Usporedba populacijsko-genetičke strukture velebitske degenije (Degenia velebitica (Degen) Hayek) na lokalitetima Tomišina draga (Velika Kapela) i Šugarska duliba (Velebit)

Čukelj, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:923218

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

DORA ČUKELJ

Usporedba populacijsko-genetičke strukture velebitske degenije (*Degenia velebitica* (Degen) Hayek) na lokalitetima Tomišina draga (Velika Kapela) i Šugarska duliba (Velebit)

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u "Laboratoriju za sistematsku botaniku i floru" Botaničkog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc.dr.sc. Ivana Radosavljevića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Usporedba populacijsko-genetičke strukture velebitske degenije (*Degenia velebitica* (Degen) Hayek) na lokalitetima Tomišina draga (Velika Kapela) i Šugarska duliba (Velebit)

Dora Čukelj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Velebitska degenija (*Degenia velebitica* (Degen) Hayek) je uskoendemična i ugrožena biljna vrsta s tek tri poznate populacije. S ciljem populacijsko-genetičke analize dvije najveće populacije velebitske degenije, prikupljeno je ukupno 125 uzoraka sa lokaliteta Tomišina draga i Šugarska duliba. Nakon izolacije DNA iz prikupljenog biljnog materijala, lančanom reakcijom polimerazom je provedeno umnožavanje osam mikrosatelitnih lokusa. Statističkom obradom dobivenih podataka utvrđeni su osnovni populacijsko-genetički parametri na temelju kojih se može zaključiti da niti jedna od istraživanih populacija nije značajnije genetski osiromašena te da u nedavnoj prošlosti nije prošla kroz genetičko usko grlo. Također, nije utvrđen višak homozigotnih jedinki ni u jednoj populaciji, što znači da nije prisutno izraženo križanje u bliskom srodstvu između jedinki pojedine populacije. Iako ukupni populacijsko-genetički status istraživanih populacija ne upućuje na njihovu neposrednu ugroženost, to ne znači da one nisu izložene ozbiljnim rizicima kao što su nestanak odgovarajućeg staništa, klimatske promjene te prekomjerno sakupljanje.

(47 stranica, 8 slika, 5 tablica, 51 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: velebitska degenija, mikrosateliti, populacijska genetika, endemična vrsta

Voditelj: Dr.sc. Ivan Radosavljević, doc.
Ocjenitelji: Dr.sc. Ivan Radosavljević, doc.
Dr.sc. Jasna Lajtner, izv. prof.
Dr.sc. Jasenka Sremac, izv. prof.
Dr.sc. Danijel Orešić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 3.3.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Comparison of population genetic structure of *Degenia velebitica* (Degen) Hayek from localities Tomišina draga (Mt. Velika Kapela) and Šugarska duliba (Mt. Velebit)

Dora Čukelj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Degenia velebitica (*Degenia velebitica* (Degen) Hayek) is a narrow endemic and endangered plant species with only three known populations. 125 samples were collected for population genetic analysis. Samples were collected from two largest *Degenia velebitica* populations, which are located at Tomišina draga and Šugarska duliba. After DNA isolation from collected plant material, polymarese chain reaction was used for amplification of eight microsatellite loci. Basic population genetics parameters were estimated by statistic analysis of obtained data. Based on given results we conclude that analized populations have not recently experienced genetic bottleneck and are not genetically impoverished. Furthermore, excess of homozygotes was not detected, which means that there is no significant inbreeding in analysed populations. Although population genetic reasearch does not suggest that populations are endangered it does not mean that they are not exposed to threats due to disappearanace of their natural habitat, climate changes and over collection of plants.

(47 pages, 8 figures, 5 tables, 51 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Keywords: *Degenia velebitica*, microsatellites, population genetics, endemic species

Supervisor: Dr. Ivan Radosavljević, Asst. Prof.
Reviewers: Dr. Ivan Radosavljević, Asst. Prof.
Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.
Dr. Jasenka Sremac, Assoc. Prof.
Dr. Danijel Orešić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 3.3.2017.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. O velebitskoj degeniji 1

1.2. Stanište i ekologija vrste 5

1.3. Ugroženost 7

1.4. Uloga genetičkih istraživanja u očuvanju biološke raznolikosti – konzervacijska genetika 8

1.5. Ciljevi istraživanja 9

2. MATERIJALI I METODE 10

2.1. Uzorci za analizu 10

2.2. Izolacija DNA 11

2.3. Elektroforeza DNA na agroznom gelu 11

2.4. Lančana reakcija polimerazom 12

2.5. Mikrosatelitni molekularni biljezi 12

2.6. Opis postupka izolacije DNA i provedene genotipizacije 13

2.7. Laboratorijska oprema i pribor 18
2.7.1. Popis korištenih uređaja 18
2.7.2. Popis korištenog pribora 18

2.8. Opis korištenih statističkih metoda 19
2.8.1. Informacijski sadržaj polimorfizma 19
2.8.2. Unutar-populacijska raznolikost mikrosatelita 19
2.8.3. Genetičko usko grlo 21
2.8.4. Hardy-Weinbergova ravnoteža 22
2.8.5. Analiza molekularne varijance (AMOVA) 23

2.9. Analiza eksperimentalno dobivenih podataka 24

4. REZULTATI 25

5. RASPRAVA 30

6. ZAKLJUČAK 33

7. POPIS LITERATURE 34

8. PRILOZI **40**

9. ŽIVOTOPIS **48**

1. UVOD

1.1. O velebitskoj degeniji

Velebitska degenija (*Degenia velebitica* (Degen) Hayek) jedna je od najpoznatijih stenoendemičnih svojti Hrvatske i Balkana (Nikolić i sur. 2015). Otkrio ju je 1907. godine mađarski botaničar Arpad Degen i nazvao *Lesquerella velebitica* (Matijević i sur. 1999). Degen službeno objavljuje svoj nalaz javnosti 1909. godine kao prvi nalaz vrste *Lesquerella velebitica* (Degen 1909). Austrijski botaničar August Hayek zaključuje da biljka pripada nepoznatom rodu u euroazijskoj flori te je 1910. godine prema imenu otkrivača opisan novi monotipski rod *Degenia,* a vrsta je nazvana *Degenia velebitica* (Hayek 1910). *Locus classicus* vrste se nalazi na točilima Miljkovića kruga u blizini Šugarske dulibe (Sjeverni Velebit). Osim Šugarske dulibe, danas su poznata još 2 nalazišta velebitske degenije, a to su Prikinuto brdo (Sjeverni Velebit) i posljednje otkriveno, Tomišina draga (Velika Kapela) (Matijević i sur. 1999). Procjena obima pojavljivanja i brojnosti populacija provedena je 2004. godine (Nikolić i sur. 2005). Ustanovljeno je da se do sada pojavljuje na ukupno 4,8 ha površine s blizu 40 000 jedinki (Nikolić i sur. 2015). Velebitska degenija je zeljasta trajnica iz porodice krstašica (Brassicaceae). Jedina je predstavnica roda *Degenia* te filogenetski blisko srodna sa vrstama roda *Fibigia* (Rešetnik i sur. 2013). Velebitsku degeniju karakterizira razgranati podzemni drvenasti podanak iz kojeg izrastaju brojni sterilni i fertilni izdanci. Sterilni izdanci su kraći od fertilnih koji mogu narasti do 10 cm visine i čine uspravne, nerazgranate stabljike na čijim se vrhovima nalaze cvatovi grozdovi koji se sastoje od dvospolnih, žutih cvjetova (Slika 1). U cvijetu se nalazi 6 prašnika i nadrasli tučak koji je građen od 2 plodna lista. Biljka je entomofilna, a ovisno o lokalnim vremenskim prilikama i nadmorskoj visini, može cvjetati već od travnja (Nikolić i sur. 2015). Prvi plodovi pojavljuju se približno 45 dana nakon prvih cvjetova, a vrijeme dozrijevanja je također oko 45 dana (Naumovski 2005). Plodovi su komuške (Slika 2), a sastoje se od dva odjeljka u kojima se nalaze 4 tanke, plostane, smeđe sjemenke (Slika 3). Interval između pojavljivanja prvog cvijeta i raspršenja posljednje sjemenke je do 100 dana (Naumovski 2005). Listovi su uski, šiljatih vrhova te su sakupljeni u rozete. Cijela biljka je prekrivena dlačicama koje joj daju srebrnastu boju što ju u vrijeme kada ne cvjeta čini teško uočljivom u području sivih vapnenačkih stijena. Zbog postojanja endogenih pupova na podzemnim ograncima, pretpostavlja se da je uz spolno, moguće i nespolno tj. klonalno razmnožavanje, iako ono do sada još nije utvrđeno.



Slika 1. Velebitska degenija u cvatu



Slika 2. Komuške velebitske degenije



Slika 3. Prikaz plodova sa dozrelim sjemenkama

1.2. Stanište i ekologija vrste

Velebitska degenija raste na vapnenačkim točilima i u pukotinama stijena s malom količinom tla (Slika 4). Na lokalitetu Šugarska duliba vrsta raste na slabo pokretnim ilirsko-jadranskim primorskim točilima na nadmorskim visinama od 1150 m do 1300 m (Nikolić i sur. 2015). Nalazište kod Tomišine drage u potpunosti dolazi u epimediteranskoj zoni, tj. zoni crnog graba na nadmorskim visinama od 300 m do 450 m (Nikolić i sur. 2015). Iako se lokalitet nalazi u blizini mora i na nižoj nadmorskoj visini nego drugi lokaliteti, klimatski uvjeti su ekstremni zbog intenzivne insolacije i jakih vjetrova (Matijević i sur. 1999). Primjerci biljaka pronađeni na lokalitetu Tomišina draga morfološki su slični primjercima vrste koji se nalaze na drugim lokalitetima, unatoč razlikama u ekološkim uvjetima (Matijević i sur. 1999). Na staništima se nalazi sitno lomljeni kameni sloj nastao pod utjecajem niskih zimskih temperatura koje su uzrokovane jakom burom. Ispod njega se nakuplja planinska crnica fine teksture, koja omogućuje ukorjenjivanje biljaka (Nikolić i sur. 2015). Staništa su otvorenog tipa i bez zasjene. Dostupnost vode u tlu je podložna izraženim oscilacijama uz povremena trajna isušivanja staništa.

Velebitska degenija je kserofit i heliofit visoko specijaliziran za preživljavanje u ekstremnim životnim uvjetima s intenzivnom insolacijom (Stamenković 2012). Kserofitne vrste posjeduju sposobnost prilagodbe na sušna staništa i klimatske uvijete karakterizirane visokim temperaturama zraka. Glavna prilagodba je smanjenje površine biljke kako bi se umanjio gubitak vode transpiracijom. Osim prilagodbi za sprječavanje gubitka vode, kserofitne biljke vodu mogu pohranjivati u korijenu, listovima i stabljikama. Listovi kserofita mogu biti prekriveni sitnim dlačicama što utječe na smanjenje brzine vjetra na površini listova te onemogućuje savijanje listova. Heliofiti su biljne vrste s razvijenim prilagodbama za život na osunčanim staništima izloženim visokim temperaturama. Imaju višu stopu respiracije, nego biljke koje nisu prilagođene izloženosti visokom intenzitetu svjetlosti i visokim temperaturama te je optimalna temperatura za provođenje fotosinteze viša, nego kod ostalih biljaka (Kumar i Bhatia 2012). Kod velebitske degenije uočene su brojne ksenomorfne i heliomorfne adaptacije od kojih su najuočljivije dlačice kojima su prekriveni listovi, kompaktne strukture mezofila i prevladavajuće palisadno tkivo te dobro razvijeni vaskularni sustav u listovima i stabljici, dok opstanak na vrlo vjetrovitim točilima omogućuje jako korijenje i patuljasti rast (Stevanović i Vujnović 1990). Sadrži i izrazito razvijene fiziološke zaštitne mehanizme kojima se štiti od sunčeva UV zračenja (Stamenković 2012).



