pestrosti (A) ribogojniških atlantskih in genetsko čistih divjih donavskih populacij:

Za vsako skupino smo izračunali razliko med alelno pestrostjo za vse tri adaptivne lokuse in alelno pestrost za nevtralne lokuse: $A_{(adapt.)} - A_{(nevt.)}$

Preko dobljenih vrednosti smo opazili:

- da sta $A_{(adapt.)}$ in $A_{(nevt.)}$ pri divjih populacijah sorazmerni
- da je pri ribogojniških populacijah $A_{(adapt.)}$ ca. 2-krat nižja od $A_{(nevt.)}$
- da je pri ribogojniških populacijah $A_{(nevt.)}$ ca. 2-krat večja kot pri genetsko čistih divjih populacijah
- da je razmerje med $A_{(adapt.)} - A_{(nevt.)}$ za divje in $A_{(adapt.)} - A_{(nevt.)}$ za ribogojniške populacije 1:4

To pomeni, da so pri ribogojniških populacijah nekateri aleli pri adaptivnih lokusih pod selekcijskim pritiskom, saj je pri divjih populacijah alelna pestrost med adaptivnimi in nevtralnimi lokusi sorazmerna, medtem ko je pri ribogojniških populacijah to razmerje v prid alelni pestrosti nevtralnih lokusov (Slika 6).



Slika 6: Razlika alelni pestrosti med MHC I in nevtralnimi markerji. Nižje vrednosti predstavljajo okrnjeno pestrost na adaptivnih lokusih napram nevtralnimi lokusom, kar nakazuje na negativno selekcijo, ki je opazna pri atlantski domesticirani liniji (vijolični krogi), medtem ko sta alelni pestrosti pri populacijah z v donavskim genetskim deležem >84% v ravnovesju

4 DISKUSIJA

Raziskava je potrdila rezultate prejšnje študije (Bogataj, 2010), da so v Sloveniji naravne populacije potočne postrvi z visokim avtohtonim genetskim deležem precej redke in omejene na zgornje, izolirane odseke manjših potokov. Ne glede na splošno kritično stanje avtohtonih potočnic v Sloveniji nam je uspelo identificirati 20 novih populacij s 100% mtDNA in >90 % nDNA donavskim deležem in med omenjenimi kar 14 takih z 100% mtDNA in ≥96% nDNA. Pomembno je tudi spoznanje, da obe ribogojniški populaciji, ki smo ju vključili v raziskavo (i.e., iz RD Ljubno in RD Železniki), formirajo križanci s poprečnim atlantskim genetskim deležem okrog 90%. Glede na enoten vir (Ribogojnica Povodje), ki je oskrboval ribiške upravljavce z atlantskimi ribogojniško vzrejenimi potočnimi postrvmi v zadnjih nekaj desetletjih, lahko pričakujemo podobne razmere tudi v ribogojnicah preostalih ribiških družin. Nekatere populacije iz prejšnje raziskave, ki smo jih ponovno analizirali v tej raziskavi, sedaj niso dosegle tako visokega genetskega deleža; ta je lahko nižji celo za ca. 30%. Razlog je v izpopolnjeni metodiki in bistveno večjem naboru mikrosatelitnih lokusov, ki smo jih uporabili v tej raziskavi. Očitno pa močno izstopa populacija iz Malešnice (Žlebe), pri kateri je bil v predhodni analizi genetski delež nDNA 97% in mtDNA < 84%, sedaj pa smo na vzorcih iz iste lokacije zabeležili le 13% delež nDNA in 85% delež mtDNA. Razlog za to neskladje je najbrž predvsem v tem, ker smo lokacijo na Malešnici vzorčili dva krat, 28. marca 2009 in naslednjič 23. 6. 2010. Genetski test je bil v predhodni raziskavi narejen na prvem setu vzorcev, v pričujoči raziskavi pa na drugem. Zelo verjetno je, da je v vmesnem obdobju prišlo do vnosa osebkov, ki so spremenili prvotni genetski profil populacije. Pri opredeljevanju genetske čistosti populacij bi bilo torej smiselno podatke o avtohtonem genetskem deležu ažurno preverjati in posodabljati.

