

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2020/51



ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra	V4-1617		
Naslov	Program rehabilitacije jadranskega lipana (Thymallus aeliani) v Sloveniji na osnovi novih genetskih označevalcev		
Vodja	11906 Aleš Snoj		
Naziv težišča v okviru CRP	3.1.2	Program rehabilitacije jadranskega lipana Thymallus aeliani na osnovi novih genetskih označevalcev	
Obseg efektivnih ur raziskovalnega dela	604		
Cenovna kategorija	D		
Obdobje trajanja	10.2016 - 09.2019		
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	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

Jadranski lipan je endemit severno jadranskega porečja, v Sloveniji se nahaja v Soči. Od donavskih populacij se razlikuje morfološko in genetsko, kot vrsta pa formalno ni priznan, čeprav je bil l. 1848 opisan kot *Thymallus aeliani*. Jadranski lipan je ogrožen zaradi genetskega pretapljanja z savskim lipanom (vrsta evropski lipan *T. thymallus*), ki je bil desetletja intenzivno vnašan v Sočo. Revitalizacija jadranskega lipana v Sloveniji je temeljila na poribljanju Soče s potomci osebkov, ki so odražali nadpovprečen avtohtoni genetski delež. Le-ta je bil ocenjevan z mikrosatelitnim genotipizacijskim testom, ki ni bil optimalen. Cilj projekta je bil izdelati na osnovi sodobne NGS tehnologije izpopolnjen genotipizacijski test z nekaj deset tisoči jedrnimi SNP markerji, s katerim bo mogoče (1) zanesljivo ločevati jadranskega lipana od drugih linij evropskega lipana, (2) pri križancih določati genetske deleže in njihovo poreklo, (3) genotipizirati muzejske vzorce lipanov in s tem dobiti referenčne podatke, (4) preveriti genetsko kompatibilnost jadranskih lipanov iz italijanske reke Sesije z jadranskim lipanom iz Soče za primer morebitne revitalizacije s translokacijo in (5) revidirati taksonomski status jadranskega lipana.

Z metodo NGS ddRAD smo pridobili 118.000 polimorfni SNP lokusov v celotnem naboru vzorcev. Zaradi introgresije sedanje soške populacije smo referenčni genom razbrali iz muzejskih primerkov iz leta 1899. Na tej osnovi smo izmed polimorfni SNP lokusov našli lokuse, ki nedvoumno razlikujejo med jadranskim in evropskim lipanom, med soškim in savskim lipanom ter med populacijami jadranskega lipana. Ta nov genotipizacijski pristop omogoča zanesljivo ugotavljanje genetskega deleža za posamezen introgresiran osebek in je primeren tudi za rutinsko testiranje. Rezultati raziskave so pokazali, da imajo vsi današnji soški osebki celoten genom enako in enakomerno premešan s savskimi geni, pri čemer je izpodrinjeno približno tri četrt avtohtonega genoma. Zato med njimi ni možno najti osebkov z nadpovprečnim avtohtonim genetskim deležem niti ni možno najti obsežnih kontinuiranih avtohtonih genetskih sekvenc, zaradi česar zaključujemo, da samo na osnovi lipanov iz Soče revitalizacija jadranskega lipana ne more biti uspešna.

Genomska analiza je pokazala, da je izmed lokusov, diagnostičnih za jadranskega lipana, samo ca. 10% takih, ki ločijo genetsko čiste muzejske osebke jadranskega lipana iz reke Soče in jadranskega lipana iz reke Sesije, kar nakazuje na visoko genomsko podobnost teh dveh skupin. Po našem mnenju bi bilo zato reševanje soškega lipana lahko uspešno predvsem s prenosom osebkov iz Sesije.

Z novo vzpostavljenim markerskim sistemom vključno z analizo mitogenoma smo primerjali živeče lipanske populacije v jadranskem porečju z muzejskimi vzorci že izumrlega genetsko čistega jadranskega lipana ter s številnimi kladi znotraj rodu *Thymallus* ter na genomski ravni potrdili, da bi bilo jadranskega lipana potrebno obravnavati kot samostojno vrsto.

ANG

Adriatic grayling is endemic to the northern Adriatic basin, in Slovenia it is located in the Soča. It differs morphologically and genetically from Danube populations and is not formally recognized as a species, although l. 1848 described as *Thymallus aeliani*. Adriatic grayling is endangered due to genetic fusion with the Sava grayling (European grayling; *T. thymallus*), which has been intensively introduced into the Soča for decades. The revitalization of the Adriatic grayling in Slovenia was based on the restocking of the Soča with the offspring of specimens, which reflected an above-average autochthonous genetic share. This was assessed by a microsatellite genotyping test that was not optimal.

The aim of the project was to develop an advanced genotyping test based on modern NGS technology with several tens of thousands of nuclear SNP markers, which will (1) reliably distinguish Adriatic grayling from other European grayling lines, (2) determine the genetic proportions and origin of hybrids, (3) genotyping museum samples of grayling and thus obtaining reference data, (4) checking the genetic compatibility of Adriatic grayling from the Italian river Sesija with Adriatic grayling from the Soča in case of possible revitalization by translocation and (5) revising the taxonomic status of Adriatic grayling.

Using the NGS ddRAD method, we obtained 118,000 polymorphic SNP loci in the entire set of samples. Due to the introgression of the current Soča population, the reference genome was deduced from museum specimens from 1899. On this basis, we found loci that clearly distinguish between Adriatic and European grayling, between Soča and Sava grayling and between Adriatic grayling populations among polymorphic SNP loci. This new genotyping approach allows reliable determination of the genetic proportion for an individual introgressed individual and is also suitable for routine testing. The results of the research showed that all today's Soča specimens have the whole genome equally and evenly mixed with the Sava genes, displacing about three quarters of the autochthonous genome.

Genomic analysis showed that of the loci diagnostic for Adriatic grayling, only ca. 10% of

those that distinguish genetically pure museum specimens of Adriatic grayling from the Soča River and Adriatic grayling from the Sesija River, which indicates a high genomic similarity of these two groups. In our opinion, therefore, the rescue of the marble grayling could be successful mainly by transferring specimens from the Sessia river.

With the newly established marker system, including mitogenome analysis, we compared living grayling populations in the Adriatic basin with museum samples of already extinct genetically pure Adriatic grayling and with numerous clades within the genus *Thymallus* and confirmed at the genomic level that Adriatic grayling should be considered a separate species.

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

Osnovni cilji projekta so bili sledeči:

- identificirati SNP lokuse na jedrni DNA, ki bodo predstavljali izboljšane populacijsko diagnostične markerje za razlikovanje med jadranskih in savsko-dravskih lipanov ter njihovih križancev
- pripraviti podlago za diagnostični laboratorijski test za rutinsko ugotavljanje genetske čistosti jadranskih lipanov, ki bo omogočal določanje jadranskega in savskega genetskega deleža ne samo na ravni populacije ampak tudi za posamezen osebek.

Realizacija teh ciljev omogoča:

- odbiro genetsko primerne plemenskega materiala, ki bo zagotavljal kvalitetno revitalizacijo jadranskega lipana
- izdelavo priporočil za revidiran rehabilitacijski program.
- taksonomsko revizijo jadranskega lipana za formalno dodelitev statusa samostojne vrste tej ribi.
- vzpostavitev kvalitetne plemenske jate tudi za namene komercialne vzreje

Ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultati in učinki raziskovalnega projekta:

JADRANSKI LIPAN KOT SAMOSTOJNA VRSTA

Jadranski lipan že od samega začetka raziskav (Cuvier in Valenciennes, 1848) velja za posebno entiteto evropskega prostora, pa naj si bo to kot vrsta (Bianco, 2014) ali kot filogenetska linija. Dokazov o edinstvenosti je precej, tako na podlagi morfologije (Bajić in sod., 2018) kot genetskih raziskav (Sušnik in sod., 2001; Meraner in Gandolfi, 2012), čeprav se izsledki prvih glede na različne avtorje razlikujejo (Kottelat in Freyhof, 2007; Bianco, 2014). Projektna raziskava je pokazala, da mtDNA haplotipi, ki jih najdemo izključno v jadranskem povodju, formirajo monofiletsko skupino, ločeno od drugih kladov na evropskem prostoru. Uporaba celotnega mitogenoma je omogočila primerjave na različnih evlucijskih časovnih komponentah. Jadranski lipan tvori sestrsko skupino evolucijsko najbolj sorodnim populacijam evropskega lipana. Skupini ločuje genetska distanca 5,68% oziroma časovni interval 3,35 – 8,22 m.l.n, ko naj bi prišlo do cepitve teh dveh linij. Podobno časovno okno cepitev je značilno za mnoge priznane vrste znotraj družine Salmonidae. Glede na dolgo samostojno evolucijsko zgodovino jadranskega lipana bi torej po analogiji tudi ta takson lahko smatrali za samostojno vrsto. Na znatno divergenco jadranskega lipana pokaže tudi filogenetska primerjava med taksoni znotraj rodu *Thymallus*.

Z uradnim priznanjem vrstnega statusa jadranskega lipana bi prakse poribljanja s tujerodnimi linijami postale nelegalne, varovanje in upravljanje jadranskega lipana na celotnem arealu v smeri njegove zaščite in/ali revitalizacije pa bi postalo veliko bolj učinkovito.

STANJE IN MOŽNOSTI REŠEVANJA JADRANSKEGA LIPANA V SOČI

Jadranski lipan v Soči je močno ogrožen, saj smo tekom raziskave ugotovili, da je populacija tam v močnem upadu. Posledično smo v naravi le s težavo našli dovolj osebkov za genomske študije. Z genomsko analizo smo potrdili dognanja izpred dveh desetletij (Sušnik in sod., 2001), da so v soški populaciji lipana močno prisotni tujerodni aleli, ki izvirajo iz savskih lipanskih populacij in so posledica intenzivnega več desetletnega prenašanja (vlaganja) savskih lipanov v Sočo (Bertok in Budihna, 1999). Glede na Structure analizo soške populacije jadranskega lipana odražajo višji genetski delež značilen za savske populacije, od deleža, značilnega za referenčni vzorec soških lipanov iz muzejske zbirke.

Nov genotipizacijski test, temelječ na SNP markerjih visoke genomske gostote, pridobljen preko ddRAD-sekvenciranja, je razkril nekatere pomanjkljivosti preteklega testa, ki je baziral na enajstih mikrosatelitnih lokusih. Za razliko od mikrosatelitnih analiz nov genotipizacijski test izhaja iz sodobne NGS tehnologije, ki omogoča pregled genoma v enormnih razsežnostih in s tem predstavlja najvišjo stopnjo genotipizacijskih testov, podrejeno le primerjavi celotnih genomov. Tako trenutno razpolagamo z 9.287 SNP markerji, s katerimi lahko razlikujemo med jadranskim in evropskim lipanom, 19.963 SNP markerji za razlikovanje med soškim in savskim lipanom ter 5.399 markerji, s katerimi je možno določati

poreklo različnim populacijam znotraj jadranskega lipana. Z novimi markerji smo potrdili prejšnje ugotovitve o introgresiji genoma jadranskega lipana s savskim lipanom. Stopnja in porazdeljenost introgresije v genomu jadranskega lipana v Soči pa nakazuje, da je iskanje genetsko ustreznih osebkov za namen revitalizacije jadranskega lipana v Soči neprimeren ukrep. Genomski podatki treh referenčnih muzejskih osebkov čistega soškega lipana so s pomočjo novega testa namreč razkrili popolno pretopitev genoma današnjega soškega lipana z genomom savskega lipana. Ne samo da je introgresija skoraj 80% in med osebki enakomerno porazdeljena, ampak v genomih trenutno živečih lipanov v Soči tudi ni več večjih avtohtonih genomskega blokov, s katerimi bi se lahko preko pravilne selekcije plemenskih živali ter nadaljnje večgeneracijske selekcije približali genomu čistega lipana. Rezultati raziskave torej kažejo, da je revitalizacija jadranskega lipana v Soči v smislu povišanja avtohtonega genetskega deleža populacije na osnovi lastnega materiala praktično nemogoča.

Hibridne populacije, še posebno tiste s popolnoma pretopljenimi genomi brez ostanka primarnih parentalnih osebkov, so načeloma v varstveni genetiki nezaželene in se jih ne ohranja (Allendorf s sod., 2001). Vendar pa se v primeru jadranskega lipana glede na še obstoječo čisto populacijo, ki se nahaja v Sesiji v italijanskem Piemontu, ponuja alternativna opcija, ki temelji na morebitnem prenosu tega materiala v Sočo, kar bi pomagalo dvigniti raven avtohtonega genetskega deleža jadranskega lipana kot tudi genetsko pestrost in številčnost soške populacije.

Genomska sorodnost lipanov iz Sesije in muzejskih vzorcev iz Soče potrjuje, da je v Soči pred antropogenimi prenosi bival *T. aeliani*, in nakazuje, da bi za njegovo revitalizacijo v Soči osebkovi iz Sesije lahko predstavljali donorske kolonizatorje. Zaznali smo le 3.775 alelnih variant, ki so bile v avtohtonu čisti populaciji, ki je nekoč naseljevala Sočo, pristne, medtem ko jih v Sesiji ni moč zaznati. To predstavlja glede na celokupno število polimorfnihih ddRAD-značk majhen delež ($\approx 10\%$). Vseeno pa parna F_{ST} vrednost, izračunana med tema populacijama na osnovi variabilnih lokusov, pri katerih se frekvenca alelov med populacijama razlikuje, precej visoka. To pomeni, da bi menjava okolja lahko imela določen vpliv na uspešnost kolonizacije. Zato bi bilo preneseni populaciji potrebno dati čas in prostor, da nanjo vpliva naravna selekcija in izbere tiste genotipe, ki so najprimernejši za življenje v Soči, kar bi v nekaj generacijah omogočilo prilagoditev in utrditev prenesene populacije. Tako selekcionirana populacija bi lahko služila kot vir za nadaljnje kolonizacije soškega porečja.

VZPOSTAVITEV KVALITETNE PLEMENSKE JATE

Funkcionalne plemenske jate jadranskega lipana zaradi različnih težav trenutno ne obstajajo, zato tudi ni bilo možno izvajati genetskih izboljšav le-teh, kot smo načrtovali ob prijavi projekta pred tremi leti. Neglede na trenutno stanje novi genotipizacijski test na osnovi SNP markerjev omogoča učinkovito odbiro plemenskih osebkov - tako za namen varstvene ali komercialne vzreje - z nadpovprečno visoko stopnjo heterozigotnosti in to na izjemno velikem številu lokusov vključno z adaptivnimi, kar je zanesljiv pristop za povečanje fitnes plemenskih osebkov in njihovega potomstva. Test je torej na voljo in ga bo možno implementirati v prakso takoj, ko se bo za to pojavila potreba.

Tekom izvajanja projektnega dela smo sodelovali z naslednjimi tujimi partnerji:

Izbira in izolaciji DNA muzejskih vzorcev lipana: Naturhistorische Museum Wien, Avstrija; dr. Anja Palandačič

Vzorci jadranskega lipana iz Adiže: Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario, San Michele, Italija; dr. Andrea Gandolfi

Vzorci jadranskega lipana iz Sesije: [Gestione Ricerca Ambientale Ittica Acque](#), Varano Borghi, Italija; dr. Stefania Trasforini

Viri:

Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK, 2001. The problem with hybrids: Setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 613–622.

Bajić, A., Jojić, V., Snoj, A., Miljanović, B., Askeyev, O., Askeyev, I., Marić, S., 2018. Comparative body shape variation of the European grayling *Thymallus thymallus* (Actinopterygii, Salmonidae) from wild populations in hatcheries. *Zoologischer Anzeiger* 272, 73–80. <https://doi.org/10.1016/J.JCZ.2017.12.005>

Bertok M, Budihna N (1999). Annual report of Fish Cadastral Register for year 1997. Fisheries Research Institut, Ljubljana, Slovenia.

Bianco, P.G., 2014. An update on the status of native in exotic freshwater fishes of Italy. *Journal of Applied Ichthyology* 30, 62–77. <https://doi.org/10.1111/jai.12291>

Cuvier & Valenciennes. 1848. *Histoire Naturelle des Poissons*, p. 447–448. (Reimpression 1969, A. Asher & Co, Amsterdam)

Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. Maurice Kottelat, Jorg Freyhof -Handbook of European Freshwater Fishes (2007). Publications Kottelat Cornol.

Meraner, A. & Gandolfi, A. 2012. Phylogeography of European grayling, *Thymallus thymallus* (Actinopterygii, Salmonidae), within the Northern Adriatic basin: evidence for native and exotic mitochondrial DNA lineages. *Hydrobiologia* 693(1): 205–221.

Sušnik S, Snoj A, Dovč P. 2001. Evolutionary distinctness of grayling (*Thymallus thymallus*) inhabiting the Adriatic river system, as based on mtDNA variation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74, 3, 375–385.

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

Cilji projekta so bili sledeči: (1) identificirati SNP lokuse na jedrni DNA, ki bodo predstavljali izboljšane populacijsko diagnostične markerje za razlikovanje jadranskih in savsko-dravskih lipanov ter njihovih križancev, (2) pripraviti podlago za diagnostični laboratorijski test za rutinsko ugotavljanje genetske čistosti jadranskih lipanov, ki bo omogočal določanje jadranskega in savskega genetskega deleža ne samo na ravni populacije ampak tudi za posamezen osebek.

V okviru realiziranega projekta smo odgovorili na oba zastavljena cilja:

Identificirali smo več deset tisoč SNP lokusov na jedrni DNA in določili tudi populacijsko specifične markerje, s katerimi lahko zanesljivo in natančno ter rutinsko ločujemo jadranskega lipana od drugih linij evropskega lipana kot tudi geografsko ločene populacije jadranskega lipana med seboj. Genotipizacija SNP markerjev na jedrni DNA omogoča tudi določanje križancev in pri le-teh določanje genetskih deležev posameznih linij/populacij in njihovo poreklo. Genotipizacijski sistem je primeren tudi za genotipizacijo muzejskih vzorcev lipanov, kar omogoča pridobitev referenčnih genomov. Z novim genotipizacijskim sistemom smo ugotavljali stanje genoma jadranskega lipana v Soči in preverili genetsko kompatibilnost genetsko čistih jadranskih lipanov iz italijanske reke Sesije z jadranskim lipanom iz Soče za primer morebitne revitalizacije s translokacijo, kar tudi predlagamo kot najboljšo možno rešitev za revidiran rehabilitacijski program jadranskega lipana v Soči. Odbira genetsko primerne plemenske materiala, ki bo zagotavljal kvaliteto revitalizacije jadranskega lipana v Soči namreč zaradi popolne pretopljenosti genoma jadranskega lipana s savskim lipanom, ni mogoča.