Slika 4. Stanište velebitske degenije. Između vapnenačkih stijena se ističe velebitska degenija u cvatu.

1.3. Ugroženost

Zbog malog broja poznatih populacija, vrsta se smatra kritično ugroženom te je stoga uvrštena u Crvenu knjigu biljnih vrsta Republike Hrvatske. Jedna je od 45 najugroženijih europskih biljnih vrsta i jedna je od 250 najugroženijih biljaka na svijetu (Naumovski 2005). Prema Zakonu o zaštiti prirode, velebitska degenija je strogo zaštićena vrsta u Hrvatskoj od 1964. godine (Stamenković 2008). Također je zaštićena i Pravilnicima o sakupljanju samoniklih biljaka u svrhu prerade, trgovine i drugog prometa (Nikolić i sur. 2015). Populacije su malobrojne te se sumnja u njihovo smanjivanje od kada je vrsta opisana (Nikolić i sur. 2015). Uzroci ugroženosti su nezakonito sakupljanje jedinki i sjemenki te degradacija njenog prirodnog staništa koje predstavljaju kamenjari, točila i pukotine koji su kolonizirani i prekriveni biljnim vrstama kao što je uskolisna šašika (*Sesleria juncifolia* Suffren) koja ugrožava populacije velebitske degenije i sprječava njihov razvoj (Stamenković 2008). Naseljavanje drugih biljnih vrsta povećava obraštaj i smiruje teren zbog čega točila postaju manje gibljiva (Nikolić i sur. 2015). Djelomičan uzrok zaraštavanja terena je izostanak ispaše (Nikolić i sur. 2015). U svrhu očuvanja vrste, stalne populacije velebitske degenije uzgajaju se zadnjih pola stoljeća u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (Stamenković 2008).

1.4. Uloga genetičkih istraživanja u očuvanju biološke raznolikosti – konzervacijska genetika

Konzervacijska genetika je interdisciplinarna znanstvena disciplina koja kroz populacijsko-genetička istraživanja potencijalno ugroženih prirodnih populacija odnosno svojti, nastoji prepoznati i razumjeti genetičke čimbenike koji ugrožavaju populaciju tj. svojtu od interesa. Endemične vrste, koje su najčešće karakterizirane ograničenim brojem malih populacija, naročito su izložene različitim pogubnim procesima kao što su križanje između blisko srodnih jedinki, postupno genetičko osiromašivanje te gubitak sposobnosti prilagodne na promjene u okolini (Gitzendanner i Soltis 2000, Hoffmann i Sgro 2011, Hylander i Ehrlen 2013, Frankham i sur. 2014). Također, usko endemične svojte su najčešće vezane za rijetka i osjetljiva staništa, čime se razina njihove ugroženosti dodatno povećava (Karron 1987, Lopez-Pujol i sur. 2013). Vjeruje se da su fragmentacija staništa, antropogeno djelovanje na pojedine specifične tipove staništa, pojava invazivnih vrsta, prekomjerno sakupljanje odnosno izlov, kao i klimatske promjene, glavni uzroci izumiranja vrsta (Bellard i sur. 2012, Breed i sur. 2012). Suočene sa smanjenim protokom gena ili njegovim potpunim izostankom, kod malih i izoliranih populacija dolazi do postupne među-populacijske genetičke diferencijacije i istovremenog unutar-populacijskog genetičkog osiromašenja (Bouzat i sur. 1998, Honnay i sur. 2007, Frankham i sur. 2009, Dixo i sur. 2009). Ako se kod takvih populacija javi smanjena sposobnost prilagodbe, ona može biti pogubna i to posebno za one populacije koje se nalaze na tipovima staništa koja su ionako podložna prirodnih oscilacijama (Brzyski i Culley 2011). Kako bi se pravovremeno mogla osmisliti i provesti strategija zaštite za takve populacije tj. svojte, nužno je provođenje detaljnih populacijsko-genetičkih istraživanja usmjerenih na stjecanje što kvalitetnijeg znanja u sveukupnom genetičkom statusu populacije odnosno svojte (Gitzendanner i sur. 2012, Zaya i sur. 2017).

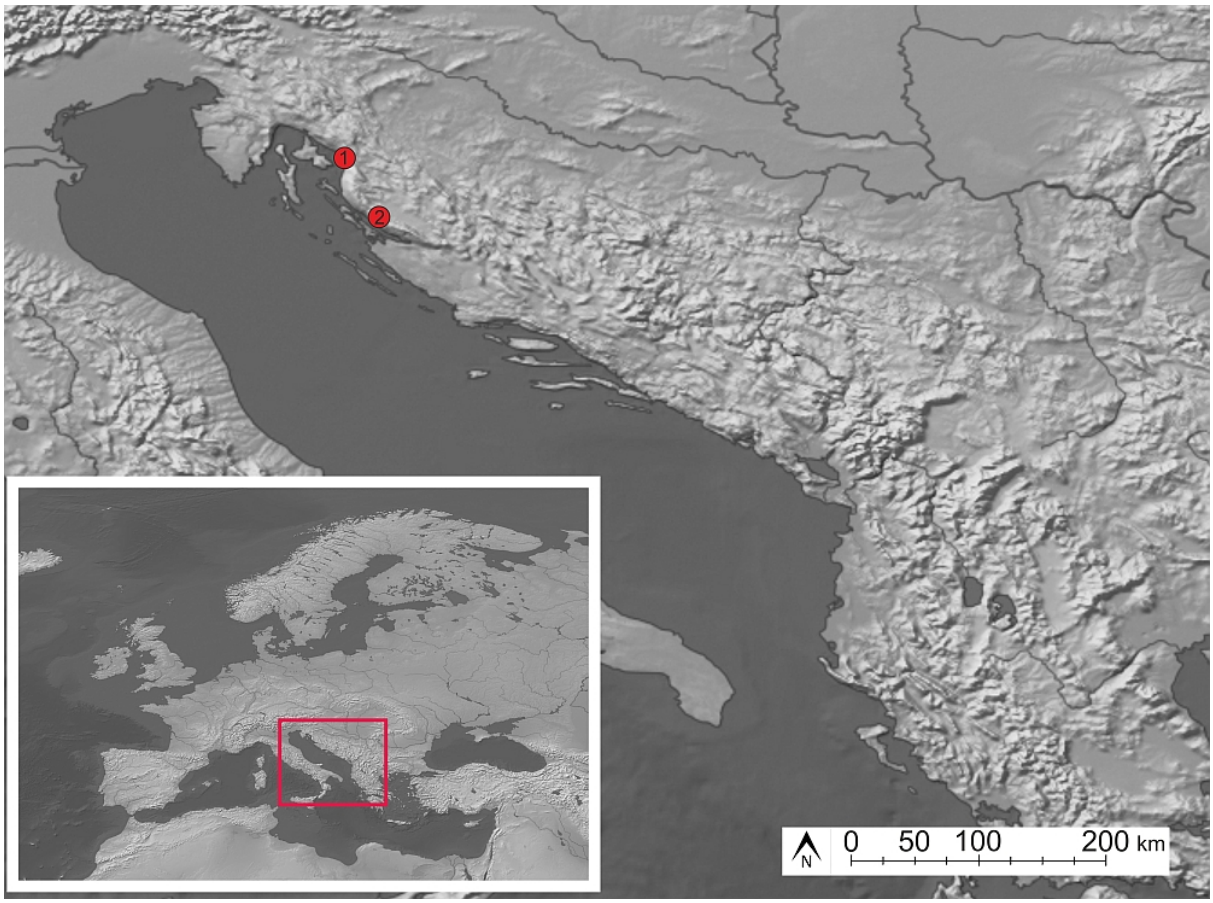
1.5. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrđivanje populacijsko-genetičke strukture dviju najvećih populacija velebitske degenije koje se nalaze na lokalitetima Tomišina draga i Šugarska duliba. Pritom su korišteni mikrosatelitni molekularni biljezi koji predstavljaju idealno oruđe u ovakvom tipu istraživanja gdje se nastoje utvrditi genetički odnosi između blisko srodnih jedinki. S obzirom na iznimno mali broj populacija ove vrste, specifičnosti staništa na kojem raste kao i zbog postojanja opravdane sumnje u smanjenje broja jedinki u prirodnim populacijama, nužna je pravovremena procjena genetičkog statusa vrste kao osnovnog preduvjeta za osmišljavanje i provedbu eventualnih konzervacijskih aktivnosti u budućnosti kako bi se vrsta očuvala.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorci za analizu

Prikupljeno je 65 uzoraka iz populacije velebitske degenije na lokalitetu Tomišina draga i 60 uzoraka iz populacije na lokalitetu Šugarska duliba (Slika 5). Nakon prikupljanja, biljni materijal je osušen u silika gelu nakon čega se pristupilo izolaciji DNA.



Slika 5. Geografski položaj istraživanih populacija velebitske degenije: lokalitet Tomišina draga (1) i lokalitet Šugarska duliba (2).

2.2. Izolacija DNA

Izolacija DNA iz biljnog tkiva provedena je primjenom izolacijskog kompleta GenElute™Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Navedeni izolacijski komplet omogućuje jednostavnu i brzu izolacija DNA iz biljnog materijala. DNA je moguće izolirati iz 100 mg svježeg tkiva ili iz 20 mg isušenog biljnog materijala. Očekivani DNA fragmenti dobiveni ovakvom izolacijom su dulji od 20 kb te stoga pogodni za umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom.

2.3. Elektroforeza DNA na agroznom gelu

Elektroforeza DNA na agaroznom gelu je često korištena laboratorijska tehnika koja omogućuje razdvajanje i vizualizaciju fragmenata DNA ovisno o njihovoj veličini. Gel koji se pritom koristi, nalazi se u odgovarajućem puferu i električnom polju. Metoda se temelji na kretanju molekula u električnom polju, ovisno o njihovom naboju i veličini. Pozitivno nabijene molekule kretati će se prema negativno nabijenoj elektrodi, dok će se one negativno nabijene kretati prema pozitivno nabijenoj elektrodi (http://www.yourgenome.org/). Manje molekule se zbog manjeg otpora gela kreću brže od većih. DNA molekula je negativno nabijena jer u svojoj strukturi sadrži negativno nabijenu fosfatnu komponentu te se u električnom polju kreće prema pozitivno nabijenoj elektrodi. Agarozni gel koji se koristi je propustan te omogućuje kretanje molekula u gelu prema izvoru naboja. Gelovi koji sadrže veću koncentraciju agaroze su gušći i koriste se prilikom odvajanja manjih fragmenata DNA, dok se za veće fragmente koriste gelovi sa nižom koncentracijom agaroze (http://www.yourgenome.org/). Vizualizaciju DNA ostvaruje se bojanjem i to najčešće etidijevim bromidom koji interkalira u dvolančanu, golu DNA molekulu te fluorescira narančasto prilikom osvjetljavanja ultra-ljubičastom svjetlosti. Tada su na gelu vidljive vrpce koje označavaju DNA fragmente različite veličine.

2.4. Lančana reakcija polimerazom

PCR (Polymerase Chain Reaction) ili lančana reakcija polimerazom je brza i jeftina tehnika koja se koristi za dobivanje velikog broja kopija određenih regija DNA molekule. Lančana reakcija polimerazom je često korištena tehnika i smatra se jednim od najvećih znanstvenih postignuća 20.st. na području molekularne biologije. Za umnožavanje željenog DNA fragmenta, tri su osnovna koraka koji se uzastopno ponavljaju u većem broju ciklusa: 1) razdvajanje komplementarnih DNA lanaca na povišenoj temperaturi, 2) vezanje početnica na željene položaje na kalupu DNA te 3) sinteza komplementarnih DNA lanaca posredstvom DNA polimeraze pri čemu ponovno nastaje dvolančana DNA. Ponavljanje procesa 30 do 40 puta omogućuje nastanak više od 10^{12} kopija ciljanog fragmenta DNA molekule (http://www.genome.gov/).