4.1 Genetska pestrost

Ugotovili smo, da imajo vse populacije z visokim avtohtonim genetskim deležem zelo nizko efektivno velikost (N_e), kar pomeni, da v procesu parjenja v takih populacijah sodeluje in prenaša svoje gene v naslednjo generacijo le manjši del populacije (ponavadi je to ca. 10% od celotne (census) populacije). Kjer je teh osebkov malo, neizbežno prihaja do parjenja v sorodstvu, kar vpliva na padec populacijskega fitnesa. Poleg tega se pri nizki N_e iz generacije v generacijo prenaša le del genetske pestrosti, s katero »razpolaga« določena populacija, pri čemer v naslednjih generacijah prihaja do spremenjene pojavnosti alelov nekega gena glede na predhodno generacijo (genetski zdrs). Za majhne populacije je torej značilen trend zmanjševanja genetske pestrosti, k čemur najbolj doprinese zgoraj opisani fenomen, ki lahko privede do tega, da določeni aleli povsem izginejo, zaradi česar se zmanjša genetska pestrost; k temu pa pripomorejo še razni stohastični dogodki (naravne nesreče kot so

zemeljski plazovi, hudourniške vode...), ki povzročijo še dodatno zmanjšanje že tako majhnih populacij (t.i. ozko grlo), kar še pospeši redukcijo genetske pestrosti. Genetska pestrost pa je za populacijo izjemnega pomena, ker omogoča, da se populacija prilagaja na spremenjene okoljske razmere in se brani pred različnimi boleznimi. Zato genetska pestrost predstavlja osnovno merilo možnosti za dolgoročno preživetje populacije in je torej osnovna ocena njene uspešnosti. Genetsko pestrost se običajno ocenjuje preko stopnje heterozigotnosti (H , vsota deležev heterozigotov na vseh testiranih lokusih) in stopnje poprečnega števila alelov na lokus (A).

Genetske analize na potočni postrvi v Sloveniji so pokazale, da imajo prav vse populacije, ki so uspele ohraniti visok avtohtoni genetski delež, v primerjavi z drugimi vrstami sladkovodnih rib (DeWoody & Avise, 2000) izredno nizko genetsko pestrost. Ekstremno nizko genetsko pestrost smo npr. ugotovili pri populaciji iz Pojašnice (12), ki ima $H = 0.12$ in $A = 1.4$; v tem primeru gre za zelo majhno populacijo. Pri večjih populacijah, za katere je bila večinoma značilna tudi visoka kontaminiranost z atlantskimi geni, pa smo zasledili tudi bistveno višjo genetsko pestrost; pri potočnih postrvih iz osrednjega dela Poljsanske Sore (93) smo na primer opazili stopnjo genetske pestrosti ($H = 0.74$ in $A = 9$), ki je značilna za velike populacije z nizkim genetskim zdrsom. K visoki genetski pestrost v tem primeru verjetno še dodatno pripomoreta dopolnilno vlaganje potočnih postrvi iz ribogojnic in introgresija.

Glede na strategije upravljanja s potočno postrvjo v Sloveniji, ki potencialno vključujejo njene genetsko čiste populacije kot izhodišče za njeno repopulacijo, in ob zavedanju, kako nizka je genetska pestrost teh populacij, se zastavlja vprašanje, ali bi potomci teh populacij uspeli preživeti in se razmnoževati tudi v okoljih (e.g., reke in večji potoki), ki se razlikujejo od njihovih izvornih, in ali bi uspeli konkurirati tam živečim hibridnim populacijam. Ali je torej primerno z osebki, ki razpolagajo samo z zelo omejenim naborom genetskega polimorfizma donavske postrvi, naseljevati celoten areal potočne postrvi v Sloveniji? Naše mnenje je, da material s tako osiromašeno genetsko pestrostjo nikakor ni primeren za obsežno repopulacijo potočne postrvi v Sloveniji in da bi morale imeti omenjene populacije zato predvsem lokalni pomen.