Uporaba sodobne NGS tehnologije nam je omogočila tudi vpogled v celoten mitogenom proučevanih osebkov in na osnovi le-tega taksonomsko revizijo jadranskega lipana za formalno dodelitev statusa samostojne vrste tej ribi.

Vzpostavljen genotipizacijski test je na voljo in ga bo možno implementirati v prakso takoj, ko se bo začela vzpostavljati funkcionalna plemenska jata jadranskega lipana oz., ko bo sprejet nov rehabilitacijski program jadranskega lipana v Soči. Trenutno plemenske jate jadranskega lipana v Sloveniji ni.

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

Program dela je bil v večini opravljen, kot je bilo predvideno. Edino odstopanje je v realizaciji cilja »vzpostavitev kvalitetne plemenske jate tudi za namene komercialne vzreje«, saj plemenske jate jadranskega lipana v Sloveniji od leta 2018 ni več, zato vzpostavljenega genotipizacijskega testa ni bilo mogoče implementirati za namen analize plemenske jate in potencialnega izboljšanja za namen komercialne vzreje.

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	4163720	Vir: COBISS.SI

Dosežek		
Naslov	SLO	Adaptivna divergenca divjih in ribogojniških jadranskih lipanov (<i>Thymallus aeliani</i>) z ddRAD seq
	ANG	Adaptive divergence in wild and hatchery reared adriatic grayling (<i>Thymallus aeliani</i>) using ddradseq
Opis	SLO	Za raziskovanje selekcijskega pritiska v ribogojniškem okolju smo sekvencirali 12 osebkov iz ribogojnice v starosti 1+ in 12 divjih posameznikov, ujetih v reki Soči. Gensko skeniranje je bilo izvedeno z ddRADseq s pomočjo kemije PE-125bp. Pridobljeni SNP so bili razvrščeni kot nevtralni ali potencialno prilagodljivi, prvi se uporabljajo za izračun populacijske statistike, drugi pa za določitev potencialne selekcije v ribogojniškem okolju. Opazili smo specifičen selekcijski podpis v genih z imunsko funkcijo (geni MHC, imunoglobulinski gen), kar kaže na ogrožen imunski odziv ribogojniških osebkov v primerjavi z divjimi. Usmerjeno selekcijo v rib. okolju smo opazili tudi pri genu rastnega hormona. Ti predhodni rezultati kažejo na zmanjšanje sposobnost preživetja v ribogojnici tistih osebkov, ki izhajajo iz naravnega habitata, kar kaže na potrebo po spremembi sedanjih postopkov upravljanja jadranskega lipana, da se podpre trajnostno upravljanje ribištva v bližnji prihodnosti. Da bi to vprašanje podrobneje razjasnili, je na vrsti sekvenciranje dodatnih populacij lipana.
	ANG	As one of the most popular species for fly-fishing, Adriatic grayling (<i>Thymallus aeliani</i>) is under constant fishing pressure. Natural populations are thus being stocked, as recuperation, with graylings raised and bred in fish farms. Environment in fish farms is greatly altered compared to natural habitat resulting in drastically different selective pressure acting on these fish compared to their wild conspecifics. Although most of hatchery reared individuals do not survive when released into the wild, some nevertheless interbreed with wild grayling, reducing the overall fitness of population and its ability to adapt to changes in natural environment. The Soča river has been stocked with hatchery reared grayling for decades. In an effort to reduce accumulative selection in captivity, the progeny propagation relies on male breeders caught in the wild, coupled with hatchery based female breeders. To investigate selection pressure in hatchery environment we deep sequenced 12 hatchery reared individuals at age 1+, and 12 wild individuals caught in the Soča river. Genomic scan was performed with double-digest restriction site associated DNA sequencing (ddRADseq) using PE-125bp chemistry. Obtained SNPs were classified as neutral or potentially adaptive, with the former used for calculating population statistics, and the latter to identify potential selection in hatchery environment. Selection signature in genes with immune function (MHC genes, immunoglobulin gene) was detected, suggesting compromised immune response of hatchery reared individuals when compared to their wild counterparts when in natural habitat, reducing hybridized populations ability to resist naturally present pathogens. Directional selection in hatchery environment was also observed at growth hormone gene, potentially favoring fast growing individuals that thrive when surplus food is present, a situation rarely observed in the wild. These preliminary results suggest a reduction of fitness for hatchery reared individuals when introduced into the natural habitat, envisaging the need for emendation of current Adriatic grayling management plans, to support a sustainable fisheries management in the near future. Sequencing of additional grayling populations is on the way, to clarify this question more thoroughly.
Šifra		B.06 Drugo
Biotechnical Faculty, Department of Animal Science; Studying the		

	Dosežek	
	Objavljeno v	behaviour of animals; 2018; Str. 9; Avtorji / Authors: Bravničar Jernej, Sušnik Bajec Simona, Snoj Aleš
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
2.	COBISS ID	4209288 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Varstvena genomika jadranskega lipana (<i>Thymallus aeliani</i>) s pomočjo muzejskih vzorcev in tehnologije ddRADseq
		ANG Conservation genomics of Adriatic grayling (<i>Thymallus aeliani</i>) using museum specimens and ddRAD seq technology
	Opis	SLO ddRAD seq analiza je pokazala, da je od 42.000 lokusov, ki so diagnostični za jadranskega lipana, samo ca. 9% takih, ki ločijo genetsko čiste muzejske osebkke jadranskega lipana iz reke Soče in jadranskega lipana iz reke Sesije, kar nakazuje na visoko genomsko podobnost teh dveh skupin. Po našem mnenju bi bilo zato reševanje soškega lipana lahko uspešno predvsem s prenosom osebkov iz Sesije. Visoka FST vrednost (0.33), ki smo jo opazili med soškimi muzejskimi in sesijskimi vzorci na polimorfni lokusih (8k/118k), bi pri prenosu zaradi spremembe okolja lahko imela določen vpliv na uspešnost kolonizacije prenesenih rib, zato bi bilo potrebno zagotoviti pogoje za stabilizacijo in prilagoditev novo naseljene populacije, e.g. večletno prepoved športnega ribolova kot tudi vse druge moteče posege v vodo.
		ANG ddRAD seq analysis showed that of the 42,000 loci diagnostic for Adriatic grayling, only ca. 9% of those that separate genetically pure museum specimens of Adriatic grayling from the Soča River and Adriatic grayling from the Sesija River, which indicates a high genomic similarity of these two groups. In our opinion, therefore, the rescue of the marble grayling could be successful mainly by transferring specimens from the Session. The high FST value (0.33) observed between marble museum and session samples at polymorphic loci (8k / 118k) could have a certain impact on the success of colonisation of transferred fish during transfer due to environmental change, so stabilisation conditions should be provided. and adaptation of the newly settled population, eg a multi-year ban on sport fishing as well as any other disruptive interventions in the water.
	Šifra	F.27 Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine
	Objavljeno v	Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko; Rodica ima talent 2019; 2019; Str. 3-4; Avtorji / Authors: Bravničar Jernej, Sušnik Bajec Simona, Snoj Aleš
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

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 populacijske genomike lipana, predvsem jadranskega lipana. Pomemben rezultat projektne dela je genotipizacija DNA izolirane iz muzejskih vzorcev in vključitev rezultatov genomskih analiz teh vzorcev v širše statistične analize, s čimer smo pridobili referenčne genome posameznih populacij in bolj realno ocenili stopnjo introgresije pri hibridnih osebkih in populacijah. Naša

študija je pomembna tudi z vidika zoološke sistematike, ker je potrdila tudi na ravni genoma, da jadranski lipan predstavlja samostojno vrsto. K temu znanju so bistveno pripomogle analize muzejskih vzorcev. K razvoju področja varstvene genomike smo doprinesli z novimi pristopi bioinformatičkih analiz v smislu določanja ustreznosti jadranskega lipana iz reke Sesija (Italija) za translokacijo in revitalizacijo populacije v Sloveniji. Rezultati projektnega dela bodo predvidoma objavljeni v 2-3 publikacijah v mednarodno priznanih znanstvenih revijah.

ANG

For the analysis performed in this target research project, we used already established molecular tools, so the project does not contribute directly to the development of basic sciences. From a scientific point of view, the results of the project contributed to a broader knowledge of the population genomics of grayling, especially Adriatic grayling. An important result of the project work is the genotyping of DNA isolated from museum samples and the integration of the results of genomic analyses of these samples into broader statistical analyses, thus obtaining reference genomes of individual populations and more realistically assessing the level of introgression in hybrid specimens and populations. Our study is also important from the point of view of zoological systematics, because it also confirmed at the genome level that the Adriatic grayling represents an independent species. Analyses of museum samples significantly contributed to this knowledge. We contributed to the development of the field of conservation genomics with new approaches to bioinformatics analyses in terms of determining the suitability of the Adriatic grayling from the River Sesija (Italy) for translocation and revitalization of the population in Slovenia. The results of the project work are expected to be published in 2-3 publications in internationally recognised scientific journals.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Glavni pomen rezultatov predlaganega projekta za razvoj Slovenije je varovanje naravne dediščine, katere del v Sloveniji je nedvomno tudi jadranski lipan. Razvili smo sistem za genetsko identifikacijo in genetski opis osebkov, ki jih je potrebno varovati, in za genetski monitoring populacije, ki bo potreben v primeru njene restavracije in varovanja. Predlagali smo najprimernejši način, kako bi lahko glede na dane možnosti obnovili populacijo jadranskega lipana v Soči, to je s prenosom genetsko čistih jadranskih lipanov iz reke Sesije v Sočo.

Z novim genotipizacijskim testom smo podali strokovno oceno stanja populacije jadranskega lipana v Sloveniji. Ugotovili smo, da imajo vsi današnji soški osebki celoten genom enako in enakomerno premešan s savskimi geni, pri čemer je izpodrinjeno približno tri četrt avtohtonega genoma, in da zato na osnovi lipanov iz Soče revitalizacija jadranskega lipana ne more biti uspešna.

Novi genotipizacijski test na osnovi SNP markerjev omogoča tudi učinkovito odbiro plemenskih osebkov z nadpovprečno visoko stopnjo heterozigotnosti in to na izjemno velikem številu lokusov, kar je zanesljiv pristop selekcije na povečan fitness zaradi heterozisa (e.g. odpornost proti okužbam etc.) tudi za plemenske osebke in njihovo potomstvo, namenjene za konzumno vzrejo, s čimer bi se lahko delno izognili vzrejnemu problemom, ki so značilni za lipane, in kar bi verjetno neposredno vplivalo, da bi se prireja gojenih lipanov povečala.

Rezultate projekta in možnosti implementacije smo že predstavili na MKGP, Zavodu za ribištvo Slovenije in predstavnikom ribiške družine Tolmin, torej vsem pristojnim, ki sodelujejo pri pripravi ukrepov za varovanje in obnovo jadranskega lipana v Sloveniji.

ANG

The main significance of the results of the proposed project for the development of Slovenia is the protection of the natural heritage, part of which in Slovenia is undoubtedly the Adriatic grayling. We have developed a system for genetic identification and genetic description of specimens that need to be protected, and for genetic monitoring of the population, which will be required in the case of its restoration and protection. We proposed the most appropriate way to restore the Adriatic grayling population in the Soča, given the possibilities, by transferring genetically pure Adriatic grayling from the Sesija river to the Soča.

With a new genotyping test, we gave an expert assessment of the state of the Adriatic grayling population in Slovenia. We found that all present-day marble specimens have the

entire genome mixed equally and evenly with the Sava genes, displacing about three-quarters of the indigenous genome, and that revitalisation of the Adriatic grayling cannot be successful based on Soča grayling.

The new genotyping test based on SNP markers also enables efficient selection of breeding specimens with an above-average high degree of heterozygosity at an extremely large number of loci, which is a reliable approach to selection for increased fitness due to heterosis (eg resistance to infections, etc.) for breeding specimens and their offspring intended for human consumption, which could partially avoid the breeding problems specific to grayling, and which would probably have a direct impact on increasing the production of farmed grayling.

The results of the project and the possibilities of implementation have already been presented at the MKGP, the Fisheries Institute of Slovenia and Angling Club Tolmin, i.e. to all those responsible for preparing measures for the protection and restoration of the Adriatic grayling 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?

☒ v domačih znanstvenih krogih

☒ pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih? [1.1](#)

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
Zavod za ribištvo Slovenije
Ribiška družina Tolmin

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

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

☒ v mednarodnih znanstvenih krogih

☒ pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami: [1.2](#)

- Izbira in izolaciji DNA muzejskih vzorcev lipana: Naturhistorische Museum Wien, Avstrija; dr. Anja Palandačič
- Vzorci jadranskega lipana iz Adiže: Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario, San Michele, Italija; dr. Andrea Gandolfi
- Vzorci jadranskega lipana iz Sesije: Gestione Ricerca Ambientale Ittica Acque, Varano Borghi, Italija; dr. Stefania Trasforini

Oba partnerja iz Italije sta izrazila zanimanje za sodelovanje v okviru formalnega projekta (npr. LIFE, INTEREG).

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja: [1.3](#)

Pridobivanje vzorcev, skupna diskusija o rezultatih in pogovori o nadaljnjem sodelovanju.

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 ☐ NE

	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	

	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

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	☐	☒	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☒	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☒	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☒	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☒	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☒	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☒	☐	☐	

G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost					
G.02.07.	Večji delež izvoza					
G.02.08.	Povečanje dobička					
G.02.09.	Nova delovna mesta					
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih					
G.02.11.	Nov investicijski zagon					
G.02.12.	Drugo:					
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti					
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti					
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij					
G.03.04.	Drugo:					
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja					
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja					
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave					
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti					
G.04.05.	Razvoj civilne družbe					
G.04.06.	Drugo:					
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					
G.07.02.	Prometna infrastruktura					
G.07.03.	Energetska infrastruktura					
G.07.04.	Drugo:					
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar

-

14. Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi Javnih razpisov za sofinanciranje ciljnih raziskovalnih projektov za leta 2016, 2017, 2018 in 2019¹⁴

http://www.bf.uni-lj.si/index.php?
eID=dumpFile&t=f&f=22763&token=9d8c3ba85bd3edd8af51ba233101a84c42cb1539

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:

20.5.2020

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2020/51

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. 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, 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 FORD področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite dosežke na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti, ki so nastali v okviru tega projekta. Dosežke 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 FORD področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Dosežek na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti je po svoji strukturi drugačen kot dosežek na raziskovalnem področju. Povzetek dosežka na raziskovalnem področju 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, Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2017« v letu 2017 in Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2019« v letu 2019 ter Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2016 in Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2018, 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/2020 v1.00

CE-82-F1-4D-3E-53-86-67-32-7D-A2-8C-CE-97-07-E2-46-0E-0B-BA

Univerza
v Ljubljani

Biotehniška
fakulteta

Oddelek za zootehniko
Jamnikarjeva ulica 101
1000 Ljubljana, Slovenija
telefon: 01 320 38 17
fax: 01 724 10 05
www.bf.uni-lj.si



ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA NA
PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROGRAMA (CRP) »ZAGOTOVIMO SI
HRANO ZA JUTRI« 2011 – 2020:

PROGRAM REHABILITACIJE JADRANSKEGA LIPANA (*Thymallus aeliani*) V SLOVENIJI NA OSNOVI NOVIH GENETSKIH OZNAČEVALCEV

Ljubljana, oktober 2019

Nosilec projekta: Aleš Snoj

Avtorji poročila: Jernej Bravničar
Simona Sušnik Bajec
Aleš Snoj

Financer: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
Agencija Republike Slovenije za raziskovalno dejavnost

Šifra projekta: V4-1617

Kraj in datum: Ljubljana, 12. 10. 2019

KAZALO VSEBINE

1 OPIS PROBLEMA IN CILJEV.....	5
2 KRATEK POVZETEK KLJUČNIH UGOTOVITEV IZ LITERATURE	6
3 MATERIAL IN METODE	8
3.1 FILOGENIJA SALMONIDOV NA PODLAGI MITOGENOMA	8
3.1.1 Vzorci in genetski material	8
3.1.2 Izolacija RNK in RNAseq.....	8
3.1.3 Bioinformatška analiza – sestavljanje mitohondrijskih genomov	8
3.1.4 Filogenetska analiza mitogenomov.....	10
3.2 DNK IZ MUZEJSKIH VZORCEV LIPANA	11
3.2.1 Muzejski primerki lipana ihtiološke zbirke naravoslovnega muzeja na Dunaju	11
3.2.2 Izolacija DNK iz arhivskih vzorcev	11
3.2.3 Preverjanje uspešnosti izolacije in pomnoževanje mtDNK	12
3.2.4 Filogenetska analiza CR mtDNK muzejskih primerkov	13
3.3 OVREDNOTENJE GENOTIPIZACIJSKEGA TESTA TEMELJEČEGA NA MIKROSATELITNI DNK	14
3.3.1 Vzorci in izolacija DNK	14
3.3.2 Ugotavljanje uspešnosti programa repopulacije.....	14
3.4 GENOMSKE ANALIZE JADRANSKEGA LIPANA	16
3.4.1 Vzorci in izolacija DNK	16
3.4.2 Sekvenciranje naslednje generacije po metodi ddRADseq	19
3.4.3 Bioinformatška analiza odčitkov	19
3.4.4 Populacijske analize in določanje stopnje introgresije v Soči	20
4 REZULTATI	21
4.1 MITOGENOM	21
4.1.1 Uspešnost sekvenciranja RNAseq, sestavljanje in poravnava mitogenoma (mtDNA) ...	21
4.1.1 Filogenetska umestitev mitogenoma <i>T. aeliani</i>	23
4.2 ANALIZA MUZEJSKIH VZORCEV NA PODLAGI CR MTDNK	26
4.2.1 Uspešnost izolacije in pomnoževanja PCR.....	26
4.2.2 Identifikacija haplotipov in filogenetska analiza	27
4.3 REZULTATI GENOTIPIZACIJ LIPANOV V REKI SOČI.....	32
4.3.1 Vzorci in nabor podatkov.....	32
4.3.2 Analiza populacijske strukture in primerjava med drstnimi sezonami.....	33
4.4 KVALITETA SEKVENCIRANJA IN NABOR DD RAD-ZNAČK	34
4.4.1 Uspešnost izolacij, izbor restriksijskih encimov in uspeh sekvenciranja	34
4.4.2 Bioinformatška analiza odčitkov in sestavljanje ddRAD-značk	35
4.5 POPULACIJSKE ANALIZE NA PODLAGI DD RAD-ZNAČK.....	36
4.5.1 Opisna populacijska statistika in primerjava parnih distanc	36
4.5.2 Multivariantne analize.....	40
4.5.3 Analize križanj, migracij in introgresij.....	43
5 RAZPRAVA.....	47
5.1 LIPAN KOT SAMOSTOJNA VRSTA	47
5.2 SREDNJEVEŠKI PRENOSI IN PROBLEMI MUZEJSKIH ZBIRK	50
5.3 STANJE IN MOŽNOSTI REŠEVANJA JADRANSKEGA LIPANA V SOČI	52