2.5. Mikrosatelitni molekularni biljezi

Jednostavne ponavljajuće sekvence (eng. SSR – Simple Sequence Repeats) ili mikrosateliti predstavljaju regije DNA u kojima dolazi do uzastopnog ponavljanja određenog oligonukleotida, tzv. mikrosatelitnog motiva. Mikrosatelitni motivi se obično sastoje od 2 do 5 baznih parova koji se ponavljaju od 5 do 50 puta (Turnpenny i Ellard 2005). Mikrosateliti su kodominantni molekularni markeri (mogu razlikovati homozigotne od heterozigotnih jedinki) jednostavne primjene koja se temelji na lančanoj reakciji polimerazom uz primjenu specifičnih početnica. Za analizu temeljenu na mikrosatelitnim molekularnim biljezima, potrebna je mala količina DNA jer prilikom lančane reakcije polimerazom dolazi do eksponencijalnog porasta količine umnoženog fragmenta (Griffiths i sur. 1996). Mikrosatelitni lokusi su iznimno polimorfni te nerijetko sadrže više desetaka alela na svakom lokusu (Zhivotovsky i Feldmant 1995). Također, karakteriziraju ih iznimno visoke stope mutacija te su zbog toga prikladni za korištenje u populacijskoj genetici. Neke od prednosti njihove upotrebe kao molekularnih biljega u istraživanjima su dostupnost, kodominantnost, informativnost i visoka razina ponovljivosti. Osim prednosti, mikrosateliti pokazuju i određene nedostatke. Jedan od njih je specifičnost s obzirom na vrstu zbog čega se za svaku pojedinu vrstu mikrosatelitne početnice najčešće moraju razvijati zasebno (Greguraš 2013). Uz to, za njihovo razvijanje su potrebna laboratorijska stručnost kao i značajna financijska sredstva.

2.6. Opis postupka izolacije DNA i provedene genotipizacije

Izolacija je provedena upotrebom GenElute™Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) kompleta za izolaciju. Prvi korak je usitnjavanje 25 mg isušenog biljog tkiva koje se vrši pomoću uređaja za usitnjavanje, Tissuelyser (QIAGEN). Zatim slijedi dodavanje dviju otopina za razgradnju stanica, (*Lysis Solution* A i B) i to u količinama od 350 μL odnosno 50 μL. Uzorak se promiješa na miješalici te se zagrijava 10 minuta na temperaturi od 65 °C. Prilikom zagrijavanja, uzorak se povremeno promiješa. Nakon toga, dodaje se 130 μL otopine za taloženje ostataka tkiva (*Precipitation Solution*). Uzorak se dobro promiješa i ostavi 5 minuta na temperaturi od -20 °C. Zatim slijedi centrifugiranje kroz 5 minuta na brzini od 15 000 okr./min.. Nakon centrifugiranja, supernatant se odpipetira na plavi filter. Centrifugira se 1 minutu na brzini od 15 000 okr./min.. Na taj način, uklanjaju se svi zaostali dijelovi stanica koji nisu uklonjeni u prethodnom koraku. Plavi filter se baca, a u epruvetu s tekućinom se dodaje 700 μL otopine za vezanje DNA (*Binding Solution*), kako bi se DNA iz uzorka povezala na filter u sljedećem koraku. Potom se na crvene filtere koji su predviđeni za prihvat DNA dodaje 500 μL otopine za pripremu filtera za prihvat DNA (*Column Preparation Solution*). Nakon centrifugiranja kroz 1 minutu i na 10000 okr./min., u pripremljenu kolonu dodaje se 700 μL uzorka. Ponovno se centrifugira 1 minutu na brzini od 15 000 okr./min.. Tekućina se baca, a ostavlja se crveni filter na koji se vezala DNA. Postupak se ponavlja sa ostatkom uzorka. Crveni filteri se na posljetku prebacuju u nove epruvete od 2 ml te se vrši dvostruko ispiranje filtera sa po 500 μL otopine za ispiranje (Wash Solution). Nakon prvog ispiranja uzorci se centrifugiraju 1 minutu na brzini od 15 000 okr./min., dok se centrifugiranje nakon drugog ispiranja provodi na istoj brzini, ali kroz 3 minute. U završnom koraku izolacije DNA, filteri s vezanom DNA se prebacuju u nove epruvete, dodaje se 100 μL TE pufera koji služi za ispiranje DNA sa filtera te se provodi zadnje centrifugiranje na 15000 okr./min. u trajanju od 1 minute. Tako izolirana DNA je visoke čistoće i prikladna za dugotrajno skladištenje na temperaturi od -20 °C. Kvaliteta izolirane DNA se utvrđuje elektoroforezom na agaroznom gelu uz bojanje etidijevim-bromidom. Jasno definirane vrpce DNA na agaroznom gelu sugeriraju da je DNA visoke kvalitete, tj. da u procesu izolacije nije došlo do njezine degradacije na manje fragmente. Koncentracija se utvrđuje spektrofotometrijski na uređaju NanoPhotometer® P330 IMPLEN.

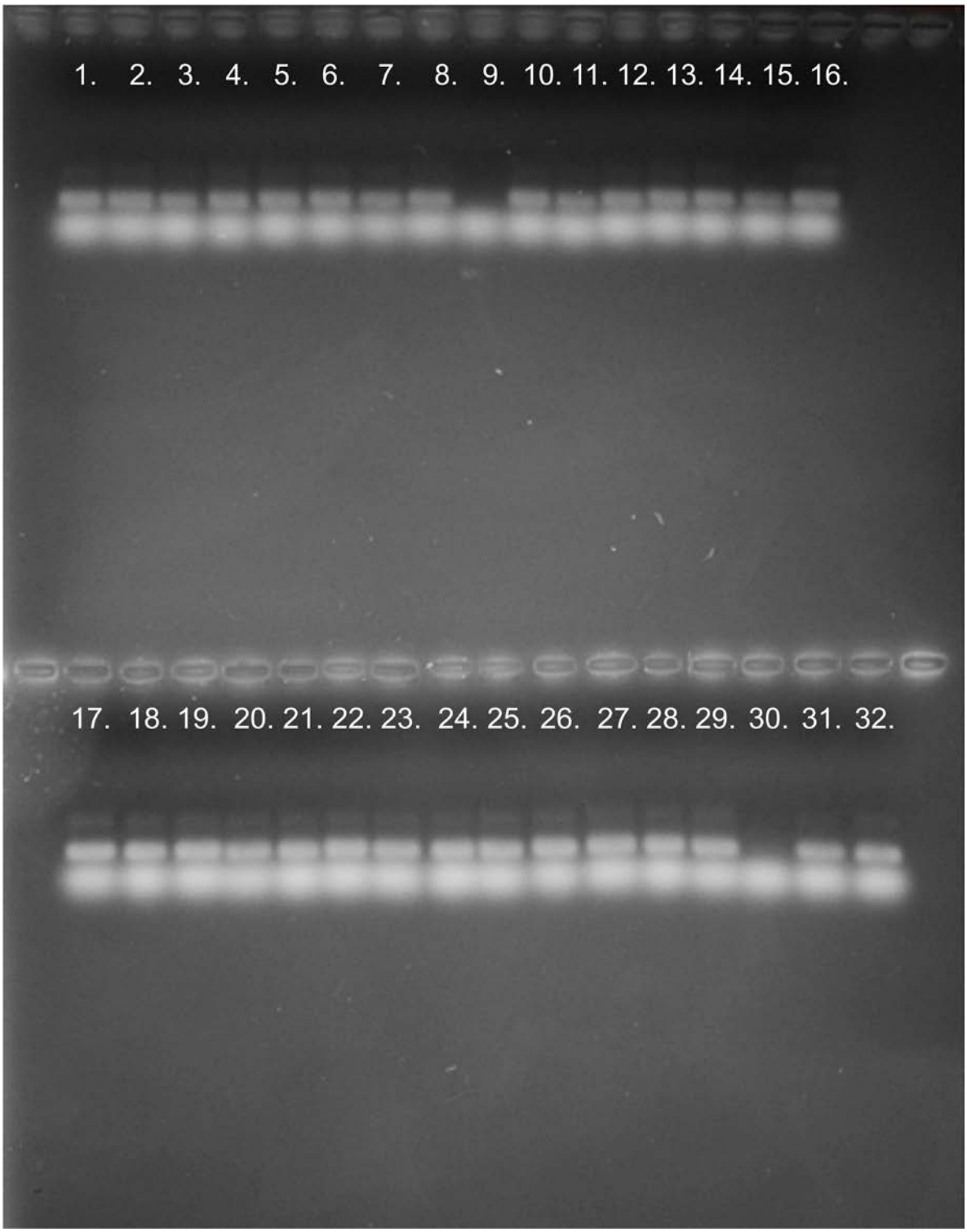
Nakon utvrđivanja koncentracije DNA, slijedi razrjeđivanje uzoraka na koncentraciju od 1 ng/μL. Tako razrijeđeni uzorci koriste se za lančanu reakciju polimerazom za koju se koriste početnice navedene u Tablici 1 (Radosavljević i sur. 2014). Ukupni volumen reakcijske smjese koja se koristi za lančanu reakciju polimerazom iznosi 20 μL . Smjesa sadrži 10 x PCR pufer (PCR *Buffe*r), 1.5 mM MgCl2, 0.2 mM svake baze (dNTP), 0.075 μL TAIL FOR primer, 0.2 μL TAIL REV primer, 0.2 μL M13 primer, 0.5 μL Taq HS polimeraze (*Polymerase*) (Takara, Bio Inc.). Lančana reakcija polimerazom provodi na GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems® uređaju uz *Touchdown* protokol prema sljedećem režimu:

- 94˚C kroz 5 min
- 5 ciklusa od 45 s na 94˚C, 30 s na 60˚C uz snižavanje temperature u svakom od preostala 4 ciklusa za 1˚C i 90 s na 72˚C
- 25 ciklusa od 45 s na 94˚C, 30 s na 55˚C i 90 s na 72˚C
- 72˚C kroz 8 min

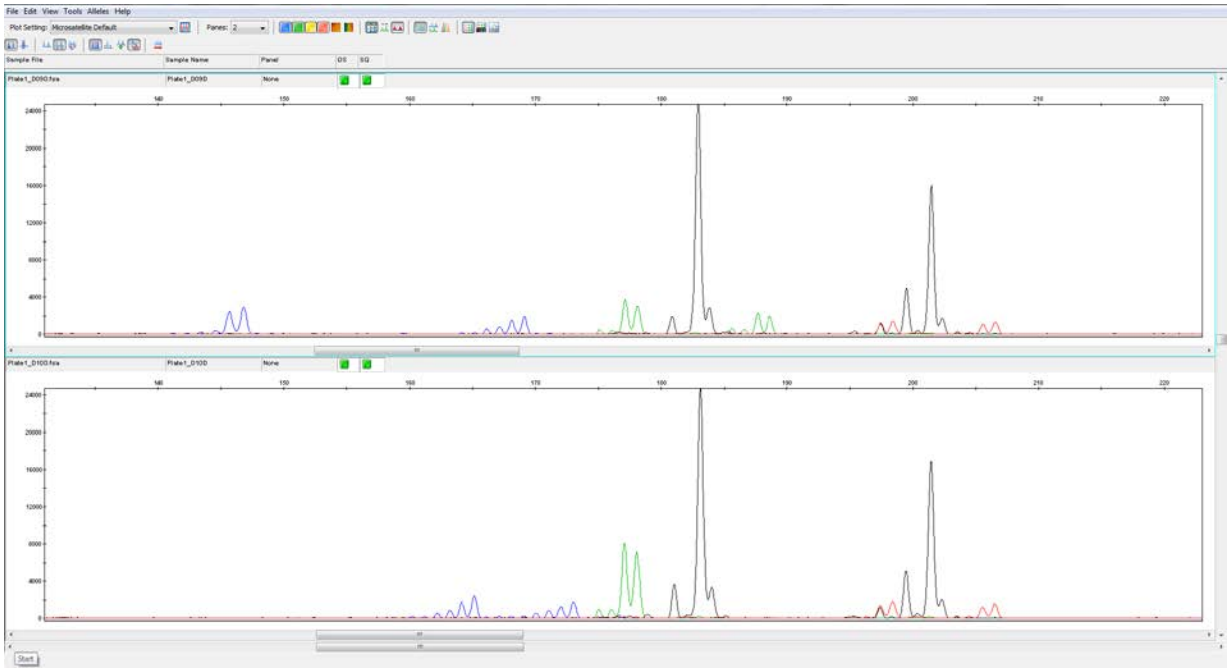
Tablica 1. Redoslijed nukleotida početnica za umnožavanje pripadajućih mikrosatelitnih lokusa velebitske degenije