4.2 Medpopulacijska diferenciacija

Poleg nizke genetske pestrosti in nizke efektivne velikosti je za populacije potočne postrvi v Sloveniji z visokim avtohtonim genetskim deležem značilna zelo močna genetska diferenciacija. Tako smo med 24 analiziranimi populacijami (100% mtDNA in >90 % nDNA; 20 populacij iz te raziskave in štiri iz predhodne) prepoznali kar 11 genetsko izrazito diferenciranih enot, ki so se glede na parne F_{st} vrednosti med seboj ločevale za $F_{st} =$ od 0.6 do 0.8. Tako visoke vrednosti presegajo najvišje vrednosti, ki so jih do sedaj našli na obsežnejši geografski skali na mikrostaltni DNA pri salmonidih na medpopulacijski ravni drugod po Evropi (zabeležena poprečna F_{st} vrednost

je bila od 0.33 do 0.36; Taylor *et al.*, 2001; Koskinen *et al.*, 2001; Angers & Bernatchez, 1998). Izjema so genetsko čiste populacije soške postrvi (*Salmo marmoratus*) na območju porečja zgornje Soče in Idrijce (Fumagalli *et al.*, 2002), kjer so F_{st} vrednosti med temi populacijami primerljive z vrednostmi, ki smo jih opazili v tej raziskavi. Izmed 11 zgoraj omenjenih genetsko homogenih enot smo opazili štiri take, ki so jih sestavljale nekoliko bolj genetsko podobne populacije, ki pa so bile hkrati tudi regijsko specifične; kot primer navajamo populacije iz Mislinje v dravskem rečnem sistemu in populacije iz Sore v savskem rečnem sistemu. Vendar gre tudi v teh primerih le za relativno povečano genetsko podobnost, saj tudi tu parne F_{st} vrednosti presegajo vrednost 0.3, kar je splošno gledano objektiven pokazatelj za znatno genetsko diferenciacijo. In celo v sistemu Selške Sore smo našli populacijo, i.e. iz Jahodnice (88), ki se od drugih populacij iz tega rečnega sistema kot tudi od preostalih populacij loči za $F_{st} = ca. 0.7$. Kaže torej, da so populacije z visokim avtohtonim genetskim deležem popolnoma izolirane med seboj, najsi gre za sosednje ali geografsko oddaljene populacije. Ta ugotovitev namreč izhaja iz dejstva, da je popolna odsotnost genskega pretoka, ocenjevanega z mikrosatelitno DNA, dosežena že celo pri nižjih F_{st} vrednostih, kot smo jih opazili v svoji raziskavi, in sicer zaradi visoke mutacijske stopnje mikrosatelitov, ki postopoma povečuje znotraj-populacijsko genetsko raznolikost (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Vzrok za tako visoko medpopulacijsko diferenciacijo je torej izostanek genskega pretoka med populacijami in genetski zdrs, ki v posameznih populacijah poteče naključno in se manifestira v specifičnih genetskih profilih populacij. Neposreden razlog za omenjeno izolacijo so neprehodne ovire kot npr. slapovi, ki preprečujejo migracijo rib po toku navzgor. Posreden razlog pa je verjetno v ledeniško pogojenem geomorfološkem preoblikovanju s postrvimi naseljenih območij v Sloveniji, ki se je dokončno formiralo pred ca. 10.000 leti in je vplivalo na omejeno možnostjo migracij med določenimi populacijami postrvi. Neodvisno od tega je k dodatni diferenciaciji verjetno pripomogla tudi izolacija zaradi razdalje, i.e. ko genetska diferenciacija med osebki narašča skladno z naraščajočo geografsko razdaljo med njimi. Glede na omenjeno lahko ekstrapoliramo, da so se potočne postrvi v Sloveniji dokaj ločeno razvijale med posameznimi sistemi večjih rek, da pa je do očitne diferenciacije prihajalo tudi znotraj teh sistemov. S temi ugotovitvami so skladni tudi rezultati populacijsko genetske analize čistih populacij soške postrvi v Sloveniji (Fumagalli *et al.*, 2002), ki naseljuje območja s podobnim zemeljskim reliefom kot preučevane potočne postrvi. Da naši rezultati niso pokazali očitnejše regijsko vezane genetske podobnosti, je verjetno razlog v tem, da smo bili pri analizi diferenciacije omejeni na izredno majhne populacije, ki so že zelo dolgo ločene od ostalih, in pri katerih je naključni genetski zdrs verjetno prevladujoči evlucijski dejavnik; le-ta je verjetno tudi preprečil formiranje izrazitih filogeografskih linij.