5.3.1 Nov genotipizacijski test temelječ na SNP markerjih visoke genomske gostote	52
5.3.2 Uporabnost novega genotipizacijskega sistema	53
5.3.3 Potencialni prenos jadranskih lipanov iz Sesije v Sočo	54
5.4 VZPOSTAVITEV KVALITETNE PLEMENSKE JATE	55
6 ZAHVALA	56
7 VIRI	56

1 OPIS PROBLEMA IN CILJEV

V evropskih rekah živi splošno razširjena vrsta evropski lipan *Thymallus thymallus*, ki se pojavlja v več evolucijskih linijah, vezanih na specifična geografska območja. Mednje sodita tudi savska in jadranska linija, ki sta si geografsko blizu, genetsko pa dokaj daleč. Areal jadranskega lipana (J. lipan) so reke severnega jadranskega povodja v severni Italiji (porečje Pada in Adiže) in zahodni Sloveniji (predvsem zgornje porečje Soče). Kljub temu, da se J. lipana večinoma uvršča v vrsto *T. thymallus*, je bil prvič znanstveno opisan l. 1848 na osnovi primerkov iz jezera Maggiore v Italiji in poimenovan kot *T. aeliani*. Edinstvenost J. lipana so potrdile tudi genetske raziskave. J. lipan je v Sloveniji že nekaj desetletij ogrožen predvsem zaradi poribljanja s evropskim lipanom iz Save (savski lipan). Rezultat poribljanja je hibridna populacija v soškem porečju. Ker čiste populacije J. lipana v Sloveniji ni več, je rešitev mogoča le s ponovno vzpostavitvijo populacije s čim večjim avtohtonim genetskim deležem, kar je morda možno doseči z genetsko odbiro najprimernejših osebkov za nadaljnjo vzrejo in poribljanje. Trenutni genotipizacijski test, ki se vsakoletno izvaja v času drsti, temelji na nezadostnem številu mikrosatelitnih lokusov, ki ne dajejo dovolj zanesljive informacije o stopnji introgresije. Velik problem predstavlja tudi dejstvo, da v Soči ni več čiste avtohtone populacije, ki bi služila kot referenca za native alele. V prirodoslovnem muzeju na Dunaju hranijo muzejske vzorce lipana, ki izvirajo iz 19. stoletja, torej verjetno še pred vnašanjem savskih lipanov v Sočo. Ta zbirka bi lahko služila kot referenčni material genetsko čistih J. lipanov, vendar je zaradi visoke degradiranosti DNA na teh vzorcih učinkovitost klasičnih diagnostičnih testov nezadostna. Obenem so v italijanski reki Sesiji v Piemontu odkrili populacije J. lipana z več kot 90% avtohtonim genetskim deležem. Te predstavljajo dragocen material, potencialno uporaben pri revitalizaciji J. lipana v Soči, vendar bi bilo predhodno nujno potrebno izvesti teste genetske kompatibilnosti J. lipana v Soči in Sesiji. Zaradi naštetega se je pojavila potreba po novem genetskem testiranju, ki bo temeljil na točkovnih nukleotidnih polimorfizmi (SNP) jedrne DNA in bo poleg hitrejšje diagnostike imel tudi večjo zmožnost ločevanja med populacijami, ugotavljanja evolucijske sorodnosti ter stopnje hibridizacije. Identifikacijo SNPjev nameravamo izvesti preko sekvenciranja naslednje generacije (NGS) in sicer preko RAD genotipizacije, ki omogoča identifikacijo množice nevtralnih SNP markejev, in hkrati tudi populacijsko genetsko študijo sekvenciranih populacij: ugotavljali bomo stopnjo introgresije naravnih in ribogojniških populacij J. lipana v Soči in genetsko podobnost J. lipanov iz Soče in Sesije. Ta pristop bo omogočil tudi analizo muzejskih vzorcev in s tem vpogled v genetsko strukturo populacij lipana izpred 100 do 200 let.

Osnovni cilji projekta so sledeči:

- identificirati SNP lokuse na jedrni DNA, ki bodo predstavljali izboljšane populacijsko diagnostične markerje za razlikovanje jadranskih in savsko-dravskimi lipanov ter njihovih križancev
- pripraviti podlago za diagnostični laboratorijski test za rutinsko ugotavljanje genetske čistosti jadranskih lipanov, ki bo omogočal določanje jadranskega in savskega genetskega deleža ne samo na ravni populacije ampak tudi za posamezen osebek.

Realizacija teh ciljev bo omogočila:

- odbiro genetsko primerne plemenskega materiala, ki bo zagotavljal kvalitetno revitalizacijo jadranskega lipana
- izdelavo priporočil za revidiran rehabilitacijski program.
- taksonomsko revizijo j. lipana za formalno dodelitev statusa samostojne vrste tej ribi.
- vzpostavitev kvalitetne plemenske jate tudi za namene komercialne vzreje

2 KRATEK POVZETEK KLJUČNIH UGOTOVITEV IZ LITERATURE

Študije na jadranskem lipanu so v primerjavi s študijami drugih linij evropskega lipana, ki so povzete v Gum s sod. (2009) in Marić s sod. (2012), relativno redke. Prva resnejša raziskava sega v l. 1848, ko je Valenciennes opisal lipana iz jezera Maggiore v Italiji na osnovi morfologije kot samostojno vrsto *Thymallus aeliani* (Cuvier & Valenciennes, 1848).

Jadranskega lipana je kot morfološko posebnega v odnosu do savskega prepoznala tudi Jankovičeva (1960) in ga predstavila kot rasno diferencirano endemno populacijo. Vendar jadranski lipan ni zadržal statusa samostojne vrste in mnogi kasnejši ihtiologi ime *T. aeliani* obravnavajo kot sinonim imena *T. thymallus* (Kottelat, 1997), obenem pa ga najnovejše publikacije zopet obravnavajo kot samostojno vrsto (Bianco, 2013). Prve genetske raziskave na jadranskem lipanu, te so temeljile na analizi mtDNA, so izvedli na populacijah iz slovenskega dela soškega porečja (Sušnik s sod., 2001), kasneje pa tudi na populacijah jadranskega povodja v severni Italiji (zgornje padsko porečje in reke Adiža, Brenta, Tagliamento in Livenza; Meraner & Gandolfi, 2012). Genetske distance, ki so jih izračunali na osnovi mtDNA zaporedij, ter preliminarni rezultati mikrosatelitnih analiz (Snoj s sod., 1999; Sušnik s sod., 1999 etc.) so opredelili lipana iz jadranskega povodja kot klad, ki se je prvi odcepil od skupnega prednika preostalih linij evropskega lipana, zaradi česar so zanj predlagali ime "jadranski lipan" (Sušnik s sod., 2001). Polimorfizem mtDNA, ki so ga odkrili v Italiji (17 avtohtonih haplotipov), je bil v primerjavi s Slovenijo (en avtohtoni haplotip) precej višji; v obeh primerih pa so poleg avtohtonih haplotipov našli še donavske genetske variante (v nekaterih italijanskih rekah tudi atlantske; Meraner & Gandolfi, 2012) in sicer v razmerju 1:1 v Sloveniji in 1:2 v Italiji v prid neavtohtonim. To je bil prvi znanstveni dokaz, da ima poribljanje jadranskega povodja z neavtohtonim lipanom vpliv na genetsko strukturo divjih domorodnih populacij. Poribljanje soškega porečja s savskim lipanom se je v Sloveniji začelo l. 1960 (Bertok & Budihna, 1999). Genetsko pretapljanje (introgresija) med jadranskimi in vnesenimi lipani so prvič dokazali z mikrosatelitno DNA z analizo, temelječo na bayesijski statistiki, ki omogoča izračun genetskih deležev za posamezen osebek (individual admixture analysis, IAA). Ta analiza je pokazala, da je v soškem porečju ostalo samo od 50 do 60% jadranskega genetskega fonda in izjemno nizko število potencialno čistih primerkov, ki so se uspeli ohraniti kljub več desetletnemu vnosu neavtohtonih osebkov (Sušnik s sod., 2004). IAA je v nadaljevanju postala pomembno orodje za identifikacijo osebkov v soškem porečju z adekvatnim deležem jadranskih genov (Sušnik & Snoj, 2005). L. 2004 je bil osnovan projekt z naslovom »Jadranski lipan«, v okviru katerega je potekal pilotni poskus vzreje in odbire jadranskega lipana za repopulacijo, ki je vključeval tudi genetske analize (Jesenšek & Šumer, 2004). Nedavna

raziskava mtDNA na lipanih iz italijanskega dela jadranskega povodja je pokazala, da v nekaterih rečnih odsekih v sistemu reke Pad in pa predvsem v reki Sesiji močno prevladujejo (nad 90%) avtohtoni haplotipi (Meraner & Gandolfi, 2012). Nadaljnja, zelo obsežna študija, ki je temeljila na analizi mikrosatelitnih podatkov severno jadranskih lipanskih populacij v Italiji, je potrdila ta opažanja ter razkrila, da je pri teh populacijah tudi delež introgresije tujih alelov nizek (pod 10%); še posebno je bilo to očitno v Sesiji (Meraner s sod., 2014). Avtorji ugotavljajo, da gre za pomembno odkritje v smislu varovanja jadranskega lipana, in da je to odkritje v ostrem nasprotju s splošno razširjeno introgresijo v Sloveniji, o kateri poročajo Sušnik s sod. (2004).

Do relativno nedavnega so bili glavno orodje v molekularnih študijah in varstveni genetiki predvsem jedrni mikrosatelitni lokusi in določeni odseki mitohondrijske DNA (Morin s sod., 2004). Dejavnosti za ohranjanje biodiverzitete in upravljanje z vrstami in populacijami pa lahko v novejšem času pričakujejo učinkovito pomoč preko informacij, ki niso vezane na omenjena markerska sistema, ampak prihajajo iz celotnega genoma; ta nov pristop se imenuje varstvena genomika (Shaffer s sod., 2015). Varstvena genomika temelji na genomskih podatkih (večinoma so to točkovni nukleotidni polimorfizmi, »SNPji«), katerih učinkovito identifikacijo omogoča tehnologija »sekvenciranja naslednje generacije« (NGS). Zaradi neprimerljivo večjega števila markerjev genomski pristop predstavlja sredstvo, s katerim je mogoče precej bolj določeno in natančno preučevati praktično vsa klasična vprašanja varstvene genetike, kot so npr. ocena efektivne velikosti populacije in preučevanje gibanja populacij (Lecis s sod., 2006), preučevanje filogenetskih vprašanj in taksonomskih nejasnosti, zaznavanje introgresijske hibridizacije in ocena stopnje genetskega pretapljanja (Fitzpatrick s sod. 2012; Miller s sod., 2012), določanje varstvenih enot (Frankham, 2010), ugotavljanje sorodnosti med osebki (Santure s sod., 2010) etc. Princip NGS, ki temelji na generiranju obsežnega števila zelo kratkih naključnih sekvenc, omogoča ugotavljanje zaporedja starodavne DNA (npr. iz muzejskih vzorcev), ki je praviloma precej slabe kvalitete (e.g. fragmentirana), kar pa v primeru NGS tehnologije zaradi kratkosti dobljenih sekvenc predstavlja precej manjšo omejitev (Meyer et al., 2013).

Antropogeno pogojena hibridizacija med domorodnimi in vnesenimi taksoni predstavlja zaradi zmanjšane »fitnessa« (Muhfeld s sod., 2009), izginjanja avtohtonih genomov in propadanja genetske in okoljske prilagojenosti (Kelly s sod., 2010) veliko skrb v smislu ohranjanja in zakonskih določil prizadetih vrst in populacij (Allendorf s sod., 2001). Hibridizacija, pogojena s človeškimi vplivi, je še posebej razširjena med sladkovodnimi ribami, zlasti med salmonidnimi vrstami, katerih divje populacije so že desetletja podvržene translokacijam in dopolnilnemu vlaganju z ribogojniškimi domesticiranimi linijami. SNP lokusi so idealen marker za odkrivanje in spremljanje omenjenih hibridizacij, kajti na stotine SNP lokusov je s pomočjo sodobnih genotipizacijskih platform mogoče tipizirati hitro, zanesljivo in relativno poceni (Seeb s sod., 2011; Angeloni s sod., 2011; Twyford & Ennos, 2012). Na lipanih hibridizacijskih študij, ki bi temeljile na odkrivanju SNP-jev na ravni genoma, še ni bilo, obstaja pa nekaj takih študij v okviru varstvene genomike na šarenki (*Onchorhynchus mykiss*), ki predstavlja najbolj prenašano in najbolj problematično invazivno vrsto rib nasploh (Halverson 2010). Hohenlohe s sod. (2013) so preučevali stopnjo genetskega mešanja med domorodno vrsto *O. clarki* in vneseno šarenko. Uporabljali so RAD-sekvenciranje in na ta način pridobili 3.180 vrstno diagnostičnih SNP lokusov. Genomski podatki pri salmonidih omogočajo tudi natančnejše ocenjevanje populacijske strukture (Avice 2010; Funk s

sod. 2012; Narum s sod. 2013) (Allendorf s sod. 2010; Angeloni s sod. 2012), kar potencialno omogoča uporabo genomskih podatkov za upravljanje divjih salmonidnih populacij.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 FILOGENIJA SALMONIDOV NA PODLAGI MITOGENOMA

3.1.1 Vzorci in genetski material

Genetski material za izdelavo mitogenomov smo izolirali iz dveh mladice lipana in sicer pred prvim hranjenjem, da bi se izognili vnosu bakterijskega dednega materiala iz prebavnega trakta. Jadranskega lipana smo vzorčili v vališču RD Tolmin, evropskega pa pa v vališču RD Bled. Poreklo mtDNA (jadransko ali savsko) obeh vzorcev smo preverili s sekvenciranjem kontrolne regije mtDNA, ki se glede na prejšnje raziskave med jadranskim in savskim lipanom loči za ca. 5%. Oba vzorca smo takoj po odvzemu zamrznili v tekočem dušiku in ju shranili na -80°C.

3.1.2 Izolacija RNK in RNAseq

Izolacijo RNK smo opravili s kitom Qiagen RNeasy Lipid tissue kit (Qiagen, Nemčija). Po izolaciji smo oba izolata tretirali s kitom AMBION DNA-free KIT (ThermoFisher Scientific, ZDA), in s tem odstranili genomsko DNK. Celovitost (angl. *Integrity*) izolirane RNK smo preverili na sistemu za gelsko elektroforezo Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, ZDA) in pridobili vrednosti RIN (angl. *RNA integrity number*).

RNK smo na suhem ledu poslali podjetju BGI (Shenzhen, Kitajska), kjer so izdelali knjižnici in izvedli sekvenciranje po metodi standardni RNAseq (Wang in sod., 2009). V prvem koraku so iz RNK izolatov izlekli mRNK molekule in sicer s pomočjo magnetnih kroglic z ligiranimi oligo-T repi (dT), kateri se vežejo na poli-A rep mRNK. Izlovljene mRNK molekule so fragmentirali ter iz njih sintetizirali cDNK. Na sistemu Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, ZDA) so prevreili kvaliteto cDNK in jo kvantificirali s sistemom ABI StepOnePlus Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific, ZDA). Knjižnici za sekvenciranje so pripravili s kitom TruSeq RNA (Illumina, ZDA), fragmente vsake knjižnice zakodirali z unikatnimi začetniki in po normalizaciji knjižnic z DSN kitom (Illumina, ZDA) sekvencirali na sevenatorju naslednje generacije Illumina HiSeq2000 (Illumina, ZDA) s kemijo za pridobivanje 100bp dolgih obojestranskih odčitkov, 100 PE (angl. *pair-end sequencing*).

3.1.3 Bioinformatična analiza – sestavljanje mitohondrijskih genomov

Bioinformatične analize smo opravili na lastnem strežniku. Sekvencam smo z orodjem Trimmomatic (Bolger in sod., 2014) prirezali adapterje in odstranili odčitke slabe kvalitete. Oba mitogenoma smo sestavili s programom MITObim 1.6 (Hahn in sod., 2013) s funkcijo --quick, ki lepi odčitke na referenčni mitogenom. Za referenco smo predložili mitogenom evropskega lipana (*T. thymallus*; NCBI pristopna številka FJ853655). Pridobljeni zaporedji mitogenomov smo zaokrožili z orodjem Circlator (Hunt in sod., 2015) in s spletnim orodjem MITOS2 (Bernt in sod.,

2013) anotirali regije oziroma gene. Anotacijo smo opravili na naboru vseh do sedaj objavljenih mitogenomov salmonidnih vrst rib, ki se nahajajo v podatkovni zbirki NCBI (GenBank, Preglednica 1). Nabor mitogenomov salmonidov smo poravnali z algoritmom ClustalW, ki je del programskega orodja MEGA6 (Tamura in sod., 2013).