Naziv lokusa	Redoslijed nukleotida pripadajućih početnica (5'-3')
DvUZ001	F: CAACACTTTTGGCGTGCTTA R: ATGGCCCATTGCAGAAGTTA
DvUZ002	F: GACGGAGACTTGCTCTCAGC R: TAGGGCCGAGATCCACTAGA
DvUZ004	F: AGCTACGTCAACGGACAAGA R: TCATGTTTTCGGTCAAGCAG
DvUZ006	F: GACACGCAGAGCCAAAGAGT R: AGCTGTTCCAGGAAACGAAA
DvUZ007	F: GGACTGGGAACAAAGTGATGA R: TCTCCTTTAGATGGAGCAGCA
DvUZ008	F: CAAGCGAGGAGAGTGTGTTG R: TGTCATGAAGTGCCTTGAGC
DvUZ010	F:TTCTTCTTCATTTCTCATCAGATTC R:AAAGGAGAGATAGAACGAAAAGGA
DvUZ012	F: TCACAACAACACACGCTGAA R: GTGGGGAGTATTTGGGAGGT

Za vizualizaciju dobivenih PCR produkata koristi se elektroforeza na agaroznom gelu, dok je bojanje DNA ponovno provedeno editijevim-bromidom (Slika 6). Umnoženi mikrosatelitni lokusi poslani su u Macrogen Inc. (Seul, Južna Korea) s ciljem genotipizacije. Razdvajanje umnoženim alela temeljem razlike u njihovoj veličini ostvareno je kapilarnom elektroforezom na uređaju ABI 3730XL, dok je njihovo očitavanje provedeno pomoću računalnog programa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) (Slika 7) .



Slika 6. Elektroforegram 32 uzorka velebitske degenije nakon umnožavanja lokusa DvUZ001 lančanom reakcijom polimerazom.



Slika 7. Prikaz utvrđivanja veličine alela za dva uzorka nakon umnožavanja lokusa DvUZ001, DvUZ002, DvUZ004 i DvUZ006 lančanom reakcijom polimerazom, u računalnom programu GeneMapper 4.0. Sa X osi se očitava veličina pojedinog alela izražena kao broj baznih parova.

2.7. Laboratorijska oprema i pribor

2.7.1. Popis korištenih uređaja

- Tissuelyser (QIAGEN)
- NanoPhotometer® P330 IMPLEN
- Uređaj za PCR GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems
- Centrifuga Hettich MIKRO 200
- Miješalica (Vortex)
- Hladnjak
- UV lampa
- Aparat za fotografiranje

2.7.2. Popis korištenog pribora

- Pipete
- Multikanalna pipeta
- Autoklavirani nastavci za pipetiranje različitih veličina
- Aluminijska folija
- Stalak za hlađenje
- Pločice za uzorke s 96 mjesta
- Kada za elektroforezu
- Stalak za gel
- Kada za bojanje i ispiranje gela
- Zaštitne rukavice

2.8. Opis korištenih statističkih metoda

2.8.1. Informacijski sadržaj polimorfizma

Informativnost određenog mikrosatelitnog molekularnog biljega moguće je procijeniti korištenjem informacijskog sadržaja polimorfizma (*Polymorphism Information Content*; *PIC*). To je mjerilo alelne raznolikosti koje pokazuje udio informativnog potomstva, što znači da prikazuje vjerojatnost upotrebe genotipa potomaka kako bi se saznalo od kojeg roditelja su naslijeđeni određeni aleli. Izračunava se prema formuli:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{I} p_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^{I} \sum_{j=1}^{I-1} p_i^2 p_j^2$$

Gdje je: p_i učestalost alela *i* u populaciji, a *I* ukupan broj alela.

2.8.2. Unutar-populacijska raznolikost mikrosatelita

Raznolikost mikrosatelitnih molekularnih biljega na unutar-populacijskoj razini može se utvrditi izračunavanjem prosječnog broja alela po lokusu (N_a), alelnog bogatstva (N_{ar}), broja jedinstvenih alela (N_{pr}) te zapažene heterozigotnosti (H_O) i očekivane heterozigotnosti (H_E). Alelno bogatstvo je procjena prosječnog broja alela neovisna o veličini uzorka. Izračunava se prema formuli :

$$N_{ar} = \sum_{i=1}^{n_i} \left[1 - \frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right]$$

Gdje je: *N* broj uzorkovanih jedinki, 2*N* broj uzorkovanih alela, N_i broja alela *i* u populaciji, *n* broj poduzorkovanih jedinki (veličina najmanjeg uzorka u analizi), 2*n* broj poduzorkovanih alela.

Jedinstveni aleli (*private alleles*) su aleli koji se pojavljuju u jedinkama samo jedne od promatranih populacija. Zapažena heterozigotnost (*observed heterozigosity*; H_O) je udio heterozigota u istraživanim populacijama. Očekivana heterozigotnost (*expected heterozigosity*; H_E) je udio jedinki u populaciji koje bi bile heterozigotne nakon jedne generacije nasumične oplodnje. Računa se prema sljedećoj formuli:

$$H_E = \frac{n}{n-1}\left(1 - \sum_{i=1}^{I} p_i^2 - \frac{H_o}{2n}\right)$$

Gdje je: H_E nepristrana genska raznolikost po Neiju, n veličina uzorka, p_i učestalost alela i u populaciji, I ukupan broja alela, H_O zapažena heterozigotnost.

2.8.3. Genetičko usko grlo

Genetičko usko grlo je pojava gubitka genetičke raznolikosti uzrokovana naglim smanjenjem veličine populacije te zapravo predstavlja ekstreman oblik genetičkog pomaka (*genetic drift*). Pri tome dolazi do nestanak rijetkih alela iz populacije, dok aleli koji su i ranije bili karakterizirani visokim učestalostima to ostaju i dalje. Upravo zahvaljujući navedenome, prolazak populacije kroz genetički usko grlo se i može prepoznati populacijsko-genetičkim istraživanjima. Vrijednost očekivane heterozigotnosti (H_E) prvenstveno ovisi o alelnoj učestalosti. Uzevši u obzir da aleli visokih učestalosti (koji ujedno i najviše utječu na vrijednost očekivane heterozigotnosti) su približno jednako zastupljeni u populaciji prije i poslije njenog prolaska kroz genetičko usko grlo, jasno je da se vrijednost očekivane heterozigotnosti tek neznatno mijenja prilikom takvog događaja. Istovremeno, heterozigotnost očekivana kod populacije u kojoj postoji ravnoteža mutacija i genetičkog pomaka (H_{EQ}) prvenstveno ovisi o broju alela (kako se u genetičkom uskom grlu upravo ukupni broj alela drastično smanjuje, time i ova vrijednost doživljava značajnu korekciju). Stoga, kod populacija u kojima je nedavno došlo do pojave genetičkog uskog grla, većina lokusa pokazuje višak heterozigotnosti u smislu $H_E > H_{EQ}$ te je na taj način moguće prepoznati ovaj fenomen. Prolazak populacije kroz genetičko usko grlo se utvrđuje s obzirom na tri teorijska mutacijska modela kojima se opisuju mutacije mikrosatelitnih lokusa. Najjednostavniji model je model beskonačnog broja alela (*Infinite Allele Model*) (Kimura i Crow 1964) kod kojeg je pretpostavka da iz bilo kojeg alela mutacijom može nastati bilo koji drugi alel uz jednaku vjerojatnost. Model postupnih mutacija (*Stepwise Mutation Model*) (Ohta i Kimura 1973) smatra se najvažnijim modelom za stvaranje novih alela kod mikrosatelita. Pretpostavlja da novi aleli nastaju postupno povećanjem ili smanjenjem broja ponavljajućih motiva za jedan. Pri tome postoji konstantna stopa mutacije lokusa, pri čemu se stvara Gaussova raspodjela učestalosti alela (Ellegren 2004). Budući da u stvarnosti mikrosateliti najčešće u potpunosti ne slijede niti jedan od navedenih modela, uveden je i treći, tzv. dvofazni model (*Two-Phase Model*) (Di Rienzo i sur. 1994) prema kojem dio mutacija nastaje na način kao što to opisuje model beskonačnog broja alela, a dio nastaje prema modelu postupnih mutacija. U većini istraživanja koja se baziraju na mikrosatelitne biljege, upravo se dvofazni model uzima kao jedini relevantan.

2.8.4. Hardy-Weinbergova ravnoteža

Prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, učestalosti alela i genotipova u nekoj populaciji su konstantne iz generacije u generaciju, ukoliko u populaciji nisu prisutni procesi koji mogu utjecati na genetičku strukturu populacije. Neki od tih procesa su mutacije, genetički pomak, nenasumično razmnožavanje jedinki u populaciji te protok gena. Budući da su u prirodi barem neki od tih procesa uvijek prisutni, Hardy-Weinbergova ravnoteža predstavlja idealno i teoretsko stanje populacije te se koristi kao referentno stanje populacije naspram kojeg se utvrđuje stvarno tj. zatečeno stanje neke prirodne populacije. Prilikom utvrđivanja nalazi li se populacija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, potrebno je odrediti fiksacijski indeks (F_{IS}). Fiksacijski indeks predstavlja mjerilo smanjenja heterozigotnosti promatrane populacije u odnosu na teoretsku populaciju koja se nalazi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Izračunava se prema klasičnoj formuli po Wright-u:

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_0}{H_E}$$

Gdje je: F_{IS} fiksacijski indeks, H_O zapažena heterozigotnost, H_E očekivana heterozigotnost.

Smatra se da se populacija nalazi u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži u slučaju kada je F_{IS}=0. U slučaju kada je $F_{IS} > 0$ smatra da je u populaciji prisutan nedostatak heterozigota, što može biti uzrokovano izraženom samooplodnje te križanjem blisko srodnih jedinki. Upravo zbog toga, F_{IS} se još naziva i indeksom unutarpopulacijske endogamije ili indeksom samooplodnje (*Inbreeding Coefficient)*. Osim nedostatka heterozigotnosti, moguće je postojanje viška heterozigota u populaciji i tada je $F_{IS} < 0$ što može ukazivati na favoriziranje heterozigotnih jedinki prilikom prirodnog odabira. Također je važno naglasiti da se lažna slika o razini heterozigotnosti može dobiti ako su na pojedinom lokusu prisutni tzv. null-aleli. Null-aleli predstavljaju alele koji kod uzoraka zbilja postoje, no zbog određenih razloga ne budu detektirani analizom. Najčešći razlog zbog kojeg do toga dolazi je mutacija DNA u onome djelu gdje se u lančanoj reakciji polimerazom vežu početnice. Kao posljedica nevezanja početnice, ne dolazi do umnažanja tog alela, te stoga on ostaje nezabilježen. Kako bi se otkrila prisutnost null-alela, u statističkoj obradi podataka koristi se računalni program MICRO-CHECKER v.2.2.3., koji je također korišten i u ovom istraživanju.

2.8.5. Analiza molekularne varijance (AMOVA)

Analiza molekularne varijance (*Analysis of Molecular Variance*) je statistička metoda koja se koristi za utvrđivanje varijacija na molekularnoj razini unutar vrste. Pomoću analize molekularne varijance izračunava se varijanca između populacija (inter-populacijska razina), kao i varijanca između jedinki iste populacije (intra-populacijska razina). Utvrđene razlike na unutar-populacijskoj i među-populacijskoj razini su dvije sastavnice varijance.