Specifične genetske profile populacij z visokim avtohtonim genetskim deležem smo dokazali na osnovi nevtralnih mikrosatelitnih markerjev, pri tem pa je treba upoštevati, da so enakemu genetskemu dogajanju (e.g. genetskemu zdrsu) podvrženi tudi drugi geni, ki jih v svoji raziskavi neposredno nismo preučevali; sem sodijo

torej tudi vsi geni z vplivom na nevtralne fenotipske lastnosti. Ni torej nepričakovano, da postrvi v Sloveniji odražajo veliko fenotipsko raznolikost, o kateri poročajo tako med različnimi območji kot celo med posameznimi potoki znotraj posameznega območja. Če želimo to fenotipsko raznolikost ohranjati, bo potrebno z lokalnimi populacijami oddvojeno upravljati in se izogibati njihovemu medsebojnemu mešanju.

4.3 Mitohondrijska DNA

Iz raziskave je razvidno, da se je v številnih genetsko mešanih populacijah z zmernim ali celo zelo visokim atlantskim genetskim deležem na jedrni DNA donavski delež na mitohondrijski DNA ohranil 100-odstotno. Očitno gre v teh primerih za omejen doprinos gamet ženskih neavtohtonih osebkov.

Ker se mtDNA deduje samo po maternalni liniji, jedrna pa po obeh spolih, na splošno velja, da prihaja do genetskega zdrsa in posledično do fiksacije oz. izgube genetskih variant pri mtDNA haplotipih štirikrat hitreje kot pri alelih jedrne DNA. Dinamika genetskega zdrsa je še bolj izrazita pri majhnih populacijah v kombinaciji z ozkim grlom (značilnost večine divjih populacij te raziskave), kar lahko privede do minimalne učinkovite velikosti populacije in do pospešenega naključnega razporejanja genov. Torej se lahko v takih razmerah določen mtDNA haplotip (e.g. atlantski) hitro v celoti izgubi. Zelo verjetno pa je, da k temu naključnemu razporejanju genov v populacijah, ki jih obravnavamo v tej raziskavi, pripomore še proces selekcije: predvideva se namreč, da naravna selekcija v divjini deluje močnejše proti ribogojniškim atlantskim samicam kot proti ribogojniškim atlantskim samcem, ki imajo v naravnem okolju torej več možnosti prenesti svoje gene v avtohtono populacijo kot ribogojniške samice (Hansen, 2002; Wills, 2006). Rezultat tega je, da populacija navkljub introgresiji z atlantskimi osebki ohrani avtohton mitohondrijski genetski profil. To hipotezo potrjujejo naši rezultati, ki pri skoraj 1/3 mešanih populacij odražajo 100% donavski haplotip in več kot 50% introgresijo z atlantskimi jedrnimi geni. Ker smo v raziskavo vključili le tiste divje populacije, za katere velja, da niso upravljane, je možno, da je že enkrat (nezabeležen) vložek atlantskih potočnic doprinesel k neuravnoteženemu genetskemu profilu, ki ga opisujemo zgoraj.