Preglednica 1: Nabor mitogenomov uporabljen za vrstne primerjave. Pristopne številke se nanašajo na NCBI bazo podatkov, poudarjena sta mitogenoma pridobljena v tej analizi

Znanstveno ime	Pristopna številka mitogenoma	Znanstveno ime	Pristopna številka mitogenoma
<i>Oncorhynchus clarkii henshawi</i>	AY886762	<i>Hucho taimen</i>	HQ897271
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	EF455489	<i>Hucho bleekeri</i>	HM804473
<i>Oncorhynchus keta</i>	AP010773	<i>Coregonus artedi</i>	MF621765
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	EF126369	<i>Coregonus autumnalis</i>	KP452507
<i>Oncorhynchus masou 'Biwa'</i>	EF105342	<i>Coregonus chadary</i>	KU530206
<i>Oncorhynchus masou formosanus</i>	DQ858456	<i>Coregonus clupeaformis</i>	JQ390060
<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>	DQ864464	<i>Coregonus lavaretus</i>	AB034824
<i>Oncorhynchus masou masou</i>	DQ864465	<i>Coregonus muksun</i>	KT824877
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	L29771	<i>Coregonus nasus</i>	JQ390058
<i>Oncorhynchus nerka</i>	EF055889	<i>Coregonus oxyrinchus</i>	JQ661418
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	AF392054	<i>Coregonus peled</i>	KM361633
<i>Salvelinus albus</i>	KT266870	<i>Coregonus sp. 'clunceaformis'</i>	KT375339
<i>Salvelinus alpinus</i>	AF154851	<i>Coregonus ussuriensis</i>	KM210289
<i>Salvelinus curilus</i>	KJ746619	<i>Prosopium cylindraceum</i>	JQ390062
<i>Salvelinus fontinalis</i>	AF154850	<i>Prosopium williamsoni</i>	JQ390061
<i>Salvelinus kuznetzovi</i>	KU674351	<i>Thymallus aeliani</i>	MN031594
<i>Salvelinus leucomaenis</i>	KF513161	<i>Thymallus thymallus</i>	MN031595
<i>Salvelinus malma</i>	MF680544	<i>Thymallus arcticus</i>	FJ872559
<i>Salvelinus namaycush</i>	MF621742	<i>Thymallus baicalolenensis</i>	KY078221
<i>Stenodus leucichthys</i>	JQ390059	<i>Thymallus brevirostris</i>	KJ866486
<i>Parahucho perryi</i>	KC897653	<i>Thymallus burejensis</i>	KJ866485
<i>Salmo ischchan</i>	MG599465	<i>Thymallus grubii</i>	KF649073
<i>Salmo salar</i>	U12143	<i>Thymallus mertensii</i>	KT867088
<i>Salmo trutta</i>	JQ390057	<i>Thymallus pallasii</i>	KJ866482
<i>Salmo trutta trutta</i>	AM910409	<i>Thymallus thymallus</i>	FJ853655
<i>Brachymystax lenok</i>	JQ686730	<i>Thymallus tugarinae</i>	KJ866483
<i>Brachymystax lenok tsinlingensis</i>	JQ686731	<i>Thymallus yaluensis</i>	KJ866484
<i>Brachymystax tumensis</i>	KJ730524	<i>Esox lucius</i>	AP004103
<i>Hucho hucho</i>	KM588351	<i>Esox reichertii</i>	KF758446

V programskem okolju R (R Core Team, 2017) smo vizualizirali polimorfizme med mitogenomi *T. aeliani* in *T. thymallus* s paketom *Stat*, in ocenili gostoto polimorfizmov z oceno gostote jedrc (angl. *Kernel Density Estimation*).

Za potrebe izdelave filogenetskega drevesa smo iz anotirane fasta datoteke, ki vsebuje za vsak vzorec ločena zaporedja regij, vse regije vzorcev združili v programu BioEdit (Hall in sod., 2011) ter vsako regijo za celoten nabor podatkov ločeno poravnali z algoritmom ClustalW, ki je del programskega orodja MEGA6 (Tamura in sod., 2013). Zaporedji kontrolne regije (CR, angl. *control region*) na novo pridobljenih mitogenomov *T. aelialani* in *T. thymallus* smo z algoritmom BLAST primerjali z drugimi, v podatkovni zbirki NCBI že opisanimi, kontrolnimi regijami (Preglednica 1). Drugih regij nismo primerjali, zaradi pomanjklivosti obsega zbirke podatkov za preostale regije.

3.1.4 Filogenetska analiza mitogenomov

V filogenetsko analizo smo vključili vrste, ki so predstavljale vse rodove v družini salmonidov (Preglednica 22).

Filogenetsko drevo in čase divergenc posameznih taksonov smo izračunali z bayesijsko inferenco v programu BEAST 2.5.2 (Bouckaert et al., 2014). V programu BEAUTI, s katerim ustvarimo vnosno datoteko za program BEAST, smo poravnave regij mitogenoma naložili ločeno. Pri kodirajočih regijah smo vsak kodon tretirali kot ločeno zaporedje (1+2+3). Substitucijske modele za regije mitogenoma smo ugotavljali s statistično analizo v programu PartitionFinder2 (Lanfear et al., 2017) in ustvarili particije regij, ki smo jih v programu BEAUTI potem združili s skupnim parametrom substitucijskega modela (Preglednica 1). Zaradi odsotnosti rekombinacij v mitohondrijskem genomu ta v praksi funkcioniira kot en lokus, zato smo model drevesa vseh regij tretirali vezano (angl. *linked*). Globalno stopnjo molekularne ure smo nastavili po sproščenem modelu (angl. *relaxed molecular clock model*). Drevo smo koreninili z mitogenomi dveh predstavnikov Esociformes (*Esox lucius* in *E. reichertii*).

Za določitev časovnih obdobij divergenc smo hitrost molekularne ure kalibrirali s štirimi časovnimi intervali, ki so vezani na datirane fosilne ostanke predstavnikov družine Salmonidae. Korenino drevesa, to je razvejitev Salmonidae-Esociformes, smo z a priori nastavitvijo molekularne ure kalibrirali na srednjo vrednost 127 milijonov let (m.l.), s standardno deviacijo 12,5 m.l. (Macqueen and Johnston, 2014; Ma et al., 2015), ki je bila določena na osnovi žarkoplavutaric s 36 fosilnimi podatki (Near et al., 2012). Najbolje proučevan fosilni takson salmonidov *†Eosalmo driftwoodensis* (Stearley and Smith, 2016) je na podlagi morfoloških študij klasificiran kot sestrski takson skupine Salmoninae (Wilson and Li, 1999), vendar se na podlagi genetskih analiz družine obravnava kot kalibracijska točka in najbližji skupni prednik Salmonidae (Crête-Lafrenière et al., 2012; Macqueen and Johnston, 2014). Arheološka datacija ga umešča v čas pred 51,43 m.l., zato smo za kalibracijo razcepišča Salmonidae uporabili sledeče a priori nastavitve za molekularno uro: lognormalna razporeditev z 1,6 srednje vrednosti, 1,11 standardne deviacije (SD) in odmika 50,8 m.l.

(Macqueen in Johnston, 2014). Poleg omenjenih dveh kalibracijskih intervalov smo uporabili še dve kalibracijski točki vezani na takson *Oncorhynchus* iz miocenskih depozitov (Stearley in Smith, 2016), ki sta se izkazali za uporabni v preteklih filogenetskih analizah družine Salmonidae (Crête-Lafrenière in sod., 2012). Fosil vrste *†O. (Smilodonichthys) rastrosus* najden v depozitih izpred 5-12 milijonov let (m.l.), služi kot skupni prednik liniji (*O. masou*, (*O. nerka*, (*O. keta*, *O. gorbuscha*))), za katerega smo uporabili lognormalno razporeditev s srednjo vrednostjo 1, SD 0,8 in odmikom 11 milijonov let nazaj. Drugi fosil je skupni prednik linije (*O. nerka*, (*O. keta*, *O. gorbuscha*)), katere

razcepišče smo kalibrirali z lognormalno razporeditvijo, srednjo vrednostjo 1, SD 0,8 in odmikom 8 milijonov let nazaj.

Izračune bayesianske inference smo pridobili v treh neodvisnih simulacijah, pri čemer je vsak niz potekal 100 milijonov generacij, vzorčena pa je bila vsaka 10.000 generacija. Konvergenco vsakega niza smo preverili v programu Tracer 1.6 (Rambaut in Drummond, 2007) kot tudi zadovoljivost efektivne velikosti vzorca (ESS, angl. *Effective sample size*) vseh parametrov. S programom LogCombiner (Bouckaert in sod., 2014) smo vse tri nize združili in zanemarili prvih 20% vzorčenj vsakega niza. Podatke vzorčnih dreves združenega niza smo povzeli s programom TreeAnnotator (Bouckaert in sod., 2014) in jih združili v enotno drevo z izračunanimi posteriornimi verjetnostmi. Drevo smo vizualizirali v programu FigTree (Bouckaert in sod., 2014).

3.2 DNK IZ MUZEJSKIH VZORCEV LIPANA

3.2.1 Muzejski primerki lipana ihtiološke zbirke naravoslovnega muzeja na Dunaju

Za vpogled v stanje populacij pred znanimi antropogenimi prenosi lipanov med povodji in identifikacijo čistega genotipa jadranskega lipana smo v raziskavo vključili primerke, ki jih hrani ihtiološka zbirka Dunajskega naravoslovnega muzeja (Naturhistorisches museum Wien). Osredotočili smo se na izolacijo DNK iz primerkov jadranskega povodja, ter tistih, ki izvirajo iz populacij donavskega povodja med leti 1861 – 1899 in ki bi lahko predstavljale izvirne populacije prenosov.. Skupno smo izolirali DNK 35 primerkov, od tega 18 iz jadranskega povodja (Preglednica 551 in Slika 25, glej poglavje 4.2.). Primerki so se nahajali v 18-ih arhivskih posodah, fiksirani in shranjeni v etanolu, kar prepoznamo po za ihtiološke preparate značilnih belih očeh (angl. *white-eyed specimen*). Fiksacija v formalinu v večini primerov nepovratno spremeni DNK in zato onemogoči genetsko analizo na tako hranjenih preparatih.

3.2.2 Izolacija DNK iz arhivskih vzorcev

DNK smo izolirali iz koščka leve prsne plavuti, da bi čim manj uničili arhivski material, ki se za morfološke študije ponavadi slika iz desne strani primerka. Zaradi majhnih količin ohranjene DNK v muzejskih primerkih smo posebno pozornost namenili preprečitvi kontaminacij s tujo DNK in mešanjem DNK med muzejskimi vzorci. Delovno površino smo zaščitili z aluminijasto folijo in čez njo položili brisačke, na katere smo nato položili muzejski primerek lipana. Površino primerka smo očistili z dekontaminacijsko raztopino »DNA-exitusplus« (AppliChem, Nemčija), ki uniči proste molekule DNK in RNK. S skalpelom za enkratno uporabo smo odstranili košček leve prsne plavuti in ga prenesli v sterilno 1,5 ml mikrocentrifugirko. Folijo, brisačke, rokavice in skalpel smo zavrgli po vsakem posamičnem odvzemu vzorca. V izogib kontaminaciji smo material odvezemali vsakemu primerku v povsem ločenem postopku. Po opravljenem odvzemu vzorca smo odvezemno pinceto vsakič ponovno obžgali ter jo očistili z dekontaminacijsko raztopino. Postopek smo za vsak vzorec ponovili s svežimi laboratorijskimi rokavicami, očiščenim orodjem in delovno površino. Vzorcem smo tkivo jemali v dvojnikih, saj smo enega potrebovali izključno za sestavo knjižnic sekvenciranja naslednje generacije (poglavje 3.4.1).

DNK smo izolirali s kitom »First-DNA all tissue kit« (Gen-ial, Nemčija) v nadtlaknem laboratoriju s kontrolirano atmosfero centralnega raziskovalnega laboratorija za molekularno sistematiko Dunajskega naravoslovnega muzeja (»Die Zentralen Forschungslaboratorien umfassen das Forschungslabor für molekulare Systematik«). Izolirali smo največ osem vzorcev hkrati, obenem pa smo za vsako skupino izolatov izvajali še negativno kontrolo in sicer od mesta odvzema do končne izolacije in pomnoževanja.

3.2.3 Preverjanje uspešnosti izolacije in pomnoževanje mtDNK

Uspešnost izolacije in potencialne kontaminacije smo zaznali z amplifikacijo treh prekrivajočih se fragmentov kontrolne regije mtDNK (preglednica 2), ki smo jih sekvencirali po Sangerju. Zaradi fragmentiranosti muzejske DNK smo s programom Primer3 (Untergasser in sod., 2012) izdelali začetne oligonukleotide za pomnoževanje fragmentov krajših od 350 bp. Pri izdelavi začetnikov smo pazili, da se le-ti nalogajo izven polimorfnihih mest, katere smo identificirali na podlagi poravnave vseh dostopnih sekvenc CR mtDNK za vrsto *T. thymallus*, ki se nahajajo v bazi podatkov NCBI. Optimizacijo pogojev pomnoževanja smo opravili na mtDNK vzorcev ekstantnih (nemuzejskih) populacij.

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje krajših fragmentov CR mtDNK

Ime fragmenta	Dolžina fragmenta (bp)	Ime začetnika	Zaporedje začetnika 5' - 3'
A	267	LR-25	AGAGCGCCGGTGTGTAATC
		dThy_267R	TGTGCTGATGTATGAGGGGT
B	308	dThy_248F	ACCCCTCATACATCAGCACA
		dThy_555R	TCGGCTTTCAGTGAGTGGTT
C	279	dThy_560F	CATGCATCTGGTTGATGCGG
		dThy_838R	CGCGTAGAAGCCGGGGGA

Pomnoževanje muzejske DNK smo izvedli v namiznem mikroprocesorsko vodenem termostatu Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, ZDA), pri čemer smo uporabili 25 µL mešanico, in je vsebovala:

- 2 uL izolirane DNK muzejskega vzorca (1-100ng/ul)
- 0,25 posameznega začetnega oligonukleotida
- 0,2 mM vsakega nukleotida (dNTP)
- 2 mM MgCl₂
- 1 mM AmpliTaq Gold 360 pufra 10X
- 2 enoti AmpliTaq Gold 360 DNA polimeraze (Thermofisher scientific, ZDA)
- 16,3 uL H₂O

Pogoji verižne reakcije s polimerazo so bili za vse fragmente enaki:

• Začetna denaturacija	95°C	10 minut	} 5 ciklov
• Denaturacija faze 1	95°C	30 sekund	
• Naleganje začetnikov faze 1	55°C	30 sekund	
• Podaljševanje faze 1	72°C	30 sekund	
• Denaturacija faze 2	95°C	30 sekund	} 40 ciklov
• Naleganje začetnikov faze 2	52°C	30 sekund	
• Podaljševanje faze 2	72°C	30 sekund	
• Končno podaljševanje	72°C	7 minut	

Uspešnost pomnoževanja smo preverili z gelsko elektroforezo na agaroznem gelu (1%). Uspešno pomnožene fragmente smo poslali v podjetje LGC Genomics (Nemčija), kjer so jim določili nukleotidno zaporedje po Sangerjevi metodi. Dobljena nukleotidna zaporedja vsakega vzorca smo v programu BioEdit (Hall in sod., 2011) sestavili v haplotipe.

3.2.4 Filogenetska analiza CR mtDNK muzejskih primerkov

Da bi posameznim haplotipom pridobljenih iz muzejskih primerkov določili pripadnost filogenetski liniji evropskega lipana, smo izdelali filogenetsko drevo. Pridobljena nukleotidna zaporedja, sestavljena v haplotipe, smo združili s haplotipi ekstantnih populacij lipana v Evropi, ki smo jih pridobili v bazi podatkov GenBank (NCBI). Celoten nabor zaporedij smo v programu MEGA6 (Tamura in sod., 2013) poravnali z algoritmom ClustalW, manjkajoče fragmente pa smo zapolnili s kodo neznanega nukleotida (N).

S programom jModeltest2 (Darriba et al., 2012) in Bayesoveim informacijskim kriterijem (BIC) smo določili najprimernejši evlucijski model, ki opisuje potek substitucij v analiziranih zaporedjih. Filogenetsko drevo smo naredili z bayesijsko inferenco v programu BEAST 2.5.2 (Bouckaert et al., 2014) v štirih neodvisnih simulacijah, pri čemer je vsak niz potekal 100 milijonov generacij, vzorčena pa je bila vsaka 10.000. generacija. Konvergenco vsakega niza smo preverili v programu Tracer 1.6 (Rambaut and Drummond, 2007), nize združili s programom LogCombiner (Bouckaert et al., 2014) ter zanemarili prvih 20% vzorčenj vsakega niza. Združenim nizom smo s programom Tracer 1.6 preverili, ali je za vse parametre efektivna velikost vzorca (ESS, angl. *Effective sample size*) zadovoljiva. Drevesa združenega niza smo s programom TreeAnnotator (Bouckaert et al., 2014) združili v enotno filogenetsko drevo posteriornih verjetnosti, ki smo ga prikazali s programom FigTree (Bouckaert et al., 2014). V nadaljevanju smo celoten nabor zaporedij z znanimi nukleotidnimi mesti v poravnavi (brez N) združevali (angl. *collapse*) v identične haplotipe in na podlagi literaturnih virov identificirali, na katerih lokalitetah so bili ti haplotipi že opisani. Opravili smo tudi primerjavo deleža haplotipov različnih filogenetski linij v Savi, Soči, Adiži, jezeru Maggiore in Dravi za muzejske vzorce in in ekstantne populacije. Podatke za ekstantne populacije smo pridobili v naslednjih objavah: reka Soča (Weiss et al., 2002), Adiža, območje jezera Maggiore (Meraner and Gandolfi, 2012), Sava Bohinjka (Marić et al., 2012) in Drava (Gum et al., 2009) in le te primerjali s pridobljenimi haplotipi muzejskih vzorcev.

3.3 OVREDNOTENJE GENOTIPIZACIJSKEGA TESTA TEMELJEČEGA NA MIKROSATELITNI DNK

3.3.1 Vzorci in izolacija DNK

Med leti 2009 in 2018 smo v sodelovanju z RD Tolmin pregledovali genetsko strukturo lipanov, ujetih na treh drstiščih v Soči. Skupno smo pregledali 118 osebkov, vsi vzorci pripadajo samcem, ki so bili ujeti na drsti pri sotočjih Soče s pritokoma Glijun in Učja, in na prodišču 200 m pod sotočjem Soče in Učje (Preglednica 3). Omenjene lokacije se nahajajo na 2,8 km dolgem odseku Soče, ki je za lipane povsod prehodan, zato smo vzorce, ujete v isti drstni sezoni, tretirali kot enotno populacijo. Narkotiziranim ribam smo odvzeli 2-5 mm² predrepne plavuti in jo shranili v 95% etanolu. Vzorcem smo izolirali celokupno DNK po metodi z izsoljevanjem (Miller et al., 1988).