2.9. Analiza eksperimentalno dobivenih podataka

Veličina umnoženih mikrosatelitnih lokusa izražena je kao broj baznih parova. Prikazana je za svih osam promatranih lokusa (Prilog 1, 2, 3, i 4), za ukupno 125 jedinki velebitske degenije s lokaliteta Tomišina draga i Šugarska duliba. Nakon provedene genotipizacije, dobiveni podaci se statistički obrađuju uz pomoć računalnih programa Micro-Checker ver. 2.2.3, PowerMarker ver. 3.23 , Genepop ver. 4.0, Microsat ver. 1.5d, FSTAT ver. 2.9.3.2, Bottleneck ver. 1.2.02, Arlequin ver. 3.5 te programskog paketa Phylip ver. 3.6b s potprogramima Seqboot, Gendist, Neighbor i Consense. U svrhu utvrđivanja informativnosti mikrosatelitnih molekularnih biljega za promatrane lokuse određen je informacijski sadržaj polimorfizma. Potencijalni prolazak populacija kroz genetičko usko grlo utvrđen je na temelju signifikantnosti Wilcoxonovog testa za suvišak i nedostatak heterozigotnosti u odnosu na heterozigotnost populacije koja je u ravnoteži mutacija i pomaka i to na temelju modela beskonačnog broja alela, modela postupnih mutacija te dvofaznog modela. Izračunat je fiksacijski indeks koji pokazuje nalazi li se populacija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Pomoću analize molekularne varijance utvrđeno je koliki dio od ukupne genetske varijabilnosti potječe s unutar-populacijske, a koliki s među-populacijske razine. Na posljetku, pomoću računalnog programa Microsat (ver. 1.5d) je matrica umnoženih mikrosatelitnih alela korištena za izradu matrice genske udaljenosti između genotipova na temelju udjela zajedničkih alela (Proportion of Shared Alleles Distance; D_{psa}). Nezakorijenjeno Neighbor-joining stablo (NJ) kao grafički prikaz stupnja genetske sličnosti između jedinki odnosno skupina jedinki je generirano na temelju matrice D_{psa}.

4. REZULTATI

Analizom osam mikrosatelitnih lokusa utvrđene su vrijednosti informacijskog sadržaja polimorfizma (Tablica 2). Najviša vrijednost zabilježena je kod lokusa DvUZ002 (0,878), dok je najniža zabilježena kod lokusa DvUZ010 (0,338). Kod ukupno šest lokusa zabilježene su umjereno visoke i visoke vrijednosti informacijskog sadržaja polimorfizma (DvUZ001, DvUZ002, DvUZ004, DvUZ006, DvUZ007, DvUZ008), dok su kod dva lokusa (DvUZ010, DvUZ012) te vrijednosti niske (0,338 i 0,368) pa stoga te lokuse možemo smatrati slabo informativnima (Tablica 2). Prisutnost null-alela nije detektirana niti kod jednog lokusa. Na promatranim lokusima su ukupno zabilježena 62 alela. Svi lokusi su polimorfni te se broj alela po lokusu kreće od tri (DvUZ010 i DvUZ012) do 29 (DvUZ002). Prosječan broj alela po lokusu je 7,75 (Tablica 2).

Tablica 2. Karakterizacija osam mikrosatelitnih lokusa velebitske degenije

Br.	Lokus	Ponavljajući motiv	Raspon dužina umnoženih ulomaka (pb)	Na	PIC
1	DvUZ001	$(GT)_{12}$	182-188	3	0,513
2	DvUZ002	$(GA)_{31}$	186-266	29	0,878
3	DvUZ004	$(GT)_{14}$	137-143	4	0,487
4	DvUZ006	$(AGA)_{11}$	183-201	5	0,608
5	DvUZ007	$(ACT)_{13}$	135-198	9	0,811
6	DvUZ008	$(AGA)_{16}$	139-154	6	0,483
7	DvUZ010	$(GA)_{18}$	125-137	3	0,338
8	DvUZ012	$(GA)_{14}$	181-189	3	0,368
	Prosjek			7,75	0,561
	Ukupno			62	

Na – ukupan broj alela, PIC - Informacijski sadržaj polimorfizma (*Polymorphism Information Content*)

Promatrano po populacijama, u populaciji s lokaliteta Tomišina draga je zabilježeno više alela pa time i veći prosječan broj alela po lokusu (52 odnosno 6,5) nego u populaciji s lokaliteta Šugarska duliba za koju su te vrijednosti niže i iznose 37, odnosno 4,62 (Tablica 3). Broj jedinstvenih alela kod populacije iz Tomišine drage je također veći te iznosi 25, dok je kod populacije iz Šugarske dulibe zabilježeno tek 10 jedinstvenih alela (Tablica 3). Utvrđene razine očekivane i opažene heterozigotnosti su vrlo slične kod obje populacije te iznose 0,448 i 0,441 za populaciju iz Tomišine drage, odnosno 0,497 i 0,531 za populaciju iz Šugarske dulibe (Tablica 3). Koeficijent samooplodnje (F_{IS}) kod populacije iz Tomišine drage ima vrijednost od 0,038 koja je statistički nesignifikantna, dok je vrijednost koeficijenta samooplodnje od -0,069 zabilježena kod populacije s lokaliteta Šugarska duliba statistički umjereno signifikantna ($P < 0.01$) (Tablica 3).

Tablica 3. Populacijsko genetički pokazatelji za populacije velebitske degenije s lokaliteta Tomišina draga i Šugarska duliba

Tomišina draga	Lokus	N_a	N_{pr}	H_O	H_E	F_{IS}	P(F_{IS})
	DvUZ001	3	0	0,286	0,344	0,169	0,122
	DvUZ002	25	16	0,968	0,914	-0,060	0,070
	DvUZ004	2	1	0,238	0,211	-0,127	0,389
	DvUZ006	3	0	0,159	0,148	-0,070	0,678
	DvUZ007	9	4	0,794	0,840	0,056	0,088
	DvUZ008	5	2	0,238	0,233	-0,020	0,645
	DvUZ010	2	1	0,397	0,431	0,080	0,368
	DvUZ012	3	1	0,365	0,459	0,205	0,063
	Prosjek	6,500					
	Ukupno	52	25	0,431	0,448	0,038	0,424
Šugarska duliba	Lokus	N_a	N_{pr}	H_O	H_E	F_{IS}	P(F_{IS})
	DvUZ001	3	0	0,158	0,148	-0,068	0,711
	DvUZ002	13	4	0,877	0,811	-0,082	0,071
	DvUZ004	3	2	0,667	0,637	-0,047	0,605
	DvUZ006	5	2	0,790	0,764	-0,033	0,307
	DvUZ007	5	0	0,632	0,593	-0,064	0,206
	DvUZ008	4	1	0,544	0,497	-0,094	0,115
	DvUZ010	2	1	0,246	0,243	-0,009	0,713
	DvUZ012	2	0	0,333	0,280	-0,192	0,167
	Prosjek	4,625					
	Ukupno	37	10	0,531	0,497	-0,069	0,009

N_a – broj alela, N_{pr} – broj jedinstvenih alela, H_O – uočena heterozigotnost, H_E – očekivana heterozigotnost, F_{IS} – koeficijent samooplodnje, P(F_{IS}) – signifikantnost vrijednosti koeficijenta samooplodnje

Rezultati testiranja postojanja genetičkog uskog grla sugeriraju da niti jedna populacija nedavno nije doživjela značajno i naglo smanjenje efektivne veličine populacije (Tablica 4). Vrijednosti za dvofazni model nisu statistički signifikantne te iznose 0,770 i 0,473 za populacije s lokaliteta Tomišina draga odnosno Šugarska duliba (Tablica 4). I uz preostala dva teorijska mutacijska modela (model beskonačnog broja alela i model postupnih mutacija), genetičko usko grlo nije zabilježeno niti u jednoj populaciji te su dobivene vrijednosti uglavnom statistički nesignifikantne. Izuzetak je jedino prisutan prema modelu beskonačnog broja alela i to za populaciju iz Šugarske dulibe (*P(E)*=0,027) (Tablica 4). Uzevši u obzir da se ne radi o mutacijskom modelu prema kojem mikrosatelitni lokusi mutiraju, možemo zaključiti da spomenuti rezultat nije od većeg značenja.

Tablica 4. Prikaz signifikantnosti Wilcoxonovog testa za višak (P(E)) odnosno manjak (P(D)) heterozigota utvrđen kod populacija velebitske degenije s lokaliteta Tomišina draga i Šugarska duliba

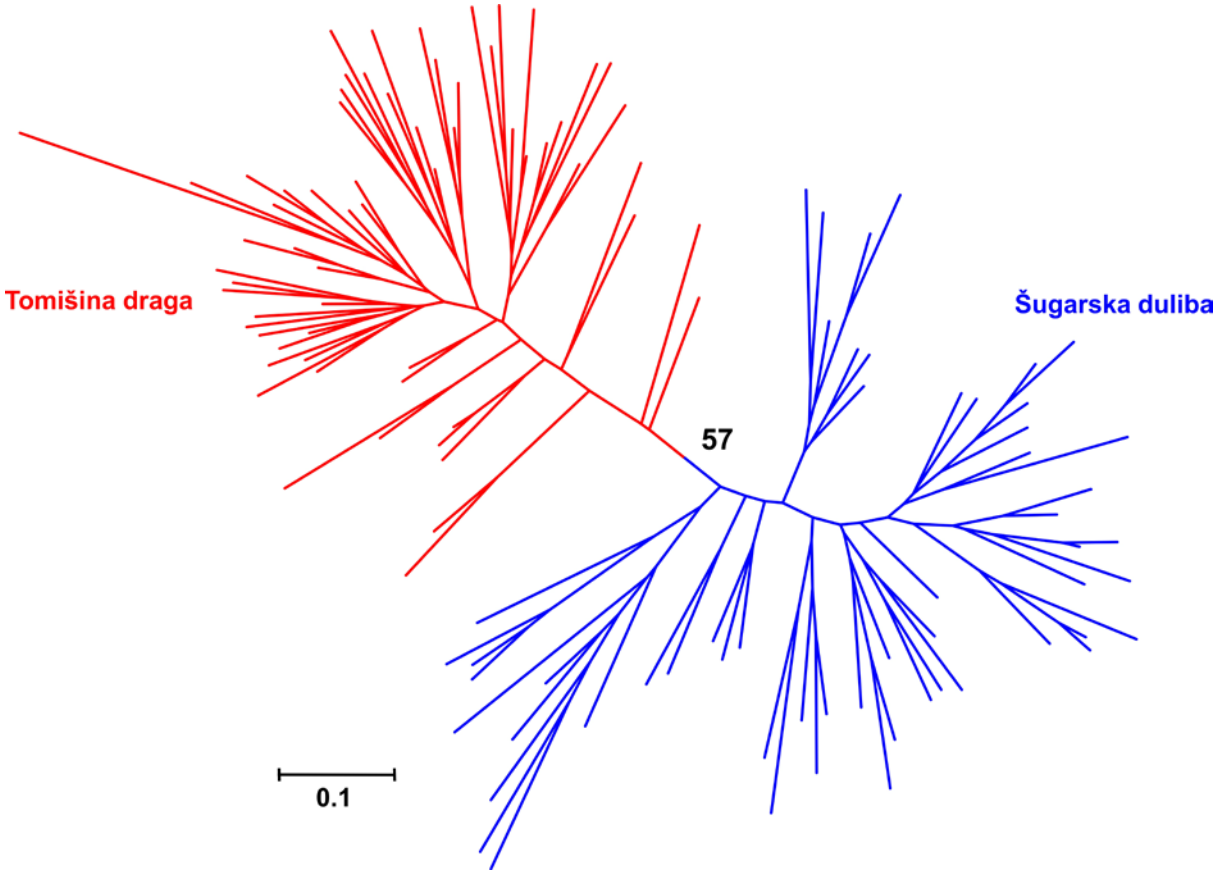
	IAM	IAM	TPM	TPM	SMM	SMM
Populacija	*P(D)*	*P(E)*	*P(D)*	*P(E)*	*P(D)*	*P(E)*
Tomišina draga	0,770	0,273	0,273	0,770	0,125	0,902
Šugarska duliba	0,980	0,027	0,578	0,473	0,320	0,727

IAM - model beskonačnog broja alela, TPM - dvofazni model, SMM - model postupnih mutacija, *P(E)* - Signifikantnost Wilcoxonovog testa za suvišak heterozigotnosti u odnosu na heterozigotnost populacije koja je u ravnoteži mutacija i pomaka ($H_E > H_{EQ}$), *P(D)* - Signifikantnost Wilcoxonovog testa za nedostatak heterozigotnosti u odnosu na heterozigotnost populacije koja je u ravnoteži mutacija i pomaka ($H_E < H_{EQ}$)

Analizom molekularne varijance (AMOVA) utvrđeno je da je većina ukupne genetičke raznolikosti uzrokovana unutar-populacijskom genetičkom raznolikošću (63,3%), dok je manji dio uzrokovan među-populacijskom genetičkom raznolikošću (Tablica 5). Konstruirano nezakorijenjeno Neighbor-joining stablo (NJ) uz bootstrap vrijednost od 57% na članku koji razdvaja populacije sugerira očekivanu razinu genetske diferencijacije između istraživanih populacija (Slika 8).