4.4 Poskus preučevanja vpliva okolja na selekcijo potočne postrvi

Dobljeni rezultati poskusa, s katerim smo preučevali vpliv okolja na selekcijo alelov z adaptivno vrednostjo, kažejo na to, da na osnovi treh kandidatnih lokusov, vezanih na MHC kompleks, genetskih sprememb, ki bi nastale zaradi vpliva različnega okolja, nismo mogli dokazati.

Po drugi strani nam je uspelo s statistično visoko signifikantnostjo dokazati, da je izbor očetov bistveno vplival na preživetje zaroda v ribogojnici. Pri tem je ključno izpostaviti, da so se skupine očetov med seboj ločile glede na stopnjo vpliva ribogojnice: prvo skupino so predstavljali samci iz divjine, drugo skupino naključna kombinacija divjih samcev in v ribogojnici vzrejenih samcev, ki so bili kot mladice vloženi v potok z divjimi samci, medtem ko je tretjo skupino predstavljala prva generacija samcev, vzrejenih v ribogojnici (Tabela 4). Glede na rezultate bi lahko sklepali, da je do faze iker z očmi viabilnost iker najvišja pri »divjih« ikrah. To razmerje se spremeni v fazi mladice, ko so bile najuspešnejše tiste, katerih starši so bili ribogojniški samci. Na osnovi teh ugotovitev bi lahko predpostavili preliminarno hipotezo, da je zgodnejši ontogenetski razvoj pri potočni postrvi bolj konzervativen, medtem ko je na kasnejše faze razvoja lažje vplivati s selekcijo. Vsekakor je omenjeno domnevo potrebno nadalje testirati na večjem številu informativnih poskusnih skupin.

Nedvomno pa je vpliv samcev na preživetje mladice, ki smo ga dokazali s populacijskim poskusom, pokazal, da ribogojniška vzreja ima vpliv na gensko selekcijo. Tega nam očitno za sedaj ni uspelo dokazati na molekularni ravni. Razlog za to je morda v tem, da na to lastnost vpliva večja količina genov in/ali da posamezni geni učinka zaradi spremenjenega okolja ne morejo tako močno izraziti že v prvi generaciji. Araki *et al.* (2007) so npr. pokazali, da pride do drastičnega padca reprodukcijske sposobnosti ribogojniških populacij anadromnih šarenk (*Oncorhynchus mykiss*) v divjini šele po treh letih njihovega življenja v ribogojnici. Možno pa je tudi, da se selekcija na različno okolje odraža preko različne stopnje ekspresije določenih genov, o čemer za šarenko poroča Christie *et al.* (2016), kar pa je možno dokazovati le preko RNA študij.

Raziskave vpliva okolja na selekcijo alelov z adaptivno vrednostjo nameravamo pri potočni postrvi nadaljevati, pri čemer bomo glede na izkušnje iz pričujoče raziskave vpeljali metodo genetske asociacijske študije, temelječe na množici SNP markerjev, pridobljenih preko sekvenciranja nove generacije.

4.5 Smernice za repopulacijo potočne postrvi in vloga populaciji z visokim avtohtonim genetskim deležem

Vse populacije z visokim avtohtonim genetskim deležem imajo ekstremno nizko genetsko pestrost in vse izvirajo iz ekološko podobnega okolja (izvirni deli majhnih gorskih potokov), zato je navkljub večjemu številu detektiranih genetsko pristnih populacij kot v predhodni raziskavi, tvegano verjeti, da bi se njihovi potomci uspešno odzvali na različna okolja njihovega vnosa, ki ga v veliki meri predstavljajo precej večji vodni sistemi z višjo temperaturo, z obstoječo hibridno populacijo in bistveno večjim spektrom patogenih mikroorganizmov. Prav tako smo tudi ugotovili, da translokacije lokalnih populacij niso primerne, če želimo ohranjati fenotipsko heterogenost potočne postrvi, in da je genetsko primerne populacije smiselno vključevati le v repopulacijski proces lokalnih območij, od koder te populacije izvirajo. Poleg tega bi bili številni posegi (e.g. elektroizlov, odvzem spolnih celic...), ki bi bili v

primeru eksploatacije teh populacij za repopulacijo neizogibni, za te krhke populacije škodljivi in bi na daljši rok zagotovo ogrozili njihov obstoj.