Preglednica 3: Število ujetih in genotipiziranih samecev lipana tekom drstnih sezon 2009-2017 na drstiščih v bližini sotočja reke Soča in Učje (Y: 383756, X: 130464)

Leto odvzema	Število ujetih in genotipiziranih ♂ lipana
2009	13
2010	14
2011	25
2012	21
2013	23
2014	9
2015	7
2016	4
2017	2

3.3.2 Ugotavljanje uspešnosti programa repopulacije

Populacijsko strukturo smo ugotavljali z 11 mikrosatelitnimi lokusi (Preglednica 4), izdelanimi za ocenjevanje genetske čistosti jadranskega lipana (Sušnik in sod., 2001). Mikrosatelitne lokuse smo pomnoževali v šestih ločenih reakcijah (glej preglednico 4). Vse reakcije so bile izvedene v namiznem mikroprocesorsko vodenem termostatu GeneAmp[®] PCRSystem 2720 (Applied Biosystems, ZDA). Za vse reakcije smo uporabili rekombinatno Taq polimerazo (ThermoFisher Scientific, ZDA) in sledeče pogoje:

- | | | | |
|------------------------|-------------|-----------|---|
| • Začetna denaturacija | 95°C | 3 minut | } |
| • Denaturacija | 95°C | 45 sekund | |
| • Naleganje začetnikov | 55°C / 60°C | 20 sekund | |
| • Podaljševanje | 72°C | 5 sekund | |
| • Končno podaljševanje | 72°C | 1 minut | |

Reagenti in njihove koncentracije, uporabljeni v 10 μ L PCR:

- 50 ng izolirane DNK
- 0,25 mM posameznega začetnega oligonukleotid
- 0,2 mM vsakega nukleotida (dNTP)
- 2,5 mM MgCl₂
- 1 mM KAPA2G pufra 5X
- 1 enoto KAPA2G Fast polimeraze
- 6,3 ul H₂O

Fluorescentno označene amplikone smo zmešali s HIDI formamidom in dolžinskim standardom GeneScan-ROX 500 (Applied Biosystems, ZDA) in jih genotipizirali na avtomatizirani kapilarni elektroforezi ABI 3130XL (Applied Biosystems, ZDA). Pridobljene podatke smo vizualizirali s podporno programsko opremo GeneMapper Software 4.0 (Applied Biosystems, ZDA) in ročno odčitati dolžine alelnih variant za vsak lokus.

Preglednica 4: Nabor mikrosatelitnih lokusov in strategija združevanja za pomnoževanje dupleksov v verižni reakciji s polimerazo, ter genotipizaciji na kapilarni elektroforezi; ⁷²povzeto po (Sušnik in sod., 2001).

Ime lokusa	Ime začetnika	Nukleotidno zaporedje začetnika 5' - 3' in barva fluorescentne značke	T naleganja začetnikov dupleksa	Združevanje dupleksov pri genotipizaciji
Thy 1	BFRO005_F BFRO005_R	NED-CGCATCTGTATGAAAAACCT TGGTTTGGTAGGAGTTTCGT	55°C	Multipleks A
Thy18	BFRO009_F BFRO009_R	VIC-AAATTGTCCCCGTTGGCAGA ACATACACCGCAACACCCAG		
Thy7	BFRO006_F BFRO006_R	VIC-GCCTGGTTTTACCTTTAGA AGGCATTTTACACTGGCATT	55°C	
Thy9	BFRO007_F BFRO007_R	PET-AGACCCCCAAAACTATGCT TAAGGTCCCCAACACTACGA		
Thy4	BFRO013_F BFRO013_R	FAM-CATTGCTTGCTCTTTGGGGT CCCGTTGATTATTTTGTTCCTCA	60°C	
Thy52	BFRO014_F BFRO014_R	NED-ACTACATTACTACATTCTCTCGCA CAAACCTCCACTTCTCTATCTCAG	55°C	
Thy2/2	BFRO004_F BFRO004_R	FAM-GCTCCAGTGAGGGTGACCAG AGGCCACTGATTGAGCAGAG		
Thy17	BFRO016_F BFRO016_R	PET-GTAGAGGCAGGGTTCAGGCA ATCAGCCCAAGGTTGTAACA	60°C	Multipleks B
Thy72	BFRO015_F BFRO015_R	PET-GACTCAGTGAAGAACTAAAGTACA GAAAAGTTATGAAGGTCAACCC		
Thy62	BFRO010_F BFRO010_R	VIC-GGACGGAGCCAGCATCAC GATTCATAATCAGGTCAATAGTCAT	60°C	
Thy49	BFRO017_F	VIC-GCCCCTCTGCTAAACACAC		

Ime lokusa	Ime začetnika	Nukleotidno zaporedje začetnika 5' - 3' in barva fluorescentne značke	T naleganja začetnikov dupleksa	Združevanje dupleksov pri genotipizaciji
	BFRO017_R	TCTATTGGGTTGAGGTCTGG		

Pridobljene podatke smo preverili s programom Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) za identifikacijo potencialnih nultih alelov. Iz pridobljenih podatkov smo vsem osebkom določili genetsko populacijsko podskupino na osnovi Bayesove statistike v programu STRUCTURE 2.3.4 (Falush in sod., 2003, 2007; Hubisz in sod., 2009; Pritchard in sod., 2000), kot so predlagali Porras-Hurtado in sod. (2013). V statistični analizi smo uporabili tudi referenčne populacije tako za jadransko (reka Sesija) kot za donavsko filogenetsko linijo (Sava in Unica). Uporabili smo model mešanja (angl. *Admixture model*), korelirane alelne frekvence med populacijami (angl. *correlated allele frequencies*) in model LOCPRIOR (Hubisz et al., 2009). Veriga MCMC vzorčenja verjetnostne porazdelitve je tekla 500 000 generacij, ob tem smo prvih 20% generacij zavrgli kot fazo prežiga (angl. *burn-in*). Število genetsko enotnih skupin (grozdov; angl. *cluster*) K smo iskali med ena in deset, za vsako vrednost K smo naredili tri ponovitve in število grozdov določili v spletnem orodju Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012) z metodo ad hoc statistike ΔK (Evanno et al., 2005), ki primerja razlike v varianci največjega verjetja dveh zaporednih grozdov ($K=n$, $K=n+1$). Ker vrednosti ΔK pri $K=1$ ni mogoče izračunati, smo v primeru določitve $K=2$ pravilnost rezultata preverili še na osnovi $\ln P(D)$, pri kateri opazen padec rasti $\ln P(D)$ po $K=2$ pomeni potrditev izbrane vrednosti K .

V programu STRUCTURE pridobljene Q vrednosti vzorcev (delež določene genetske skupine v vzorcu) smo primerjali med leti odvzema, ter za vsako leto izrisali grafični prikaz kvantilov (angl. *boxplot*) s srednjo vrednostjo vzorcev (mediana) in povprečno vrednostjo letnega vzorčenja. Letne spremembe povprečne Q vrednosti smo opisovali z regresivno statistiko ter s tem izračunati vpliv vsakoletne odbire divjih samcev z največjim deležem jadranskih alelov na spremembo Q vrednosti skozi čas.

3.4 GENOMSKE ANALIZE JADRANSKEGA LIPANA

3.4.1 Vzorci in izolacija DNK

Genomsko analizo s sekvenciranjem naslednje generacije smo opravili na 128 ekstantnih vzorcih iz 12 lokacij ter na 16 muzejskih vzorcih iz 5 lokacij (Preglednica 5). Vzorce za analizo trenutnega stanja v jadranskem porečju v Sloveniji smo pridobili na dveh lokacijah v porečju Soče, poleg tega smo v jadranskem povodju vzorčili še v italijanskih rekah Sesiji in Adiži, ki naj bi ju naseljevali potencialno donorski populaciji za revitalizacijo jadranskega lipana v Sloveniji. V donavskem porečju smo vzorčili v Savi Bohinjki, Unici in Bistrica, ki je pritok Drave. Ti vzorci predstavljajo referenčne populacije za zaznavanje prenosov alohtonega lipana v jadransko porečje in stopnje introgresije pri današnjih populacijah jadranskega lipana. V analizo smo vključili tudi sedanje vzorce iz ribogojnic RD Tolmin, RD Bled in Zavod za ribištvo Slovenije. Za časovno primerjavo genetske strukture jadranskega lipana in ugotavljanje vpliva repopulacijskega programa na

genetsko strukturo smo pridobili tudi starejše vzorce iz leta 2009 in sicer iz ribogojnice Tolminke ter reke Tolminke. Genomske podatke smo pridobivali tudi iz izolatov muzejskih primerkov; analizirali smo osem primerkov iz Soče, štiri primerke iz jezera Magiore, dva primerka iz Save Bohinjke (donavsko-savsko povodje) in dva primerka iz reke Fische (pritok Donave pri Dunaju) (Preglednica 145).

Vse sedanje populacije smo vzorčili z elektroribolovom in muharjenjem. Narkotiziranim ribam smo odvzeli 2-5 mm² predrepne plavuti in to shranili v 95% etanolu. Po rekuperaciji v vodni kopeli smo ribe na mestu odvzema spustili. DNK smo izolirali s kitom »First-DNA all tissue« (Gen-ial, Nemčija).

Kvaliteto DNK smo preverili na agarozni elektroforezi in izmerili koncentracijo DNK na spektrofotometru NanoVue (GE, ZDA) in Qubit (Invitrogen, ZDA) z esejem 1x dsDNA HS.

Preglednica 5: Nabor vzorcev za genomske analize

Oznaka	n	Lokaliteta	Vzorci	Koordinate (N, E)	Glavni vodotok	Povodje	Leto vzorčenja
SC	12	Soča	L001, L002, L003, L004, L005, L006, L007, L008, L009, L010, L011, L012	46.333042, 13.590026	Soča	Jadransko	2017
RT	12	Ribogojnica Tolminka	L013, L014, L015, L016, L017, L018, L019, L020, L021, L022, L023, L024	46.185400, 13.738184	-	Jadransko	2017
BS	12	Sava Bohinjka	L025, L026, L027, L028, L029, L030, L031, L032, L033, L034, L035, L036	46.333763, 14.061532	Sava	Črnomorsko	2017
RB	12	Ribogojnica Bled	L037, L038, L039, L040, L041, L042, L043, L044, L045, L046, L047, L048	46.370334, 14.087798	-	Črnomorsko	2017
UN	12	Unica	L049, L050, L051, L052, L053, L054, L055, L056, L057, L058, L059, L060	45.839901, 14.272737	Ljubljana	Črnomorsko	2017

Oznaka	n	Lokaliteta	Vzorci	Koordinate (N, E)	Glavni vodotok	Povodje	Leto vzorčenja
ID	6	Idrijca	L065, L066, L067, L068, L069, L070	46.097163, 13.835843	Soča	Jadransko	2017
RH	12	Ribogojnica Tolminka	L071, L072, L073, L074, L075, L076, L077, L078, L079, L080, L081, L082	46.185400, 13.738184	-	Jadransko	2009
TT	12	Tolminka	L083, L084, L085, L086, L087, L088, L089, L090, L091, L092, L093, L094	46.193669, 13,738747	Soča	Jadransko	2009
AD	10	Adiža	L095, L096, L097, L098, L099, L100, L101, L102, L103, L104	46.142961, 11.074941	Pad	Jadransko	2014
RO	12	Ribogojnica Obrh	L107, L108, L109, L110, L111, L112, L113, L114, L115, L116, L117, L118	45.709000, 14.501199	-	Črnomorsko	2017
DR	8	Bistrica	L119, L120, L121, L122, L123, L124, L125, L126	46.640175, 15.131198	Drava	Črnomorsko	2016
SE	8	Sesia	L133, L134, L139, L140, L141, L143, L144, L145	45.772898, 8.097358	Pad	Jadransko	2018
HT	3	Soča	NMW03, NMW05, NMW06	46.18264, 13.717337	Soča	Jadransko	1888
HS	5	Soča	NMW01, NMW07, NMW08, NMW12, NMW15	46.324752, 13.545251	Soča	Jadransko	1899
HB	2	Sava Bohinjka	NMW20, NMW21	46.333763, 14.061532	Sava	Črnomorsko	1880
HM	4	Jezero Magiore	NMW28, NMW29,	45.723654, 8.624557	Pad	Jadransko	1888

Oznaka	n	Lokaliteta	Vzorci	Koordinate (N, E)	Glavni vodotok	Povodje	Leto vzorčenja
HD	2	Fischa pri Lichtenwörth	NMW30, NMW31	47.861248, 16.325958	Donava	Črnomorsko	1882
			NMW34, NMW35				

3.4.2 Sekvenciranje naslednje generacije po metodi ddRADseq

Sekvenciranje naslednje generacije je bilo izvedeno preko podjetja IGA Technology (Udine, Italija), in sicer po metodi zmanjšane reprezentativnosti genoma z restrikcijskimi encimi (Miller et al., 2007; Baird et al., 2008), po protokolu sekvenciranja DNK markerjev, asociiranih z restrikcijskimi mesti z dvojno digestijo (ddRADseq, Peterson et al., 2012). Izdelava knjižnic in sekvenciranje vzorcev iz muzejskih primerkov je potekalo povsem ločeno od sedanjih primerkov v izogib potencialnim navzkrižnim kontaminacijam.

Za izbiro primernih kandidatov restrikcijskih encimov smo s programom sim-RAD (Lepais in Weir, 2014) opravili *in silico* simulacijo encimskega rezanja sorodnega genoma atlantskega lososa (*S. salar*), in na podlagi najboljšega razmerja pridobljenih ddRAD-značk in polimorfnih mest izbrali dve kombinaciji restrikcijskih encimov (PstI + MspI in PstI + MboI). Za določitev bolj primerne kombinacije restrikcijskih encimov smo na 24 vzorcih opravili preliminarno sekvenciranje, in izbrali kombinacijo, ki nam je dala optimalno pokritost genoma z dovoljšnim številom polimorfnih mest.

3.4.3 Bioinformatška analiza odčitkov

Bioinformatško analizo od filtriranja surovih odčitkov do sestavljanja genotipov sekvenciranih vzorcev smo opravili s programskim orodjem STACKS 2.4 (Rochette in sod., 2019) na lastnem strežniku. Zaradi boljšega delovanja in povečanih možnosti nadaljnjih analiz smo za izdelavo kataloga homolognih lokusov med vzorci, ki smo jih poimenovali ddRAD-značke, uporabili referenčno nalaganje odčitkov na zaporedje sorodnega genoma, za kar smo uporabili referenčni genom evropskega lipana (*T. thymallus*, Genbank: GCA_004348285.1), ki smo ga dobili v bazi podatkov NCBI in je sestavljen do nivoja ločenih kromosomov.

Surovim odčitkom smo z orodjem Trimmomatic (Bolger in sod., 2014) odstranili adapterje knjižnic. Odčitke smo nato procesirali z orodjem *process_radtags* (STACKS 2.4) in se tako znebili odčitkov z neznanimi nukleotidi N (angl. *Quality trimmed*) in tistih s slabo kakovostjo sekvenciranja. Hkrati smo odčitke de-multipleksirali - jih razdelili po vzorcih glede na kodno zaporedje značnih na adapterjih. Kvaliteto surovih odčitkov smo ocenili s programskim orodjem FastQC (Andrews, 2010).

Pridobili smo po vzorcih ločene sprednje in zadnje odčitke, ki smo jih poravnali na referenčni genom evropskega lipana (GCA_004348285.1) z algoritmom *bwa-mem* programskega orodja Burrows-Wheeler Aligner 0.7.12 (Li in Durbin, 2009). Tako poravnane odčitke smo sortirali glede na genomske koordinate s programom Samtools 1.9.20 (Li in sod., 2009). Iz pridobljenih datotek poravnav *.bam smo z algoritmom drsečega okna (angl. *sliding window algorithm*) modula

gstacks (STACKS 2.4) izdelali katalog lokusov oziroma ddRAD-značk. V programu smo določili izločitev vseh odčitkov brez para (--rm-unpaired-reads) ter tistih s kvaliteto baz nižjo od 30 po PHRED-ovi lestvici, torej vse, ki so imeli točnosti branja za vsako bazo < 99,9% (--min-mapq 30). Skripta *gstacks* identificira točkovne mutacije (SNPs) metapopulacije za vsak lokus in izdela genotip za vsak osebek. Na podlagi parno združenih odčitkov in pridobljenih podatkov metapopulacije izdela faze tako imenovanih mikrohplotipov, ki vsebujejo vezane SNP-je. Produkt te skripte je katalog konsenznih sekvenc (angl. *consensus sequence*) vseh ddRAD-značk s pripadajočimi genotipizacijskimi podatki vsakega osebk (genotip in aleli).

3.4.4 Populacijske analize in določanje stopnje introgresije v Soči

Za pridobitev čim bolj informativnih lokusov za naš nabor podatkov, t.j. za ločevanje šuma od informativnih podatkov, smo po preliminarnih analizah v programu *populations* nastavili parametre filtriranja glede na prisotnost določenega lokusa v določenem deležu vzorcev v vsaki populaciji (–r 0.3), v deležu vseh vzorcev (–R 0.9) in v deležu populacij (–p 17) in najnižjo frekvenco malih alelov (minor allele frequency; od 0 do 0.5). Program je na podlagi SNP-ov in mikrohplotipov izdelal tudi vstopne datoteke za nadaljnje populacijske analize. Manjkajoče lokuse smo vizualizirali z orodjem *Matrix_condenser* (de Medeiros and Farrell, 2018) ter na oko ocenili uporabnost ddRAD-značk. Pri nastavitvi parametrov smo se ozirali na pridobivanje največjega števila lokusov ob najmanjšem deležu manjkajočih podatkov v celotnem naboru podatkov, vključno z muzejskimi vzorci.

S programom *populations* (STACKS 2.4) smo izračunali osnovne populacijske parametre za vsako nukleotidno mesto posebej, kot so pričakovana in opažena heterozigotnost (H_{obs} , H_{exp}), genetska pestrost (π), F_{IS} in parne fiksacijske indekse (F_{ST}) med populacijami; na osnovi pridobljenih mikrohplotipov pa tudi haplotipno diverziteto, Φ_{ST} in F_{ST} . Za populacijske parametre π , F_{IS} , F_{ST} , F_{ST}' in Φ_{ST} smo uporabili tudi metodo glajenja jedrc (angl. *Kernel smoothing*, --smooth) s ponovnim vzorčenjem (angl. *Bootstrapping*, --bootstrap-reps 1000).

Genetsko raznolikost med vzorci in populacijami smo predstavili z analizo glavnih komponent (PCA, angl. *Principal component analysis*) na podlagi mikrohplotipnega niza podatkov. Razlike med skupinami smo izračunali z diskriminantno analizo glavnih komponent (DAPC, angl.

Discriminant analysis of principal components). Število skupin smo določili z Bayesovim informacijskim kriterijem (BIC) z razvrščanjem zaporednih k-povprečij (angl. *K-means*). Število ohranjenih glavnih komponent smo določili z optimizacijo vrednosti α , medtem ko smo zadržali vse diskriminante funkcije. Obe analizi smo opravili in vizualizirali v programskem okolju R (R Core Team, 2017) z uporabo programskega paketa *adegenet* (Jombart and Ahmed, 2011).