Tablica 5. Doprinos unutar-populacijske i među-populacijske genetičke raznolikosti ukupnoj zabilježenoj genetičkoj raznolikosti dviju istraživanih populacija velebitske degenije utvrđen analizom molekularne varijance (AMOVA)

Izvor	df	Sastavnice varijance	% Ukupne varijance	ϕ-statistika	$P(\phi)$
Između populacija	1	1,092	36,7	0,367	< 0.0001
Unutar populacija	236	1,884	63,3		



Slika 8. Nezakorijenjeno Neighbor-joining stabla gdje su crvenom bojom označene sve jedinke s lokaliteta Tomišina draga, dok su plavom bojom označene sve jedinke s lokaliteta Šugarska duliba. Prikazana je jedina bootstrap vrijednost iznad 50%.

5. RASPRAVA

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da obje istraživane populacije velebitske degenije trenutno nisu u neposrednoj opasnosti od izumiranja niti od eventualnog genetičkog osiromašivanja kroz izraženo križanje u bliskom srodstvu.

Relativno visoke razine heterozigotnosti su zabilježene kod obje populacije, što sugerira da izraženo križanje između jedinki u bliskom srodstvo nije došlo do izražaja. Kada bi značajnije stope križanja između blisko srodnih jedinki bile prisutne, u populaciji bi bio uočen visok udio homozigotnih jedinki. Potencijalna pojava križanja u bliskom srodstvu predstavlja veliku opasnost za populaciju u kojoj se pojavi (Willis 1999, Keller i Waller 2002, Charlesworth i Willis 2009). Razlog je taj što brojni aleli za nepoželjna/pogubna svojstva, koji su tijekom evolucije vrste zahvaljujući selekciji bili potisnuti u recesivnost, kroz nastanak recesivnih homozigota ponovo dolaze do izražaja te na taj način mogu ugroziti jedinke i populacije u kojima se pojave (Lynch i sur. 1995, Luikart i sur. 1998, Wang i sur. 1999, Whitlock 2000) . Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da ovakav scenarij za sada ne treba očekivati kod istraživanih populacija velebitske degenije. Zanimljivo je spomenuti da postoje brojna slična istraživanja na drugim usko-endemičnim biljnim vrstama, a u kojima su također dobiveni slični rezultati (npr. Reisch i sur. 2003, Šmídová i sur. 2011, Gargano i sur. 2015, Cieślak i sur. 2015). Time i ovo istraživanje potvrđuje da malo područje rasprostranjenosti neke vrste ne mora nužno značiti da je istraživana vrsta genetski značajno osiromašena te time i neposredno ugrožena.

Populacijsko-genetička analiza nije potvrdila recentnu pojavu genetičkog uskog grla kod analiziranih populacija. Kako kod pojave genetičkog uskog grla dolazi do značajnog smanjenja efektivne veličine populacije kao i njenog izraženog genetičkog osiromašenja, ono za posljedicu vrlo lako može imati izumiranje populacije (Bijlsma i sur. 2000, Frankham 2005).

Imajući na umu da je velebitska degenija strano-oplodna vrsta, dobiveni rezultat AMOVA-e je bio očekivan. S obzirom da mutacije koje se unutar populacije javljaju sa svakom novom generacijom predstavljaju neprestani izvor novih alela te time povećavaju razinu genetičke raznolikosti, za očekivati je da će i najveća razina genetičke raznolikosti kod ovakvih vrsta uvijek biti na unutar-populacijskoj razini.

Relativna niska bootstrap vrijednost od 57% je očekivana uzevši u obzir da se radi o populacijama za koje možemo pretpostaviti da su se prostorno diferencirale relativno nedavno, u zadnjih ~ 15000 godina, po završetku zadnje oledbe (Hewitt 2004). Imajući to na umu kao i činjenicu da je velebitska degenija trajnica, možemo pretpostaviti da nije prošlo dovoljno vremena tj. nije se izmijenilo dovoljno generacija da bi genetska diferencijacija na među-populacijskoj razini bila izraženija.

Iako populacijsko genetička analiza dvije od ukupno tri prirodne populacije velebitske degenije pokazuje da one nisu značajnije genetički osiromašene te da samim time i nisu u neposrednoj opasnosti od izumiranja, to ne znači da vrsta nije izložena značajnim rizicima, od kojih bi neki za nju mogli biti i pogubni. Prije svega je potrebno pažnju usmjeriti na utjecaj klimatskih promjena na ovu vrstu i na ugroženost samog staništa na kojemu vrsta obitava. Pretpostavlja se da su danas poznate populacije velebitske degenije samo ostatak nekada puno većeg areala ove vrste koja je dobro prilagođena hladnijoj klimi, te se stoga i smatra glacijalnim reliktom, odnosno vrstom koja poslije zadnje velike oledbe doživjela značajno smanjenje areala. Daljnjim klimatskim promjenama i dodatnim zatopljenjem, može se pretpostaviti da će klimatski uvjeti postati dodatno nepovoljniji te potencijalno ugrožavajući za ovu vrstu. Nadalje, velebitsku degeniju nalazimo na točilima, tipu staništa koje je također ugroženo i to prije svega ekološkom sukcesijom. Postupnim zaraštavanjem točila od strane drvenastih biljnih vrsta ne samo što nestaje stanište otvorenog tipa nužno za opstanak ove heliofilne vrste, već dolazi do postupne stabilizacije i posljedičnog nestajanja samih točila.

Bez obzira na uzrok ugroze prirodnih populacija velebitske degenije, poznavanje populacijsko-genetičkog statusa vrste je nužan preduvjet u planiranju i provedbi eventualnih konzervacijskih aktivnosti. Ovo istraživanje prije svega predstavlja odličan temelj za buduća opširnija istraživanjima, a kojima bi bila obuhvaćena i preostala populacija na lokalitetu Prikinuto brdo, kao i veći broj jedinki iz populacija s lokaliteta Tomišina draga i Šugarska duliba. Tek nakon provedene populacijsko-genetičke analize svih prirodnih populacija ove vrste biti će moguće donijeti konačne zaključke o statusu vrste i njenom genetičkom potencijalu.

6. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog populacijsko-genetičkog istraživanja vrste velebitska degenija (*Degenia velebitica* (Degen) Hayek) koje je ostvareno analizom osam polimorfnih mikrosatelitnih lokusa na 65 uzorkovanih jedinki s lokaliteta Tomišina draga i 60 uzorkovanih jedinki s lokaliteta Šugarska duliba, moguće je zaključiti sljedeće:

1. Obje populacije velebitske degenije su karakterizirane umjereno visokom razinom genske raznolikosti.

2. Niti u jednoj populaciji nije utvrđena prisutnost genetičkog uskog grla što znači da u nedavnoj prošlosti ove populacije nisu doživjele značajno i naglo smanjenje broja jedinki.

3. Niti u jednoj populaciji nije utvrđeno učestalo križanje jedinki koje su u bliskom srodstvu što sugerira da su populacije dovoljno velike i genetički raznolike da tu raznolikost mogu i same održavati.

4. Analizom molekularne varijance očekivano je utvrđeno da je većina ukupne genetičke raznolikosti uzrokovana unutar-populacijskom genetičkom raznolikošću, čime je potvrđena pretpostavka da je velebitska degenija dominantno strano-oplodna vrsta.

5. Ukupni populacijsko genetički status istraživanih populacija ne upućuje na neposrednu ugroženost populacija niti na njihovo značajnije genetičko osiromašenje.

6. Konzervacijske aktivnosti bi primarno trebale biti usmjerene na zaštitu staništa na kojem velebitska degenija raste uz daljnji monitoring populacijsko-genetičkog statusa svih prirodnih populacija.

7. POPIS LITERATURE

Bellard C., Bertelsmeier C., Leadley P., Thuiller W., Courchamp F. (2012): Impacts of climate change on the future of biodiversity. Ecology Letters **15**: 365-377.

Bijlsma R., Bundgaard J., Boerema A. C. (2000): Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. Journal of Evolutionary Biology **13**: 502-514.

Bouzat J. L., Paige K. N., Lewin H. A. (1998): The ghost of genetic diversity past: historical DNA analysis of the greater prairie chicken. American Naturalist **152**: 1-6.

Breed M. F., Stead M. G., Ottewell K. M., Gardner M. G., Lowe A. J. (2012): Which provenance and where? Seed sourcing strategies for revegetation in a changing environment. Conservation Genetics **14**: 1-10.

Brzyski J. R., Culley T. M. (2011): Genetic variation and clonal structure of the rare, riparian shrub *Spiraea virginiana* (Rosaceae). Conservation Genetics **12**: 1323-1332.

Charlesworth D., Willis J. H. (2009): The genetics of inbreeding depression. Nature Reviews Genetics **10**: 783-796.

Cieślak E., Cieślak J., Szeląg Z., Ronikier M. (2015): Genetic structure of *Galium cracoviense* (Rubiaceae): a naturally rare species with an extremely small distribution range. Conservation Genetics **16**: 929-938.

Degen A. (1909): A *Lesquerella* nemzetseg egyik kepvisolejenek a Velebit hegysegben toertent feldfedezeseroel. Magyar Botanikai Lapok **33**: 3-24.

Di Rienzo A., Peterson A. C., Garza J. C., Valdes A. M., Slatkin M., Freimer N. B. (1994): Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations**.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **91**: 3166-3170.

Dixo M., Metzger J. P., Morgante J. S., Zamudio K. R. (2009): Habitat fragmentation reduces genetic diversity and connectivity among toad populations in the Brazilian Atlantic Coastal Forest. Biological Conservation **142**: 1560-1569.

Ellegren H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics **5**: 435-445.

Frankham R. (2005): Genetics and extinction. Biological Conservation **126**: 131-140.

Frankham R., Ballou J., Briscoe D. A. (2009): Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge

Frankham R., Bradshaw C. J. A., Brook B. W. (2014): Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. Biological Conservation **170**: 56-63.

Gargano D., Pellegrino G., Bernardo, L. (2015). Genetic and fitness consequences of interpopulation mating in *Dianthus guliae* Janka: conservation implications for severely depleted and isolated plant populations. Conservation Genetics **16**: 1127-1138.

Gitzendanner M. A., Soltis P. S. (2000): Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. American Journal of Botany **87**: 783-792.

Gitzendanner M. A., Weekley C. W., Germain-Aubrey C. C., Soltis D. E., Soltis P. S. (2012): Microsatellite evidence for high clonality and limited genetic diversity in *Ziziphus celata* (Rhamnaceae), an endangered, self-incompatible shrub endemic to the Lake Wales Ridge, Florida, USA. Conservation Genetics **13**: 223-234.