Dejstvo je tudi, da zaradi obsežnega minulega vlaganja in specifične topografije v mnogih ribiških družinah populacij z genetsko visokim donavskim delež enostavno ni več. Primer je celoten rečni sistem Kolpe v Sloveniji in rečni sistem Krke. Nekateri v takih primerih vidijo rešitev v poribljanju s čistimi postrvmi, ki izvirajo izven lokalnega ribiškega območja. To pa zaradi vprašljive sposobnosti prilagajanja na drugačno okolje in zaradi dodatnega poseganja v genetsko strukturo lokalnih postrvi močno odsvetujemo. Za rehabilitacijo avtohtone potočne postrvi v Sloveniji in za vzpostavitev sonaravnega upravljanja z njo bi bilo torej nujno najti številne dodatne vire genetsko sprejemljivih lokalnih plemenskih rib, ki bi zagotavljale zadostno genetsko pestrost, adaptivnost in ohranjanje regijsko specifičnih fenotipov. To troje pa je mogoče doseči le z uporabo lokalnega materiala. V takih primerih se je treba torej vprašati, ali ni morda za repopulacijo bolje uporabiti lokalni material, pa čeprav ta ni povsem genetsko čist, in na ta način ohraniti vsaj preostanek avtohtonih lokalnih genov, ki zagotavljajo adaptivnost in potencial za izražanje lokalnih fenotipov; le-te pa v končni fazi oblikuje naravna selekcija, ki jo narekuje specifično okolje in specifičen nabor genov.

Zavedati se je treba, da je bila z več desetletnim vnašanjem atlantske potočne postrvi v slovenske vode narejena avtohtonim potočnicam ogromna in nepopravljiva škoda, in da je potrebno pri nadaljnjem upravljanju to dejstvo sprejeti in se osredotočiti na možnosti, ki so ostale.

Naš predlog je torej, da se areal potočne postrvi v Sloveniji razdeli na smiselna geografska območja, ki bodo predstavljala najmanjše enote upravljanja. Pri tem so lahko v pomoč homogene genetske enote, ki smo jih identificirali v tej raziskavi. V okviru teh območij bi bilo potrebno neposredno iz cone križanja s pomočjo genetskega testa izbirati najboljši material, ki bi ga v kombinaciji z genetsko čistimi populacijami (kjer so na voljo) uporabili za vzpostavitev plemenskih jat s sprejemljivim donavskim deležem. S plemensko jato je pomembno gospodariti na način, da iz odbranih osebkov ne bi spet nastala domesticirana linija, kar je bil poleg neavtohtonosti največji problem atlantske linije. Zato predlagamo, da se v na novo vzpostavljene donavske plemenske jate vključi samo samice, ikre teh samic pa bi vsakoletno oplojevali s semenom lokalnih samcev iz divjine, ki se ga odvzame na mestu samem, samce pa se po odvzemu vrne na mesto izlova. Priporočamo, da se pred uporabo semena določi tudi genetsko primernost odbranih samcev. S tehnologijo krioprezervacije semena, kar nekatere ribiške družine že rutinsko uporabljajo (i.e., Tolmin, Bled in Radovljica), je možno uskladiti časovna neskladja, do katerih lahko zaradi takih postopkov pride pri oplojevanju iker.

Zarod, ki ni domesticiran (kar je predpogoj za uspešno repopulacijo), slabo uspeva v vališču in ribogojnici, kar so podprli tudi rezultati te raziskave. In ker je selekcija na ribogojnico nezaželena, je treba zarod vlagati v divjino v

čim zgodnejših fazah njegovega razvoja, najbolje v fazi iker z očmi, kar kot najboljšo opcijo nakazujejo tudi rezultati našega poskusa, vezanega na vpliv očetov na selekcijo zaroda potočne postrvi.