Analizo populacijskih struktur smo opravili s programom FASTSTRUCTURE (Raj et al., 2014), ki je optimiziran za delovanje na večjem številu SNP lokusov in temelji na splošno uporabljenih algoritmih bayesianske inference programa STRUCTURE (Falush et al., 2007; Hubisz et al., 2009). Program smo zagnali z krovnim programom Structure_threader (Pina-Martins et al., 2017), ki omogoči hkratni zagon večih iteracij programa na različnih procesorskih nitih, obenem opravi statistično oceno optimalnega števila skupin/populacij, ki jih zaznava v naboru podatkov in rezultate tudi vizualizira. Izbiro opravi z metodo največjega verjetja po dveh modelih in sicer: (1) z

modelsko kompleksnostjo, ki maksimira mejno verjetnost in (2) z modelom komponent, ki opisuje strukturo v podatkih. Ker te metode zahtevajo nevezane markerje, smo pri ddRAD-značkah z več SNP mesti izračune opravili le z enim SNP mestom na značko. Programu smo predložili iskanje po 17 skupinah ($K=17$). Q vrednosti smo dodatno ocenili s programom STRUCTURE in jih primerjali z Q vrednostmi pridobljenimi na podlagi mikrosatelitnih lokusov (glej poglavje 3.3.2.).

Zgodovinske odnose med populacijami smo ocenili s programom TreeMix (Pickrell et al., 2012), ki grafično predstavi populacijske cepitve ter oceni zaznane migracije med skupinami. Za zunanjo skupino smo določili populacijo –HS, ter račune izvedli na 1000 bootstrap ponovitvah.

Introgresijo alohtonih alelov v genomu jadranskega lipana osebkov iz Soče smo izračunali in vizualizirali s programom Introgress (Gompert and Alex Buerkle, 2010). S tem programom smo na podlagi rezultatov analize populacijskih struktur lahko določili čiste osebkke jadranskega in savskega lipana, med katerimi prihaja do križanja v Soči, ter jih uporabili kot referenčne osebkke za vizualizacijo introgresije po kromosomih. Vstopne datoteke smo izdelali s skriptama `convert_vcf2introgress_genotypes.py` in `convert_vcf2introgress_loci.py` programskega jezika Python. Vizualizirali in primerjali smo samo SNP lokuse, ki se v celoti razlikujejo med muzejskimi referenčnimi vzorci čistega jadranskega lipana, ki predstavljajo avtohotni genotip, in ekstantnimi vzorci savskega lipana, ki predstavljajo alohtoni genotip.

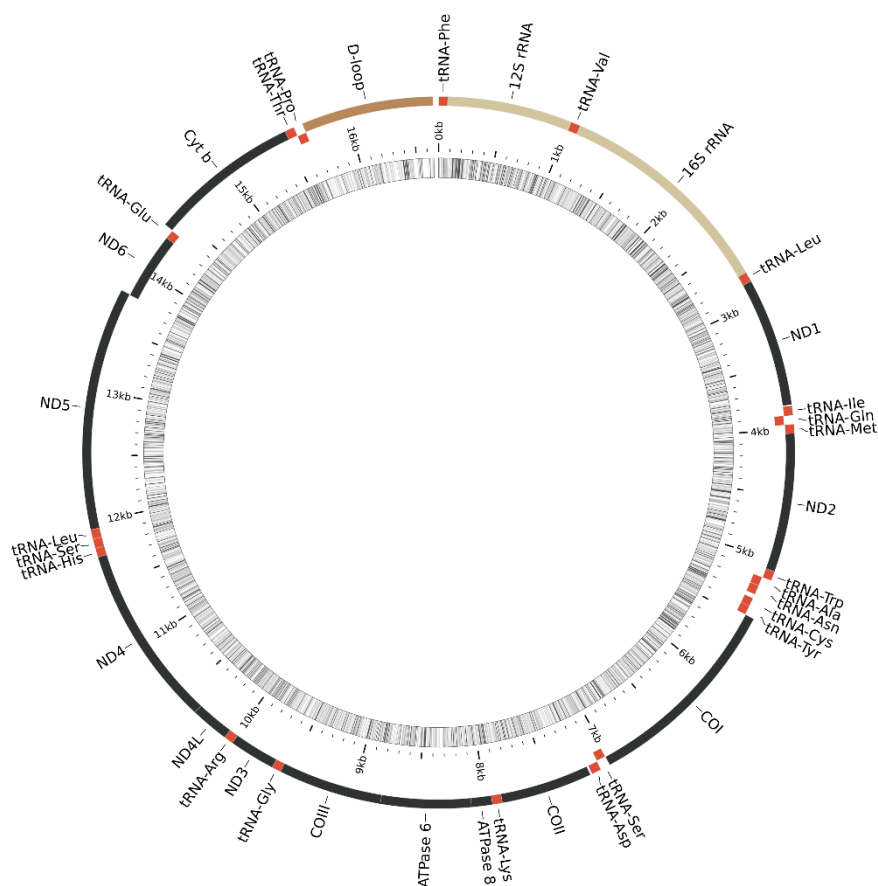
4 REZULTATI

4.1 MITOGENOM

4.1.1 Uspešnost sekvenciranja RNAseq, sestavljanje in poravnava mitogenoma (mtDNA)

Z metodo RNAseq smo uspešno sekvencirali oba izolata s celovitostjo RNK molekul 9,9 RIN (angl. *RNA integrity number*). Od vseh sekvenciranih odčitkov jih je 5% pripadalo zaporedjem mitohondrijskega genoma. Globina odčitkov je segala med 210x do 450x z najnižjo pokritostjo v intergenih regijah in najvišjo v rRNK kodirajočih regijah. Po treh iteracijah v orodju MITObim 1.6 (Hahn et al., 2013) smo uspeli sestaviti celotna 16,657 bp dolga mitogenoma jadranskega in evropskega lipana, ki smo ju naložili v bazo podatkov NCBI pod zaporednima številkama MN031594 in MN031595.

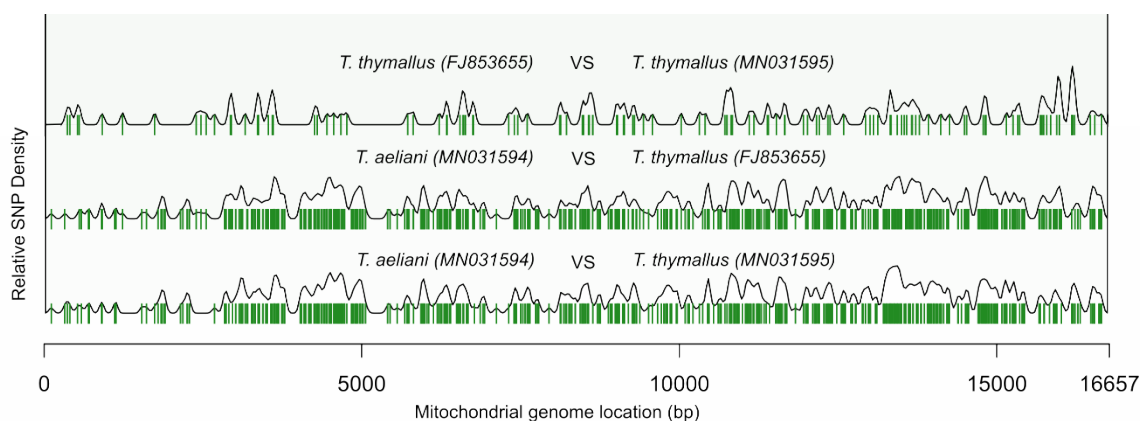
Struktura genov mtDNA sledi standardni organizaciji značilni za vretenčarske mitohondrije: 13 genov, ki kodirajo proteine, 22 genov za tRNK in dva za rRNK ter značilni presledki med geni vključno s kontrolno regijo (Slika 1).



Zunanji obod prikazuje anotirane regije, s protein kodirajočimi geni v črni barvi, tRNA geni v rdeči barvi, rRNA genoma v oker barvi in kontrolno regijo v rjavi barvi. Na notranjem obodu so z različnimi sivinami prikazane baze (A,G,C,T) in nukleotidno skalo v kilo bazah.

BLAST analiza anotiranih kontrolnih regij mitogenomov je pokazala, da je zaporedje CR na novo pridobljenega mitogenoma jadranskega lipana *T. aeliani* (MN031594) identično CR haplotipa Ad7cs (GenBank št. JX099344) in da se v 99% ujema s preostalimi CR haplotipi jadranske evolucijske linije lipana. Primerjava CR mitogenoma evropskega lipana *T. thymallus* (MN031595) je pokazala identičnost s haplotipom Da25cs (GenBank št. HM636922) in 99% podobnost s preostalimi haplotipi balkanske filogenetske linije lipana (Marić in sod., 2012).

Med mitogenomom jadranskega lipana (MN031594) in genomoma evropskega lipana (MN031595 in FJ853655) smo našli 529 oziroma 544 variabilnih mest, med mitogenomoma evropskega lipana pa 129 variabilnih mest (Slika 2).



Slika 2: Parna primerjava poravnanih mitogenomov *T. aeliani* (MN031594) in *T. thymallus* (MN031595 in FJ853655) Variabilna mesta so prikazana z zelenimi črticami, medtem ko črna linija označuje relativno gostoto SNP mest izračunano z oceno glajenja jedrc (angl. Kernel density estimate).

4.1.1 Filogenetska umestitev mitogenoma *T. aeliani*

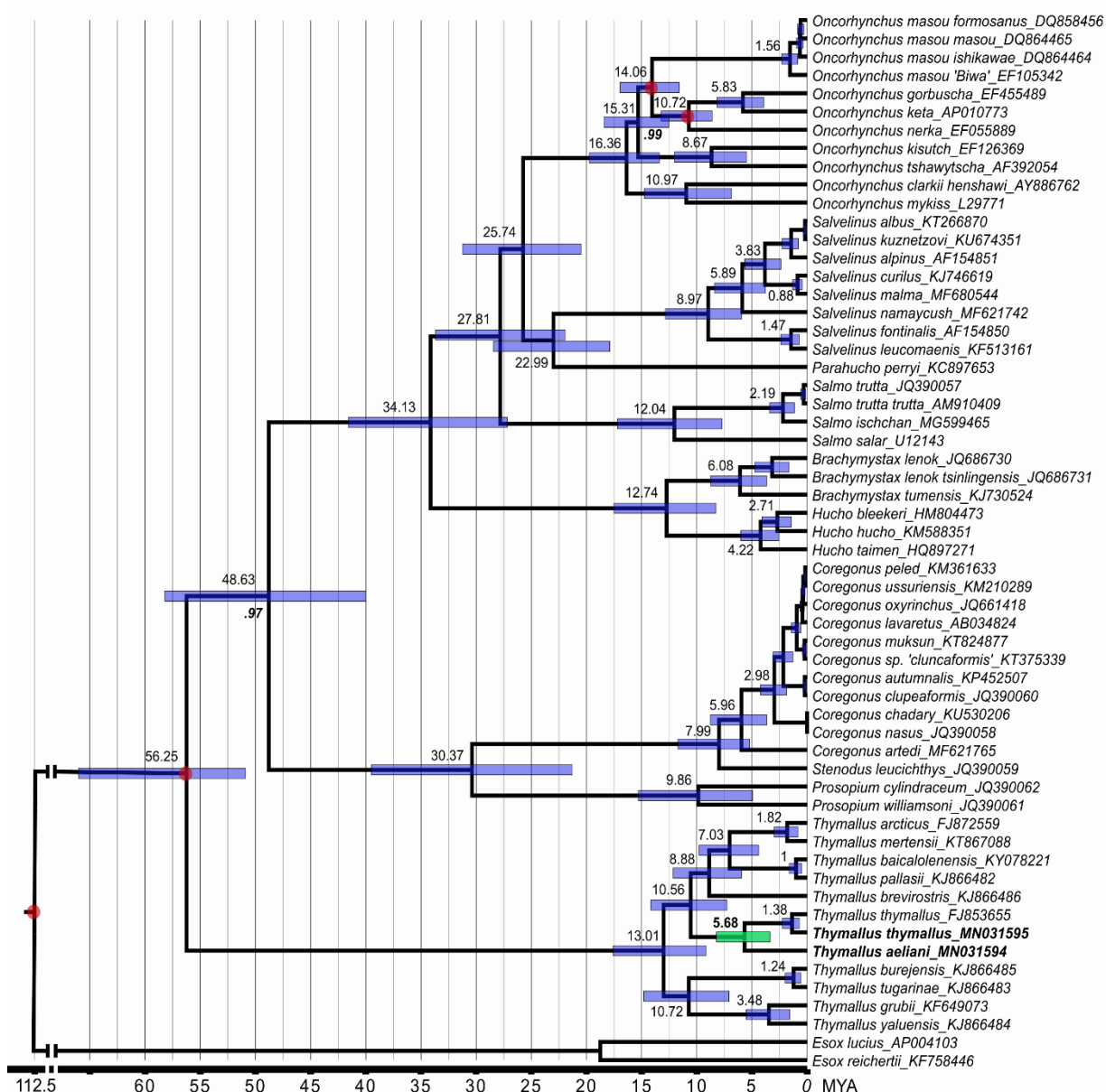
S programom PartitionFinder2 smo glede na substitucijske modele mitogenom lahko razdelili na štiri particije, ki smo jih uporabili za filogenetsko rekonstrukcijo (Preglednica 6).

Preglednica 6: Substitucijski modeli za particije regij mitogenoma uporabljene v filogenetski analizi

Particija	Substitucijski model	Regije v particiji
P1	GTR+I+G+X	12S rRNA, 16S, rRNA, 22 tRNA, kodonsko mesto 1 vseh kodirajočih genov, kodonsko mesto 3 gena ATP8
P2	GTR+I+G+X	kodonsko mesto 2 vseh kodirajočih genov
P3	GTR+I+G+X	kodonsko mesto 3 genov : ATP6, COB, CO1, CO2, CO3, NAD1, NAD2, NAD3, NAD4, NAD4I, NAD5
P4	HKY+I+G+X	intergene regije, vključno z kontrolno regijo in kodonsko mesto 3 gena NAD6

S programom BEAST 2 smo dobili filogenetsko drevo mitogenomov vrstoz taksonov, ki predstavljajo vse rodove v družini salmonidov (Slika 3). Drevo je bilo večinoma dobro statistično podprto (pp /angl. posterior probability/ = 1). Posteriorne verjetnosti nižje od 1 smo opazili le na razcepiščih *Salmoninae-Coregoninae* (pp=0.97) in znotraj rodu *Oncorhynchus*. Vsi do sedaj znani

taksoni so na drevesu zaznani kot monofiletski, Poddružina Thymalinae predstavlja sestrsko skupino poddružini Salmoninae, od katere se je glede na filogenetske podatke ločila pred 56,28 milijoni let. Jadranski lipan (*T. aeliani*) in evropski lipan (*T. thymallus*), ki ju po uradni klasifikaciji obravnavamo kot *T. thymallus*, tvorita sestrski skupini, ki sta se ločili pred 5,68 m.l., se pravi v obdobju Miocena. Mitogenoma evropskega lipana, ki glede na CR pripadata balkanski (Marić et al., 2012) in skandinavski filogenetski liniji (Weiss et al., 2002), sta se ločila pred 1,38 milijoni let, i.e. v obdobju Pleistocena. Ta »jadransko-evropska« skupina tvori sestrsko skupino z večjimi monofiletskimi skupinami lipana; t.i. »Arktični« (*T. arcticus* in *T. mertensii*, TMRCA = 1,82 m.l.n.) , »Sibirski« (*T. baicalolenensis* in *T. pallasii*, TMRCA = 1 m.l.n.) in »Mongolski« (*T. brevirostris*). Vse omenjene skupine pa tvorijo sestrski odnos z lipani iz povodja Amurja in povodja Yalu na korejskem polotoku, kateri tvorijo tako imenovano »južno Azijsko« skupino (*T. burejensis*, *T. tugarinae*, *T. grubii* in *T. yaluensis*, TMRCA = 10,72 m.l.n.). Skupni prednik vseh lipanov naj bi živel pred 13,01 m.l., s tem da se je jadransko-evropska skupina ločila po treh milijonih let (pred 10,56 m.l.). Podobne časovne intervale samostojnega evolucijskega razvoja kot med *T. aeliani* in *T. thymallus* najdemo še pri rodu *Brachymystax* (6,08 m.l.n.), *Hucho* (4,22 in 2.71 m.l.n.), skupino *Salvelinus alpinus* (od 5,89 do 0,88 m.l.n.) in med *O. keta* in *O. gorbuscha* (5,83 m.l.n.). Prav tako podoben čas ločitve opazimo znotraj rodu *Coregonus* (od 5,96 do 0 m.l.n.).