Greguraš D. (2013): Genetička raznolikost i struktura populacija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.). Doktorska disertacija, PMF Zagreb.

Griffiths A. J. F., Miller J. F., Suzuki D. T., Lewontin R. C., Gelbart W. M. (1996): Introduction to Genetic Analysis. W. H. Freeman and Company, New York.

Hayek A. (1910): Die systematische Stellung von *Lesquerella Velebitica* Degen. Österreichische Botanische Zeitschrift **60**: 89-93.

Hewitt G. M. (2004): Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences **359**: 183-95.

Hoffmann A. A., Sgro C. M. (2011): Climate change and evolutionary adaptation. Nature **470**: 479-485.

Honnay O., Adriaens D., Coart E., Jacquemyn H., Roldan-Ruiz I. (2007): Genetic diversity within and between remnant populations of the endangered calcareous grassland plant *Globularia bisnagarica* L. Conservation Genetics **8**: 293-303.

https://www.genome.gov/10000207/pcr-fact-sheet/, datum pristupa: 24.2.2017.

http://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis, datum pristupa: 24.2.2017.

Hylander K., Ehrlen J. (2013): The mechanisms causing extinction debts. Trends in Ecology & Evolution **28**: 341-346.

Karron J. D. (1987): A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. Evolutionary Ecology **1**: 47-58.

Keller L. F., Waller D. M. (2002): Inbreeding effects in wild populations. Trends in Ecology and Evolution **17**: 230-241.

Kimura M., Crow J.F. (1964): The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics **49**: 725-738.

Kumar V., Bhatia S. S. (2012): Complete Biology for Medical College Entrance Examination. Tata McGraw-Hill Education, New Delhi.

Lopez-Pujol J., Martinell M. C., Masso S., Blanche C., Saez L. (2013): The ‘paradigm of extremes’: extremely low genetic diversity in an extremely narrow endemic species, *Coristospermum huteri* (Umbelliferae). Plant Systematics and Evolution **299**: 439-446.

Luikart G., Allendorf F. W., Cornuet J. M., Sherwin W. B. (1998): Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. Journal of Heredity **89**: 238-247.

Lynch M., Conery J., Burger R. (1995): Mutation Accumulation and the Extinction of Small Populations. The American Naturalist **146**: 489-518.

Matijević M., Mihelj D., Plazibat M., Matijević Ž., Randić M. (1999): A new locality of the species *Degenia velebitica* (Degen) Hayek (Brassicaceae) in Croatia. Natura Croatica **8**: 147-154.

Nikolić T., Alegro L., Bogdanović S. (2005): Rasprostranjenost i brojnost stenoendemične vrste *Degenia velebitica* (Degen) Hayek (Brassicaceae). Interno izvješće u sklopu provedbe projekta "Karst Ecosystem Conservation". Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Nikolić T., Milović M., Bogdanović S., Jasprica N. (2015): Endemi u hrvatskoj flori, Zagreb, Alfa d. d.

Naumovski D. (2005): Germination ecology of seeds of endemic species *Degenia velebitica* (Degen) Hayek (Brassicaceae). Acta Botanica Croatica **64**: 323-330.

Ohta T., Kimura M. (1973): A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. Genetical Research **22**: 201-204.

Radosavljević I., Jakse J., Satovic Z., Javornik B., Liber Z. (2014): Development and characterization of new polymorphic microsatellite markers for *Degenia velebitica* (Degen) Hayek (Brassicaceae). Conservation Genetics Resources **6**: 409-411.

Reisch C., Poschlod P., Wingender R. (2003): Genetic variation of *Saxifraga paniculata* Mill. (Saxifragaceae): molecular evidence for glacial relict endemism in central Europe. Biological Journal of the Linnean Society **8**: 11-21.

Rešetnik I., Satovic Z., Schneeweiss G.M., Liber Z. (2013): Phylogenetic relationships in Brassicaceae tribe Alysseae inferred from nuclear ribosomal and chloroplast DNA sequence data. Molecular Phylogenetic and Evolution **69**: 772-786.

Stamenković V. (2008): Ex situ conservation of *Degenia velebitica* (Degen) Hayek through licensed cultivation and sale. Simpozij "Flora in vegetacija Slovenije 2008. posvečen 70-letnici dr. Toneta Wraberja in 10-letnici Botaničnega društva Slovenije". Ljubljana, Slovenija, 17.-18.10.2008.

Stamenković V. (2012): Fiziološki odgovori velebitske degenije, *Degenia velebitica* (Degen) Hayek na UV zračenje. Doktorska disertacija, PMF Zagreb.

Stevanović B., Vujnović K. (1990): Morpho-anatomical adaptations of the endemic species *Degenia velebitica* (Degen) Hayek. Feddes Repertorium **101**: 385-389.

Šmídová A., Münzbergová Z., Placková I. (2011): Genetic diversity of a relict plant species, *Ligularia sibirica* (L.) Cass. (Asteraceae). Flora **206**: 151-157

Turnpenny P., Ellard S. (2005): Emery's Elements of Medical Genetics. Elsevier Churchill Livingstone, New York.

Wang J., Hill W. G., Charlesworth D., Charlesworth B. (1999): Dynamics of inbreeding depression due to deleterious mutations in small populations: mutation parameters and inbreeding rate. Genetical Research **74**: 165-178.

Whitlock M. C. (2000): Fixation of the new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles and sexual selection. Evolution **54**: 1855-1861.

Willis J. H. (1999): Inbreeding load, average dominance and the mutation rate for mildly deleterious alleles in *Mimulus guttatus*. Genetics **153**: 1885-1898.

Zaya D. N., Molano-Flores B., Feist M. A., Koontz J. A., Coons J. (2017): Assessing genetic diversity for the USA endemic carnivorous plant *Pinguicula ionantha* R.K. Godfrey (Lentibulariaceae). Conservation Genetics **18**: 171-180.

Zhivotovsky L. A., Feldmant M. W. (1995): Microsatellite variability and genetic distances. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **92**: 11549-11552.

8. PRILOZI

Prilog 1. Prikaz veličina alela mikrosatelitnih lokusa DvUZ001, DvUZ002, DvUZ004 i DvUZ006 uzoraka velebitske degenije s lokaliteta Tomišina draga

	DvUZ001		DvUZ002		DvUZ004		DvUZ006	
1-1-1	188	188	226	230	139	139	195	195
1-1-2	188	188	216	220	139	139	195	195
1-1-3	188	188	222	232	139	139	195	195
1-1-4	186	188	220	230	139	141	192	195
1-1-5	188	188	230	232	139	139	195	195
1-1-6	188	188	226	230	139	139	195	198
1-1-7	188	188	220	226	139	139	195	195
1-1-8	182	188	216	246	139	139	195	198
1-1-9	182	188	216	232	139	139	195	195
1-1-10	182	182	216	216	139	139	195	195
1-1-11	182	188	190	230	139	141	195	195
1-1-12	188	188	228	230	139	141	195	195
1-1-13	188	188	228	230	139	139	195	195
1-1-14	182	182	228	234	139	139	195	195
1-1-15	188	188	192	216	139	139	195	195
1-1-16	182	188	216	216	139	139	195	195
1-1-17			216	228	139	139	195	198
1-1-18	188	188	190	216	139	141	195	195
1-1-19	186	188	190	216	139	141	195	198
1-1-20	188	188	216	248	139	139	195	195
1-1-21	188	188	228	244	139	139	195	195
1-1-22	182	188	220	244	139	139	195	195
1-1-23	182	182	220	234	139	139	195	195
1-1-24	188	188	220	234	139	139	195	195
1-1-25	188	188	216	228	139	139	195	195
1-1-26	188	188	216	228	139	139	195	195
1-1-27	188	188	222	244	139	139	195	195
1-1-28	182	182	202	226	139	139	195	195
1-1-29	188	188	186	216	139	139	195	195
1-1-30	182	188	232	244	139	139	195	195
1-2-1	188	188	242	256	139	139	195	195
1-2-2	182	188	192	244	139	141	195	195
1-2-3	188	188	232	244	139	139	195	195
1-2-4	186	188	228	256	139	141	195	198
1-2-5	188	188	226	230	139	139	195	195
1-2-6	188	188	226	266	139	139	195	195
1-2-7	188	188	232	252	139	141	195	195
1-2-8	188	188	226	228	139	141	195	195
1-2-9	182	188	228	262	139	139	195	198
1-2-10	188	188	220	232	139	139	195	195

	DvUZ001		DvUZ002		DvUZ004		DvUZ006	
1-2-11	182	188	230	246	139	139	195	195
1-2-12	182	188	228	230	139	139	195	195
1-2-13	188	188	222	238	139	139	195	195
1-2-14	186	188	226	230	139	141	195	195
1-2-15	188	188	228	230	139	139	195	195
1-2-16	188	188	222	260	139	139	195	195
1-2-17	188	188	222	228	139	139	195	195
1-2-18	186	188						
1-2-19	188	188	226	228	139	141	195	195
1-2-20	188	188	220	230	139	139	195	198
1-2-21	188	188	228	230	139	141	195	198
1-2-22	188	188	206	230	139	139	195	195
1-2-23	188	188	228	230	139	141	195	195
1-2-24	188	188	226	228	139	139	195	195
1-2-25	186	188	228	232	139	139	195	195
1-2-26	182	188	228	230	139	139	195	198
1-2-27	188	188	228	254	139	139	195	195
1-2-28	188	188	228	248	139	141	195	195
1-2-29	188	188	232	248	139	139	195	195
1-2-30	188	188	230	234	139	141	195	195
1-2-31	182	188	230	240	139	139	195	198
1-2-32	188	188	206	252	139	139	195	195
1-2-33	182	188	190	238	139	139	195	195
1-2-34	188	188	230	232	139	139	195	195
1-2-35	188	188	228	230	139	139	195	195

Prilog 2. Prikaz veličina alela mikrosatelitnih lokusa DvUZ007, DvUZ008, DvUZ010 i DvUZ012 uzoraka velebitske degenije s lokaliteta Tomišina draga

	DvUZ007		DvUZ008		DvUZ010		DvUZ012	
1-1-1	135	171	145	145	125	135	181	185
1-1-2	135	171	145	145	135	135	181	185
1-1-3	189	189	142	145	125	135	185	185
1-1-4	189	189	139	145	135	135	181	181
1-1-5	135	189	145	145	135	135	181	181
1-1-6	135	171	145	145	135	135	181	181
1-1-7	135	171	145	145	135	135	181	181
1-1-8	192	198	145	145	135	135	181	181
1-1-9	135	171	145	145	135	135	185	185
1-1-10	135	135	142	145	135	135	181	185
1-1-11	171	171	139	145	125	135	185	185
1-1-12	135	189	145	145	135	135	181	185
1-1-13	135	171	145	145	125	135	181	181
1-1-14	198	198	145	145	135	135	185	185
1-1-15	156	171	145	145	125	135	181	181
1-1-16	135	171	145	145	135	135	181	185
1-1-17			145	145			181	185
1-1-18	171	171	145	145	135	135	185	185
1-1-19	135	171	145	145	135	135	185	189
1-1-20	171	171	145	145	135	135	181	181
1-1-21	156	189	145	145	125	135	181	185
1-1-22	135	198	145	145	135	135	181	185
1-1-23	135	198	145	145	135	135	181	181
1-1-24	168	198	145	145	125	135	181	185
1-1-25	171	189	145	145	135	135	185	185
1-1-26	135	189	145	145	125	135	181	185
1-1-27	135	189	145	145	135	135	185	185
1-1-28	162	171	145	145	135	135	185	185
1-1-29	171	171	145	145	135	135	181	185
1-1-30	171	198	145	145	135	135	185	185
1-2-1	171	189	145	145	125	125	181	185
1-2-2	135	189	145	145	135	135	185	185
1-2-3	171	171	145	145	125	125	185	185
1-2-4	162	192	142	145	135	135	185	185
1-2-5	168	189	145	145	125	125	181	185
1-2-6	189	189	145	145	125	135	181	185
1-2-7	171	192	145	145	125	135	185	185
1-2-8	162	192	145	145	125	135	185	185
1-2-9	162	177	145	145	125	135	185	185
1-2-10	162	162	145	145	125	135	185	185