Odgovor na vprašanje, kako visok delež neavtohtonih genov je pri repopulaciji še mogoče dopuščati, je raznovrsten in odvisen od konkretnih razmer v posameznem ribiškem območju oz. ribiški družini, gotovo pa je osnovna orientacija pri odločanju natančno poznavanje poprečne genetske strukture postrvi konkretnega območja. Svetujemo, da se v takih primerih kandidatnim plemenskim postrvim, ulovljenim v divjini, pred smukanjem odvzame tkivo za genetske analize, na osnovi katerega bo možno ugotoviti delež genetske kontaminiranosti za posamezen osebek, kar naj bi bil kriterij za končno odbiro.

Čeprav populacije z visokim avtohtonim genetskim deležem zaradi navedenih razlogov niso primerne kot edino sredstvo, na katerem bi temeljila repopulacija potočne postrvi v Sloveniji, vseeno predstavljajo dragocen vir, saj pri njih še ni prišlo do genetskega mešanja z atlantskimi postrvmi, zaradi česar jih je potrebno primerno zaščititi in ohranjati. Zaradi svoje majhnosti so namreč vse te populacije zelo ogrožene, predvsem jih ogrožajo naključni naravni dogodki, vezani npr. na destrukcijo okolja, klimatske spremembe etc. Iz lastnih izkušenj lahko povemo, da je bila npr. zaradi zemeljskega plazua l. 2002 uničena ena izmed devetih genetsko čistih populacij soške postrvi, nedavno pa so posledice žleda uničile populacijo potočne postrvi iz Malešnice (48). Kot eden izmed učinkovitih načinov za zaščito tovrstnih populacij je ustvarjanje njihovih kopij, s katerimi se nato poseljuje odseke sosednjih potokov, ki so težko dostopni za ribe nizvodno in ki so brez rib ali iz katerih je bila predhodno izlovljena nezaželena populacija. Poleg zaščite originalne populacije ima tak pristop tudi repopulacijski pomen, ker s povečevanjem obsega lokalnih avtohtonih genetskih »poolov« vpliva tudi na nizvodne populacije; genetski pretok, ki poteka nizvodno, namreč z lokalnimi geni postopno osvežuje introgresirane genome in jih tako strukturno spreminjajo v prid donavski liniji. Taka praksa se že več let uveljavlja v okviru rehabilitacije soške postrvi v Sloveniji; pri potočni postrvi pa smo na primeru kopije, narejene na osnovi populacije iz Mošenika (77), ki je bila vložena v Zali potok (79) in prazen odsek Dovžanke (75), opazili, da sta novonastali populaciji pet let po translokaciji ohranili praktično celotno originalno genetsko pestrost in se razvili v viabilni populaciji.

5 ZAHVALA

Vsem ribiškim družinam, ki so sodelovale pri zbiranju vzorcev, se lepo zahvaljujemo za učinkovito pomoč in dobro voljo na terenu. Hvala tudi Tonetu Strgarju in Dušanu Jesenšku za pomoč pri tehnični izvedbi poskusa.