Slika 3: Kalibrirano filogenetsko drevo mitogenomov družine Salmonidae. Vse posteriorne verjetnosti znašajo 1, če ni prikazano drugače z odebeljeno številko pod razcepiščem. Številke nad razcepišči predstavljajo čas najbližjega skupnega prednika skupin, modri trakovi pa 95% časovni interval zaupanja (HPD, angl. Highest posterior density) cepitev. Cepitev med *T. aeliani* in *T. thymallus* je obarvana z zelenim trakom. Rdeče pike so kalibracijski intervali molekularne ure, določeni na podlagi fosilov

4.2 ANALIZA MUZEJSKIH VZORCEV NA PODLAGI CR mtDNK

4.2.1 Uspešnost izolacije in pomnoževanja PCR

Preglednica 7: Seznam pregledanih muzejskih primerkov, uspešnost pomnoževanja PCR in haplotipna identiteta primerka. Uspešnost pomnoževanja in sekvenciranja fragmentov A/B/C je v tabeli podana z 1 za uspešno pomnožitev in 0 za neuspešno pomnožitev. Pridobljeni haplotipi predstavljajo združeno zaporedje fragmentov A, B in C

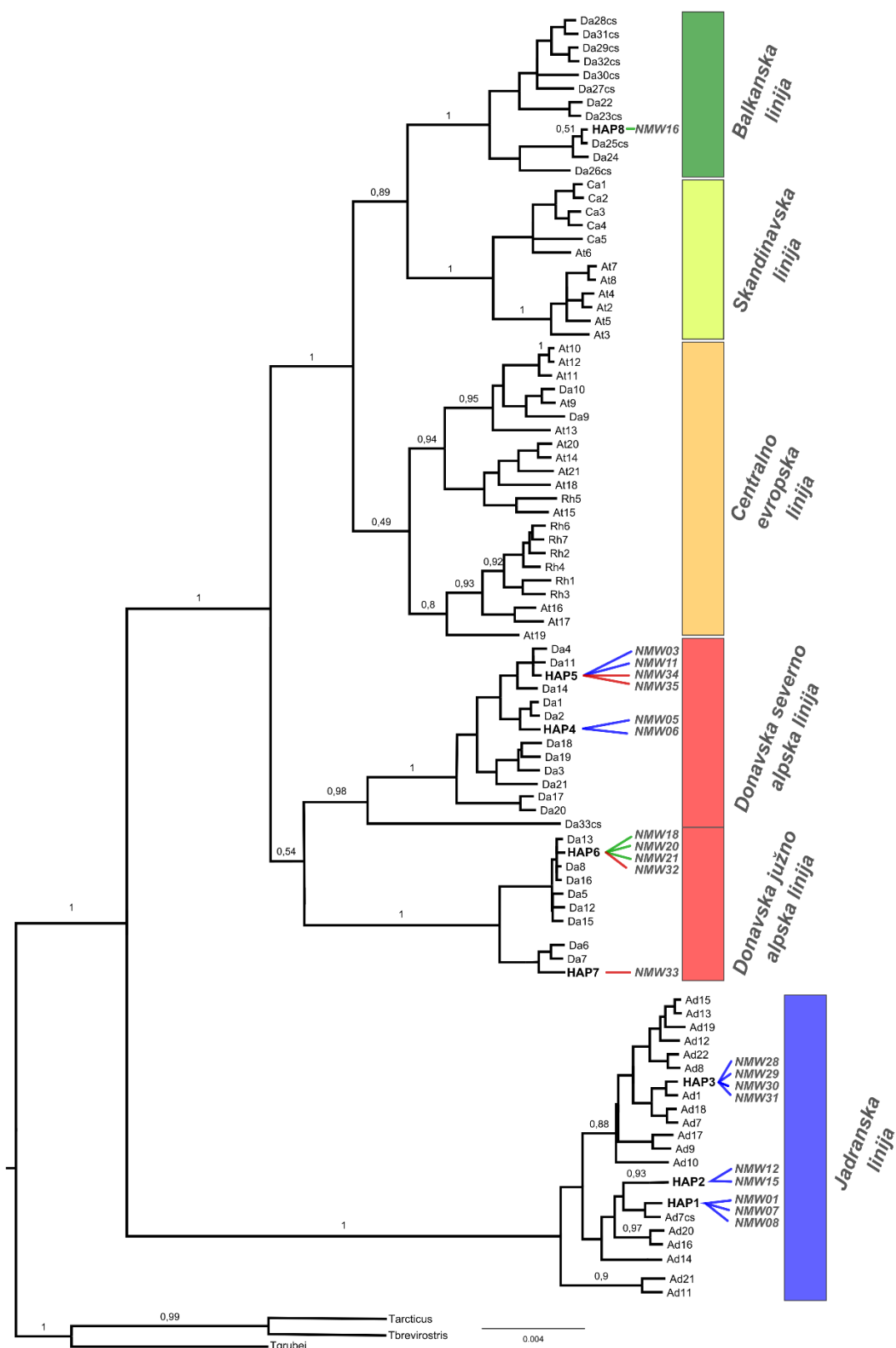
Oznaka / zaporedna št.	Arhivska številka primerka	Originalno vrstno ime	Lokaliteta (originalna oznaka)	Letnica arhivira nja	Uspešnost pomnoževanja in sekvenciranja frag. A/B/C	Pridobljen haplotip
NMW01	NMW68007	<i>T. vexillifer</i>	ISONZO	1861	1/1/1	HAP1
NMW02	NMW68008:1	<i>T. vexillifer</i>	ISONZO	1861	1/0/0	
NMW03	NMW68008:2	<i>T. vexillifer</i>	ISONZO	1861	1/1/1	HAP5
NMW04	NMW68008:3	<i>T. vexillifer</i>	ISONZO	1861	0/0/1	
NMW05	NMW68009:1	<i>T. vexillifer</i>	ISONZO	1888	1/1/1	HAP4
NMW06	NMW68009:2	<i>T. vexillifer</i>	ISONZO	1888	1/1/1	HAP4
NMW07	NMW68010:1	<i>T. vexillifer</i>	ISONZO	1899	1/1/1	HAP1
NMW08	NMW68010:2	<i>T. vexillifer</i>	ISONZO	1899	1/1/1	HAP1
NMW10	NMW68019	<i>T. vexillifer</i>	FISHMARKT MILANO	1877	1/1/0	
NMW11	NMW68022	<i>T. vexillifer</i>	ETSCH	1856	1/1/1	HAP5
NMW12	NMW68074	<i>T. vexillifer</i>	FLITSCH	1888	1/1/1	HAP2
NMW13	NMW68075	<i>T. vexillifer</i>	FLITSCH	1888	1/1/0	
NMW14	NMW68011:1	<i>T. vexillifer</i>	TOLMINEN	1899	1/0/0	
NMW15	NMW68011:2	<i>T. vexillifer</i>	TOLMINEN	1899	1/1/1	HAP2
NMW16	NMW68017	<i>T. vexillifer</i>	WOCHEINER SAVE	1880	1/1/1	HAP8
NMW18	NMW68072:1	<i>T. vulgaris</i>	WOCHEINER SAVE	1880	1/1/1	HAP6

Oznaka / zaporedna št.	Arhivska številka primerka	Originalno vrstno ime	Lokaliteta (originalna oznaka)	Letnica arhivira nja	Uspešnost pomnoževanj a in sekvenciranja frag. A/B/C	Pridobljen haplotip
NMW19	NMW68072:2	<i>T. vulgaris</i>	WOCHEINER SAVE	1880	1/1/0	
NMW20	NMW68072:3	<i>T. vulgaris</i>	WOCHEINER SAVE	1880	1/1/1	HAP6
NMW21	NMW68072:4	<i>T. vulgaris</i>	WOCHEINER SAVE	1880	1/1/1	HAP6
NMW22	NMW68031:1	<i>T. vexillifer</i>	VITEZ,BIH	1896	0/0/0	
NMW23	NMW68031:2	<i>T. vexillifer</i>	VITEZ,BIH	1896	0/1/0	
NMW24	NMW68031:3	<i>T. vexillifer</i>	VITEZ,BIH	1896	1/1/0	
NMW25	NMW68031:4	<i>T. vexillifer</i>	VITEZ,BIH	1896	0/1/1	
NMW26	NMW68031:5	<i>T. vexillifer</i>	VITEZ,BIH	1896	0/1/1	
NMW28	NMW68027:1	<i>T. vexillifer</i>	LAGO MAGGIORE	1888	1/1/1	HAP3
NMW29	NMW68027:2	<i>T. vexillifer</i>	LAGO MAGGIORE	1888	1/1/1	HAP3
NMW30	NMW68090:1	<i>T. aeliani</i>	LAGO MAGGIORE	1881	1/1/1	HAP3
NMW31	NMW68090:2	<i>T. aeliani</i>	LAGO MAGGIORE	1881	1/1/1	HAP3
NMW32	NMW68023:1	<i>T. vexillifer</i>	SCHAGL (AUTHAL)	1880	1/1/1	HAP6
NMW33	NMW68023:2	<i>T. vexillifer</i>	SCHAGL (AUTHAL)	1880	1/1/1	HAP7
NMW34	NMW62263:3	<i>T. vexillifer</i>	FISCHA BEI LICHTENWORTH	1882	1/1/1	HAP5
NMW35	NMW62263:4	<i>T. vexillifer</i>	FISCHA BEI LICHTENWORTH	1882	1/1/1	HAP5
NMW36	NMW20237	<i>T. vulgaris</i>	UNGARN	1861	0/0/0	
NMW37	NMW20238	<i>T. vulgaris</i>	UNGARN	1861	0/0/0	

4.2.2 Identifikacija haplotipov in filogenetska analiza

Iz treh fragmentov muzejske DNK smo pridobili 582 bp dolga zaporedja, skupna poravnava z ekstantnimi haplotipi, pridobljenimi iz baze podatkov NCBI, pa je bila dolga 763 bp. Zaporedjem muzejskih vzorcev smo za odseke z manjkajočim nukleotidnim zaporedjem dodali identifikator N,

ki predstavlja neznani nukleotid. Pri muzejskih vzorcih smo našli osem haplotipov, ki so skupaj z ekstantnimi haplotipi tvorili dobro podprte ($pp=1$) monofiletske skupine (Slika 4 in preglednica 8). Muzejski vzorci pripadajo štirim različnim filogenetskimi linijam, ki smo jih v vseh nadaljnjih grafičnih podobah barvno kodirali; Jadranski (angl. *Adriatic*, modra barva), Balkanski (angl. *Balkan*, zelena barva), Donavski severno alpski (angl. *Danubian northern Alps*, rdeča barva) in Donavski južno alpski (angl. *Danubian southern Alps*, rdeča barva).



Slika 4: Filogenetsko drevo na podlagi CR mtDNK. Filogenetske linije so barvno zakodirane, številke nad razcepišči predstavljajo posteriorno verjetnost. Identifikacijska oznaka haplotipa predstavlja zaporedje uporabljeno v analizi, z barvnimi črtami so do haplotipov povezani muzejski primerki,

pri katerih smo našli dotični haplotip. Barva črte, ki povezuje vzorce, določa povodje oz. porečje, iz katerega primerek izhaja; modra – jadransko povodje, rdeča – dravsko porečje, zelene – savsko porečje

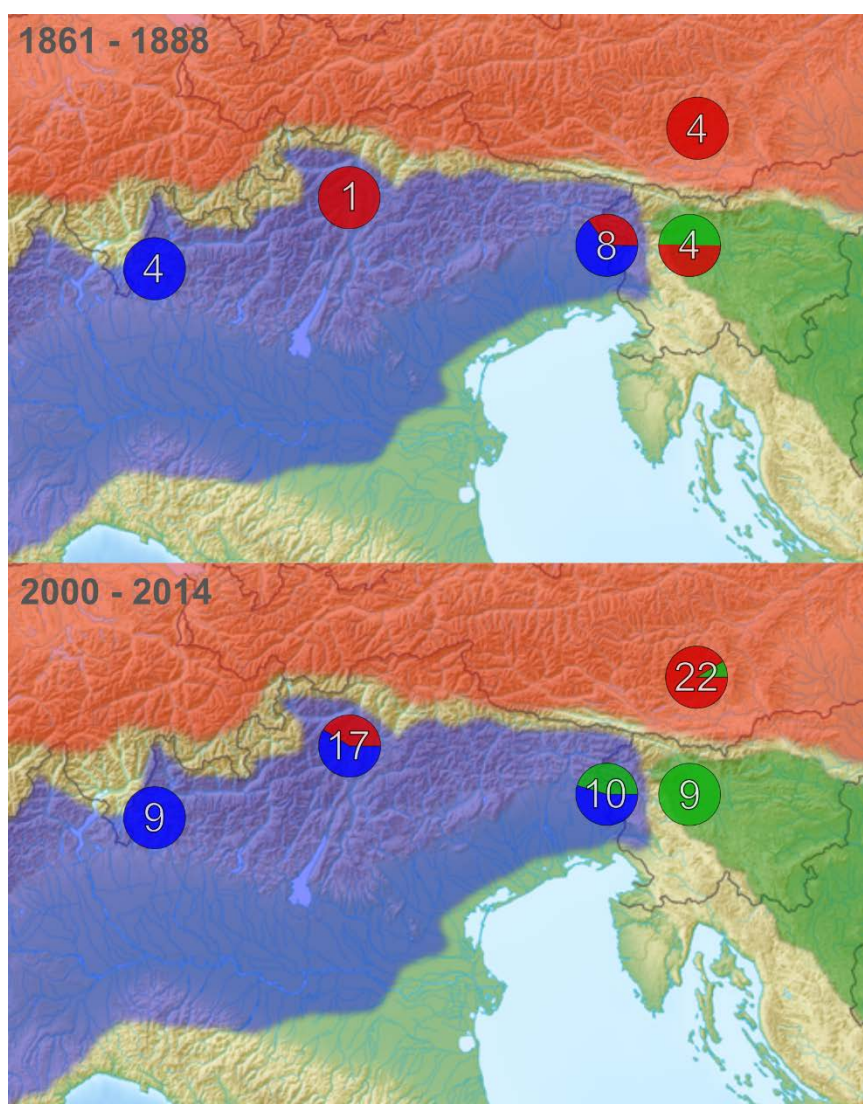
Pri treh muzejskih primerkih iz Soče (l. 1861 in 1899) smo našli haplotip HAP1, ki je identičen že opisanemu haplotipu AD7cs, značilnem za sedanje jadranske lipane iz Soče. Poleg tega smo še pri dveh muzejskih primerkih iz Soče (l. 1888 in 1899) našli haplotip HAP2, ki se od HAP1 razlikuje za en bp, oba pa sta značilna za jadransko filogenetsko linijo lipana. Za jadransko linijo značilen haplotip HAP3 smo našli pri primerkih iz jezera Magiore (l. 1881 in 1888), ki je glede na 582 bp dolge sekvence identičen haplotipom, ki so značilni za lipana v reki Sesiji, Magiji in Adiži. Pri vseh ostalih uspešno posekvenciranih vzorcih smo našli haplotipe, ki pripadajo filogenetskim linijam, značilnim za donavsko povodje. Pri preostalih primerkih iz Soče smo našli dva haplotipa, značilna za donavsko severno alpsko filogenetsko linijo (dravsko) in sicer HAP4 (l. 1888) in HAP5 (l. 1861), slednjega smo našli tudi v edinem primerku iz Adiže (l. 1856), ki se nahaja v severnem delu jadranskega povodja v Italiji. HAP5 smo našli tudi pri primerkih iz reke Fische (l. 1882), ki je v preteklosti tekla v bližini Dunaja. Oba omenjena haplotipa (HAP4 in HAP5) sta značilna za reki Dravo in Inn ter njune pritoke (Weiss in sod., 2002), najdemo pa jih tudi v rekah jadranskega povodja; Adiža, Adda in Brenta (Meraner in Gandolfi, 2012). Pri primerkih iz Save Bohinjke (l. 1880) smo našli haplotip HAP8 in HAP6. Haplotip HAP8 je najbolj podoben ekstantnemu haplotipu Da25cs, katerega najdemo tudi dandanes na tej lokaciji in se uvršča v balkansko filogenetsko linijo (Marić in sod., 2012). Haplotip HAP6 pa je značilen za donavsko južno alpsko filogenetsko linijo, sorodne ekstantne haplotipe pa najdemo v porečju Drave (Weiss in sod., 2002). Haplotip HAP6 je bil določen tudi pri enem primerku iz lokacije Schagl (Authal), katero prepoznavamo kot levi pritok reke Mure nad Gradcem, vendar o pravi lokaliteti na podlagi muzejskega kataloga ne moremo biti povsem prepričani, se pa zagotovo nahaja v Donavskem povodju. Na tej lokaciji smo našli še haplotip HAP7, ki se od haplotipa HAP6 razlikuje v eni mutaciji.

Preglednica 8: Identifikacija haplotipov pridobljenih iz muzejskih primerkov

Filogenetska linija lipana	Oznaka vzorca	Lokaliteta	Letnica	Haplotip	Identičnost z znanim haplotipom	Večje reke z ekstantnih populacij z opisanim haplotipom
Jadranska filogenetska linija (AD: angl. <i>Adriatic</i>)	NMW01	Soča	1861	HAP1	Ad7cs	Soča, Adiža
	NMW07	Soča	1899			
	NMW08	Soča	1899			
	NMW12	Soča (Bovec)	1888	HAP2	Ad7cs*	
	NMW15	Soča (Tolmin)	1899			
	NMW28	Jezero Magiore	1888	HAP3	Ad1, Ad7, Ad8, Ad18, Ad22	Sesija, Magija, Adiža
	NMW29	Jezero Magiore	1888			
	NMW30	Jezero	1881			

		Magiore				
	NMW31	Jezero	1881			
		Magiore				
Donavska severno	NMW05	Soča	1888	HAP4	Da1, Da20	Drava, Inn,
alpska filogenetska	NMW06	Soča	1888			Adiža, Brenta,
linija (DNA: angl.						Adda
<i>Danubian northern</i>	NMW03	Soča	1861	HAP5	Da4, Da11,	Drava, Sava,
<i>Alps</i>)	NMW11	Adiža	1856		Da14,	Inn, Adiža,
	NMW34	Fischa p.	1882		Da17,	Brenta
		Lichtenworth			Da22, Da30	
	NMW35	Fischa p.	1882			
		Lichtenworth				
Donavska južno	NMW18	Sava Bohinjka	1880	HAP6	Da31*,	Drava, Adiža
alpska filogenetska	NMW20	Sava Bohinjka	1880		Da32*,	
linija (DSA: angl.	NMW21	Sava Bohinjka	1880		Da36*	
<i>Danubian southern</i>	NMW32	Schagl (Mura)	1880			
<i>Alps</i>)	NMW33	Schagl (Mura)	1880	HAP7		
Balkanska	NMW16	Sava Bohinjka	1880	HAP8	Da25cs*,	Sava Bohinjka
filogenetska linija					Da24*,	
(BA: angl. <i>Balkan</i>)					Da34*	

Primerjava deleža haplotipov različnih filogenetski linij med obdobjem 1861-1899 (muzejski vzorci) in današnjim stanjem je v reki Soči razkrila premik iz zastopanosti jadranske in donavske filogenetske linije pri muzejskih primerkih v zastopanost jadranske in balkanske filogenetske linije pri ekstantnih primerkih (Slika 5). Če tretiramo vse muzejske primerke iz reke Soče kot eno populacijo, vidimo, da je bila zastopanost haplotipov jadranske filogenetske linije 55% (5 vzorcev). Dandanes je zastopanost haplotipov jadranske linije v reki Soči 50%, s tem da preostali delež pripada haplotipom balkanske linije, medtem ko je preostali delež pri muzejskih primerkih pripadal donavsko severno alpski filogenetski liniji. Podobno haplotipov značilnih za donavsko južno alpsko filogenetsko linijo ne najdemo več pri populaciji iz Save Bohinjke, kjer vseh devet ekstantnih vzorcev poseduje haplotip značilen za balkansko filogenetsko linijo, medtem je delež te linije pri muzejskih 50%, dva vzorca namreč pripadata zgoraj omenjeni donavski južno alpski liniji. Nespremenjeno stanje opazimo le pri populaciji iz jezera Magiore, kjer je tako za muzejske kot ekstantne vzorce značilen haplotip jadranske linije. Sprememb stanja v Adiži, ki je verjetno posledica enega samega muzejskega primerka, in vzorcih, ki jih lahko tretiramo kot vzorce Drave in Donave (4 vzorci), ne moremo ovrednotiti. Slednji se nahajajo na zelo oddaljenih lokalitetah s slabo kataloško identifikacijo in prave lokalitete za primerjavo ne moremo določiti, vendar vemo, da se lokaliteti muzejskih primerkov nahajajata v širšem območju, kjer najdemo haplotipe donavsko alpskih filogenetskih linij, katerima pripadajo tudi haplotipi muzejskih vzorcev.