	DvUZ007		DvUZ008		DvUZ010		DvUZ012	
1-2-11	156	162	145	151	135	135	185	185
1-2-12	135	162	145	145	125	135	185	185
1-2-13	162	171	145	145	125	135	181	185
1-2-14	135	192	145	145	125	135	185	185
1-2-15	135	171	145	145	135	135	185	185
1-2-16	156	192	145	148	125	135	185	185
1-2-17	168	192	142	148	135	135	185	185
1-2-18	162	171			135	135		
1-2-19	162	171	145	145	125	135	185	185
1-2-20	171	192	142	145	135	135	181	185
1-2-21	192	198	142	145	125	125	185	185
1-2-22	171	189	145	145	135	135	181	185
1-2-23	162	198	139	145	125	125	185	185
1-2-24	162	171	145	145	135	135	181	185
1-2-25	162	189	142	145	125	135	185	185
1-2-26	168	168	142	145	135	135	185	185
1-2-27	162	171	145	145	125	135	181	189
1-2-28	168	171	145	145	125	135	181	185
1-2-29	135	135	142	145	125	125	185	185
1-2-30	135	171	145	145	125	125	181	185
1-2-31	162	189	145	145	125	135	181	185
1-2-32	168	189	145	148	125	135	185	185
1-2-33	135	162	145	145	125	135	185	185
1-2-34	135	162	145	145	125	135	185	185
1-2-35	162	192	145	145	135	135	181	185

Prilog 3. Prikaz veličina alela mikrosatelitnih lokusa DvUZ001, DvUZ002, DvUZ004 i DvUZ006 uzoraka velebitske degenije s lokaliteta Šugarska duliba

	DvUZ001		DvUZ002		DvUZ004		DvUZ006	
2A-1-1	186	186	220	230	137	139	201	201
2A-1-2	186	186	228	230	137	139	183	183
2A-1-3	186	186	230	234	137	139	195	201
2A-1-4	182	186	230	232	137	143	183	195
2A-1-5	186	186	226	234	137	139	183	201
2A-1-6	186	186	210	234	143	143	195	198
2A-1-7	186	186	210	230	137	137	183	183
2A-1-8	186	186	228	230	137	139	183	201
2A-1-9	186	186	228	230	137	143	183	183
2A-1-10	186	186	228	230	137	143	183	201
2A-1-11	186	186	210	230	137	139	183	198
2A-1-12	186	186	230	234	137	137	183	192
2A-1-13	186	186	210	224	143	143	198	198
2A-1-14	186	186	228	234	139	143	183	201
2A-1-15	186	186	228	230	137	143	183	195
2A-1-16	186	186	210	230	137	137	183	198
2A-1-17	186	186	228	232	137	139	183	195
2A-1-18	186	186	234	238	143	143	183	195
2A-1-19	186	186	212	230	137	139	183	201
2A-1-20	182	186	228	234	143	143	195	198
2A-1-21	186	186	210	230	137	139	195	198
2A-1-22	186	186	228	230	139	143	183	201
2A-1-23	186	186	230	230	137	139	183	183
2A-1-24	186	186	228	230	139	143	183	195
2A-1-25	186	186	230	230	137	143	192	192
2A-1-26	186	186	212	224	137	137	183	183
2A-1-27	186	186	224	230	137	143	183	201
2A-2-1	186	186	226	234	137	139	183	201
2A-2-2	186	186	228	230	137	139	192	201
2A-2-3	186	186	230	238	139	143	195	198
2A-2-4	186	186	210	232	137	139	198	198
2A-2-5	186	186	230	230	139	143	183	195
2A-2-6	186	186	210	230	137	137	183	192
2A-2-7	186	186	210	230	137	137	183	198
2A-2-8	186	186	224	234	139	143	183	198
2A-2-9	186	186	210	234	137	143	183	198
2A-2-10	186	186	210	234	137	139	183	183
2A-2-11	186	186	210	228	137	139	183	201
2A-2-12	186	186	210	210	137	137	195	198
2A-2-13	186	186	228	230	139	139	183	201

	DvUZ001		DvUZ002		DvUZ004		DvUZ006	
2A-2-14	186	186	210	238	137	137	183	183
2A-2-15	186	186						
2A-2-16	186	186	210	230	137	139	192	198
2A-2-17	186	186	228	230	137	137	198	201
2A-2-18	182	186	212	230	137	139	192	198
2A-2-19	186	186	230	230	137	139	198	201
2A-2-20	186	186	230	230	137	139	195	201
2A-2-21	186	186	230	230	139	143	195	198
2A-2-22	186	186	230	248	139	139	198	201
2A-2-23	182	186	212	230	139	139	192	198
2A-2-24	182	186	212	230	139	139	183	192
2A-2-25	186	186	230	234	139	139	183	198
2A-2-26	186	188	224	234	137	139	198	201
2A-2-27	186	186	228	234	137	139	183	198
2A-2-28	182	186	224	230	137	139	195	201
2A-2-29	186	186	220	224	137	139	192	201
2A-2-30	182	186	222	224	137	139	192	201
2A-3-1	186	186	204	212	137	143	183	183
2A-3-2	186	186	212	230	137	139	183	201
2A-3-3	182	186	210	212	139	139	198	201

Prilog 4. Prikaz veličina alela mikrosatelitnih lokusa DvUZ007, DvUZ008, DvUZ010 i DvUZ012 uzoraka velebitske degenije s lokaliteta Šugarska duliba

	DvUZ007		DvUZ008		DvUZ010		DvUZ012	
2A-1-1	168	168	142	142	135	137	185	185
2A-1-2	135	168	142	142	135	135	185	185
2A-1-3	156	168	142	145	135	137	185	185
2A-1-4	156	162	142	145	135	137	185	185
2A-1-5	156	168	142	148	135	135	185	189
2A-1-6	156	156	145	145	135	135	185	185
2A-1-7	156	168	142	142	135	135	185	185
2A-1-8	156	168	142	148	135	135	185	189
2A-1-9	156	156	142	145	137	137	185	189
2A-1-10	162	168	142	142	135	135	185	189
2A-1-11	156	162	142	145	135	135	185	185
2A-1-12	156	168	142	142	135	137	185	189
2A-1-13	156	156	142	145	135	135	185	185
2A-1-14	162	168	142	142	135	137	185	189
2A-1-15	162	168	142	145	135	137	185	189
2A-1-16	156	168	142	142	135	135	185	189
2A-1-17	156	168	142	142	135	137	185	189
2A-1-18	156	156	142	145	135	137	185	189
2A-1-19	168	168	142	142	135	135	185	189
2A-1-20	156	156	142	142	135	137	185	185
2A-1-21	156	156	142	148	135	135	185	185
2A-1-22	162	168	142	142	135	135	185	189
2A-1-23	135	156	142	148	135	135	185	185
2A-1-24	156	168	142	145	135	137	185	189
2A-1-25	156	156	145	148	135	135	185	189
2A-1-26	156	162	142	148	135	135	185	185
2A-1-27	162	171	142	148	135	135	185	189
2A-2-1	156	168	142	148	135	135	185	189
2A-2-2	156	168	142	145	135	135	185	185
2A-2-3	156	168	142	142	135	135	185	185
2A-2-4	156	156	145	148	135	135	185	189
2A-2-5	156	168	145	154	135	135	185	185
2A-2-6	156	162	142	145	135	135	185	189
2A-2-7	156	156	142	142	135	135	185	189
2A-2-8	156	168	142	142	135	135	185	185
2A-2-9	168	171	142	142	135	135	185	185
2A-2-10	156	168	142	142	135	135	185	185
2A-2-11	156	156	142	142	135	135	185	185
2A-2-12	156	156	142	145	135	135	185	185
2A-2-13	156	162	142	145	135	135	185	185

	DvUZ007		DvUZ008		DvUZ010		DvUZ012	
2A-2-14	156	156	142	142	135	135	185	185
2A-2-15	156	156			135	135		
2A-2-16	156	171	142	142	135	135	185	185
2A-2-17	168	171	142	142	135	135	185	185
2A-2-18	156	168	142	142	135	137	185	185
2A-2-19	156	156	142	142	135	135	185	185
2A-2-20	156	168	142	145	135	135	185	185
2A-2-21	168	168	142	145	135	135	185	189
2A-2-22	156	168	142	145	135	135	185	185
2A-2-23	168	168	142	148	135	137	185	185
2A-2-24	156	168	142	142	135	137	185	185
2A-2-25	135	156	142	145	135	135	185	185
2A-2-26	156	156	142	142	135	135	185	185
2A-2-27	156	156	142	148	135	135	185	185
2A-2-28	156	168	142	145	135	137	185	185
2A-2-29	156	168	142	148	135	135	185	185
2A-2-30	156	168	142	148	135	137	185	185
2A-3-1	156	156	142	142	135	135	185	189
2A-3-2	135	156	142	142	135	135	185	185
2A-3-3	156	156	145	154	135	137	185	185

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE **Čukelj Dora**

DATUM I GODINA ROĐENJA 29.9.1992.

MJESTO ROĐENJA Zagreb

ADRESA Slanovečka cesta 155 B, 10040 Zagreb (Hrvatska)

RADNO ISKUSTVO

10/07/2010–25/07/2010 **Sobarica**

HUP Zagreb, Zagreb (Hrvatska)

Održavanje čistoće i urednosti hotelskih soba

Profesionalna i ljubazna komunikacija s gostima hotela na jeziku hrvatskom i stranim jezicima

28/02/2014–14/03/2014 **Voditeljica priprema za natjecanje iz biologije**

XV. gimnazija, Zagreb (Hrvatska)

Održavanje predavanja

Rješavanje problemskih zadataka

Komunikacija s učenicima na pristupačan i profesionalan način

Vođenje nastavne dokumentacije

Priprema za nastavu

16/09/2015–28/07/2016 **Provođenje anketa o standardu zanimanja u sklopu projekta EkoRaMa**

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb (Hrvatska)

Dogovaranje sastanaka

Provođenje anketa

Profesionalna i ljubazna komunikacija s ispitanicima uz sposobnost oblikovanja njihovih odgovora kako bi odgovarali potrebama ankete

Organizacija putovanja

10/09/2014–11/10/2014 **Studentica zaposlena za pomoć u trgovini**

CCC Shoes&Bags, Zagreb (Hrvatska)

Održavanje urednosti prodavaonice i izloga

Komunikacija sa kupcima na ljubazan i pristupačan način

Rad u skladištu

Dobro poznavanje artikala, njihove dostupnosti i položaja u prodavaonici

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2007–2011 **Srednje obrazovanje**

XV. gimnazija, Zagreb (Hrvatska)

2011–2014 **Sveučilišna prvostupnica struke Znanosti o okolišu**

Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	B2	B2	B2	B2	B2
španjolski	B2	B2	B2	B2	A2
francuski	B2	B2	B1	B1	B1
njemački	A2	B1	A1	A1	A1
talijanski	B1	A2	A2	A2	

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine Dobro razvijene komunikacijske vještine stečene kroz rad i obrazovanje u XV.gimnaziji, kroz provođenje anketa te prilikom suradnje sa kolegama u sklopu nastave na fakultetu i sudjelovanja u događanjima kao što je Noć biologije. Razvijena sposobnost pismene i usmene poslovne komunikacije, kao i prilagodljivost i strpljivost u komunikaciji sa pripadnicima različitih dobnih skupina.

Organizacijske / rukovoditeljske vještine Dobro razvijene organizacijske vještine stečene kroz projekte na fakultetu te kroz rad u nastavi i organizaciji sastanaka.

Digitalna kompetencija

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Temeljni korisnik	Temeljni korisnik

Informacijsko-komunikacijske tehnologije - tablica za samoprocjenu

Vozačka dozvola B