6 LITERATURA

- Araki *et al.*, 2007. *Science*, 318:100–103.
- Angers & Bernatchez 1998. *Molecular Biology and Evolution*, 15:143-159.
- Apostolidis *et al.*, 2007. *Conservation Genetics*, 8:1025–1028.
- Balloux & Lugon-Moulin, 2002. *Molecular Ecology*, 11:155-165.
- Bernatchez, 2001. *Evolution*, 55:351-379.
- Bernatchez & Landry, 2003. *J. Evol. Biol.*, 16:363-377.
- Bogataj 2010, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za zootehniko.
- Christie *et al.*, 2016. *Nat Commun.*, 7:10676.
- Clement *et al.*, 2000. *Mol. Ecol.*, 9:1657–1659.
- Coughlan *et al.*, 2006. *ICES Journal of Marine Science*, 63:1248-1255.
- DeWoody & Avise, 2000. *Journal of Fish Biology*, 56:461-473.
- Evanno *et al.*, 2005. *Molecular Ecology*, 14:2611–2620.
- Fumagalli *et al.*, 2002. *Molecular Ecology*, 11:2711-2716.
- Gharbi *et al.*, 2006. *Genetics*, 172:2405–2419.
- Grimholt *et al.*, 2003. *Immunogenetics*, 55:210-219.
- Hansen & Loeschcke, 1994. *Conservation Genetics*. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp 273-289.
- Hansen, 2002. *Molecular Ecology*, 11:1003–1015.
- Hansen *et al.*, 2007. *Mol. Ecol.*, 16:1413–1425.
- Jensen *et al.*, 2008. *Heredity*, 100:79-91.
- Jug *et al.*, 2005. *Biological Conserv.*, 123:381-388.
- Jug, 1998. Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za zootehniko.
- Konar *et al.*, 2013. *Karafish Final report*, Klagenfurt am Wörthersee: Kärtner Institut für Seenforschung, pp. 702.
- Koskinen *et al.* 2001. *Conservation Genetics*, 2:133-143.
- Keenan *et al.*, 2013. *Journal of Fish Biology*, 82:1789-1804.
- Lerceteau-Köhler in Weiss, 2006. *Aquaculture*, 258:641-645.
- Meier *et al.*, 2011. *Heredity*, 106:488–499.
- Melkič, 2000. Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za zootehniko.
- O'Farrell *et al.*, 2013. *PLoS ONE*, 8:e63035.
- Povž *et al.*, 1996. *The Merble trout, in the Soča River basin, Slovenia*. Tour du Valat Publications, 65 p.
- Schenekar *et al.*, 2014. *Conserv. Genet.*, DOI 10.1007/s10592-013-0561-0.

- Snoj, 1997. Zbornik Biotehniške fakultete UL. Kmetijstvo. Zootehnika, 70:111-116.
- Snoj, 2004. *Ribič*, 10:239-243.
- Snoj *et al.*, 2015. *Ribič*, 1-2:5-9.
- Taylor *et al.*, 2001. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58:406-420.
- Templeton *et al.*, 1992. *Genetics*, 132:619–633.
- Wills, 2006. *North American Journal of Fisheries Management*, 26: 535-544.
- Weiss & Schmutz, 1999. *Transactions of the American Fisheries Society*, 128:302-316.
- Danzmann *et al.*, 1999. *Aquaculture*, 173:45-58

Priloga: Slike lokacij in rib iz prve skupine z zelo visokim donavskim genetskim deležem (100% mtDNA, $\geq 96\%$ nDNA), iz fenotipsko heterogeniz lokacij in iz ribogojnice; številke v oklepajih se ujemajo z zaporednimi številkami populacij iz Tabele 1.



Slika 1: Pojaščica (12), RD Barje



Slika 2: Ribnica (18), RD Bohinj



Slika 3: Kozlov graben (44), RD Ljubno



Slika 4: Krumpah (45), RD Ljubno



Slika 5: Robanšek (47), RD Ljubno



Slika 6: Kramarica (49), RD Mozirje



Slika 7: Leskovšek (50), RD Mozirje



Slika 8: Petruzova grapa (68), RD Sora



Slika 9: Sovpot (72), RD Sora



Slika 10: Dovžanka (kopija iz Mošenika; 75), DR Tržič



Slika 11: Zali potok (kopija iz Mošenika, 79), RD Tržič



Slika 12: Desni pritok Zale (86), RD Železniki



Slika 13: Plenšak (90), RD Železniki



Slika 14: Raskovec (92), RD Železniki



Slika 15: Dva primera fenotipsko heterogene populacije, ki indicira introgresijo.

Zgoraj: Stegovnik (78), RD Tržič (mtDNA 100%, nDNA 83%).

Spodaj: Muštrova grapa (89), RD Železniki (mtDNA 75%, nDNA 24%).



Slika 16: Primer fenotipske heterogenosti plemenk v ribogojnici RD Železnik (3) (nDNA 8%)