Slika 5: Zemljevid lokalitet in primerjava zastopanosti haplotipov glede na filogenetsko linijo lipana. Številke v zgornjem levem kotu prikazujejo letnice obdobja vzorčenja, tortni diagrami prikazujejo delež prisotnosti določene filogenetske linije na lokaliteti, ki jo opisujejo s pozicijo na zemljevidu. Številke v tortnih diagramih prikazujejo skupno število vzorcev. Filogenetske linije so barvno kodirane in sicer; modra – jadranska linija, rdeča – donavsko alpska (dravska) linija, zelena – balkanska (savska) linija

4.3 REZULTATI GENOTIPIZACIJ LIPANOV V REKI SOČI

4.3.1 Vzorci in nabor podatkov

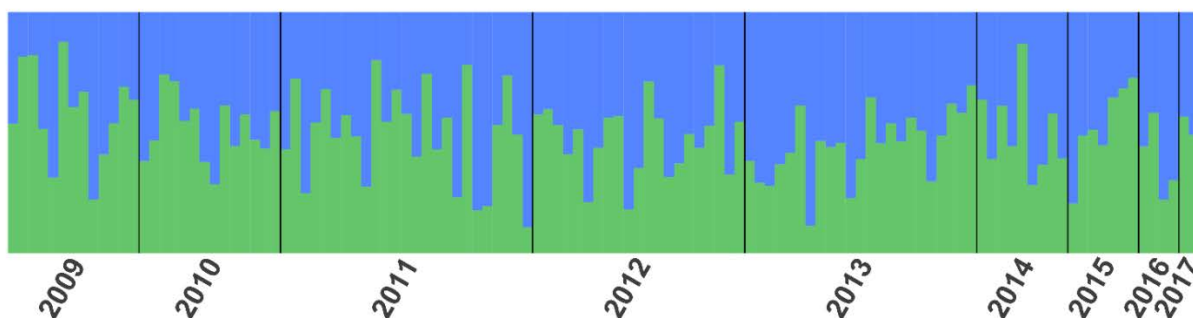
Genotipizirani vzorci izvirajo iz samcev, ki se v okviru ene populacije pojavljajo na treh bližnjih dristiščih v porečju reke Soče. V obdobju med 2009 in 2017 smo izvajali genotipizacijski test pri vseh ujetih samcih na osnovi 11 mikrosatelitnih lokusov. Ustreznost za razplod ujetih samcev je bila določena na podlagi deleža za Sočo in jadransko povodje specifičnih (avtohtonih) alelov. Samci z največ »avtohtonimi« aleli so skupaj s selekcioniranimi samicami ribogojniške linije

prispevali v reprodukcijski bazen tistega leta. Mladice, vzrejene v ribogojnici, so bile naslednjo sezono dopolnilno vložene v ribolovne vode RD Tolmin, med drugim tudi na lokaliteto genotipiziranih vzorcev.

Pridobili smo nabor podatkov 11 mikrosatelitnih lokusov za 118 vzorcev iz obdobja devetih drstnih sezon. Nultih alelov nismo zaznali, delež manjkajočih podatkov iz drstnih sezon 2009 do 2017 je znašal 21,1%. Glede na Evannovo metodo in ob hkratni analizi referenčnih vzorcev lipana iz savskega povodja, ki so bili v preteklosti uporabljeni za poribljanje soškega porečja, smo v vzorčnem setu zaznali dve genetski skupini ($K=2$), kar se sklada s predpostavljenimi filogenetskimi informacijami, da sta v Soči zastopani dve filogenetski liniji, jadranska in balkanska.

4.3.2 Analiza populacijske strukture in primerjava med drstnimi sezonami

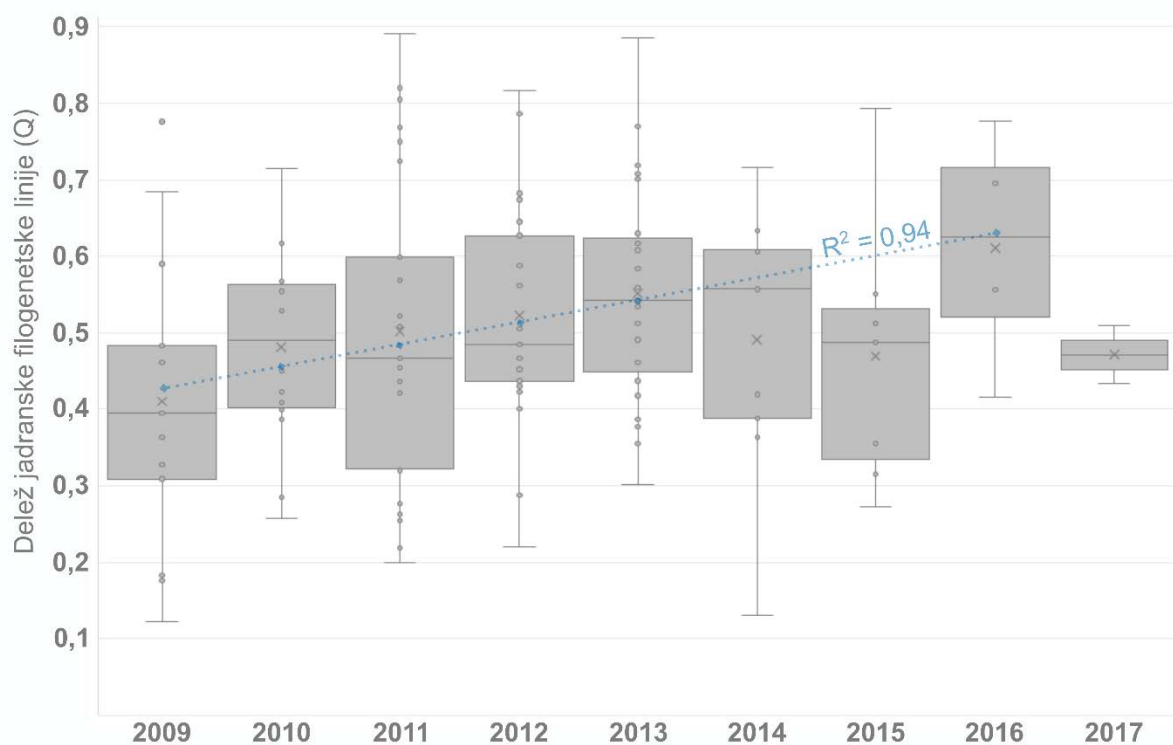
Rezultati, ki jih predstavljamo, temeljijo na izsledkih populacijske analize s programom STRUCTURE 2.3.4., kjer je tako-imenovana čistost osebkov v Soči predstavljena kot Q vrednost pripadnosti jadranski filogenetski liniji posameznega vzorca (Slika 6). Ugotovili smo, da so vsi genotipizirani lipani v porečju Soče hibridi jadranske in balkanske skupine. Povprečje deleža jadranske filogenetske linije vseh osebkov, ujetih v Soči med leti 2009 in 2017, je 0,50. Genetsko »najčistejšega« samca jadranskega lipana smo ujeli leta 2011 in sicer z 0,89 deležem genoma, značilnim za jadransko skupino, medtem ko je bil samec z največjim deležem, značilnim za lipane iz donavskega povodja oziroma Save, ujet leta 2013, z jadransko Q vrednostjo le 0,13. Tekom drstnih sezon je opazen trend zmanjšanja vračanja lipanov na drstišča, oziroma upad števila ujetih samcev. V prvih letih smo brez težav ujeli vsaj deset samcev, medtem ko se je trud za pridobitev divjih samcev občutno povečal v letih od 2014 do 2017, ko smo nazadnje ujeli zgolj dva osebkov.



Slika 6: Rezultati analize STRUCTURE. Vertikalne črte predstavljajo osebek, z genetskim deležem ki pripada določeni skupini. Z zeleno je kodirana skupina balkanske filogenetske linije, z modro pa jadranske filogenetske linije. Črne vertikalne črte delijo populacije oziroma drstne sezone označene s številkami

Primerjali smo povprečne vrednosti deleža jadranske filogenetske linije med drstnimi sezonami. V prvih letih vzorčenj (2009 do 2013) lahko spreminjanje deleža opišemo linearno ($R_2 = 0,94$) z vsakoletnim povečanjem deleža avtohtonosti za 2,2% (Slika 7). Najnižjo povprečno vrednost avtohtonega deleža smo zaznali leta 2009 in sicer 0,41, medtem ko je bila leta 2013 vrednost 0,55. V letih 2014 in 2015 smo opazili padec povprečne »čistosti« ujetih lipanov, kar leta 2014 sicer

lahko pripišemo predvsem večji varianci Q vrednosti pri analiziranih osebki, Povprečen delež jadranske filogenetske linije je leta 2015 zopet znašal zgolj 0,47. Leta 2016 smo zaznali najvišjo povprečno vrednost Q 0,61, kar sledi linearnemu zviševanju jadranskega deleža za 2,2% (2,25%) na leto od leta 2013. Kljub zaznanemu trendu pa povprečnih vrednosti od leta 2014 naprej zaradi majhnega števila vzorcev ni mogoče jemati z enako mero statistične verodostojnosti kot pri prvih letih vzorčenj. Zadnje zabeleženo povprečje Q = 0,47 leta 2017 je bilo izračunano le na podlagi dveh vzorcev. Leta 2018 na tej lokaciji nismo uspeli ujeti lipanov na drsti.



Slika 7: Delež jadranske filogenetske linije pri lipanih ujetih tekom zaporednih devetih drstnih sezon. Posamezni vzorci so predstavljeni kot prazni krogi, vsake drstne sezone, označene z letnico. Povprečje je označeno z x, medtem ko je mediana označena z horizontalno črto. Modre pike znotraj drstnih sezon označujejo uporabljene populacije pri izračunu linearne regresije, označene z modro črtkano črto

4.4 KVALITETA SEKVENCIRANJA IN NABOR ddRAD-značk

4.4.1 Uspešnost izolacij, izbor restrikcijskih encimov in uspeh sekvenciranja

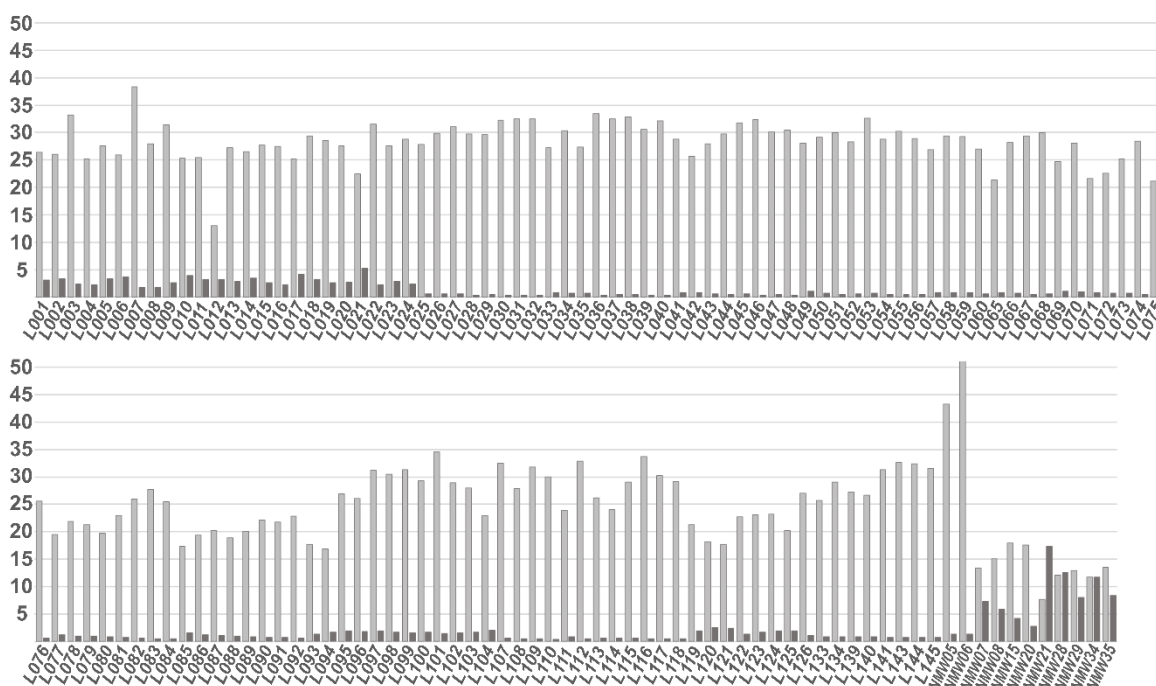
Preverjanje uspešnosti izolacij, koncentracije in celovitosti DNK molekul v izolatih je pokazala, da so vsi izbrani vzorci primerni za pripravo knjižnic sekvenciranja naslednje generacije po metodi ddRAD-seq.

Simulacija *in silico* restrikcije genoma atlantskega lososa je kot možne encime predlagala kombinaciji *PstI* in *MboI*, ter *PstI* in *MspI*. Preliminarno sekvenciranje smo opravili na vzorcih iz reke Soče (SC) in Save Bohinjke (BS). Preliminarna bioinformatična analiza opravljena s programom

STACKS 1.8.2 je pri analizi obeh kombinacij restrikcijskih encimov pokazala, da s kombinacijo *PstI* – *MspI* sicer pridobimo manjše število ddRAD-značk, ki pa so med vzorci bolj polimorfne. Analize smo opravili z različnimi filtracijskimi in izbirnimi parametri, rezultati katerih so vedno pokazali na boljše razmerje med številom ddRAD-značk in SNP mesti pri kombinaciji encimov *PstI* – *MspI*, ki smo jo uporabili za ddRAD-seq celotnega nabora vzorcev. Povprečna globina sekvenciranja preliminarnih vzorcev je znašala 9,2X. Zaradi relativno nizke globine branja smo za sekvenciranje celotnega nabora ekstantnih in muzejskih vzorcev povečali trud sekvenciranja in tako pridobili skupno 1.119.026.641 surovih zaporedij, od tega smo jih 99,4% uspešno de-multipleksirali.

4.4.2 Bioinformatična analiza odčitkov in sestavljanje ddRAD-značk

Bioinformatične analize smo opravili na 128 ekstantnih in 11 muzejskih vzorcih. Sekvenciranje muzejskih vzorcev NMW01, NMW03, NMW12, NMW30 in NMW32 žal ni bilo uspešno, saj nismo pridobili zadostnega števila odčitkov na vzorec, zato smo jih iz nadaljnjih analiz odstranili (Slika 8). Od vseh odčitkov (1.119.025.641) 139 uspešno sekvenciranih vzorcev jih 2,5 % nismo uspeli prilepiti in poravnati na 51 kromosomov referenčnega genoma lipana. Zanimarili smo tudi 19,9% odčitkov slabše kvalitete (<30 Phred), 3,3% odčitkov, ki so bili prekomerno obrezani in 6,9% odčitkov, katerim nismo uspeli določiti sekvenčnega para (angl. *pair-end*). Skupno smo za sestavljanje ddRAD-značk uporabili 67,4% primarno sekvenciranih odčitkov, katerih povprečna dolžina inserta knjižnic je bila 350,4 bp (SD: 54,7bp) s povprečno 210,4 bp dolgim znanim zaporedjem. To pomeni, da smo s kemijo PE-125 uspeli pridobiti 105,2 bp zaporedja vsake strani sekvenciranih fragmentov. Povprečna globina sekvenciranja je znašala 26,5x (SD: 6,0x), z najmanjšo globino 7,7x pri vzorcu NMW21 in največjo globino 51,6x pri vzorcu NMW06. Pri svežih vzorcih, povprečna globina ne odstopa pretirano od povprečja celotnega nabora vzorcev (27,4x, SD: 4x), medtem ko so razlike pri muzejskih vzorcih precej večje, s povprečno globino odčitkov 19,7x in standardno deviacijo 14,1x. To pripisujemo različni kvaliteti DNK muzejskih vzorcev, predvsem zaradi relativno dolgih (350bp) insertov knjižnic. Vzorca NMW05 in NMW06 imata za muzejske vzorce še posebej izrazito globino sekvenciranja (43,1x in 51,26x).



Slika 8: Globina sekvenciranja naslednje generacije ter delež manjkajočih podatkov. S svetlo sivo je označena globina branja odčitkov, s temno pa delež manjkajočih zaporedij.

Nastavitve modulov *gstacks* in *populations* programa STACKS 2.4.2, smo nastavili tako, da smo za nadaljnje populacijske študije pridobili kar se da popoln nabor podatkov. Po filtraciji smo za celoten nabor podatkov (139 vzorcev) konsenzne dolžine 11.736.930 bp pridobili 112.493 polimorfni SNP mest na 40.213 ddRAD-značkah, katere smo uporabili za nadaljnje analize. Povprečno smo genotipizirali 254,8 baznih mest (SD 0,19). V celotnem naboru vzorcev smo imeli 1,74% manjkajočih podatkov. Največ manjkajočih podatkov smo zaznali pri muzejskih vzorcih in sicer med 2,7% in 11,7% z izjemo vzorcev NMW05 in NMW06, populacije HT, ki sta bila glede na manjkajoče podatke pod povprečjem celotnega nabora vzorcev (1,27% in 1,28%). Več manjkajočih podatkov smo opazili tudi pri vzorcih populaciji SC in BS, ki smo jih sekvencirali ločeno v preliminarni seriji in sicer med 1,7% in 4,2%.

4.5 POPULACIJSKE ANALIZE NA PODLAGI ddRAD-značk

4.5.1 Opisna populacijska statistika in primerjava parnih distanc

Osnovni parametri opisne populacijske statistike na osnovi ddRAD-značk so pokazali (Preglednica 9), da imajo populacije iz povodja reke Soče (Soča-SC, Idrijca-ID, Tolminka-TT in dve populaciji iz ribogojnice Tolminka-RT in RH) najvišji delež polimorfni mest, od 20.944 v Idrijci, do 25.871 v populaciji iz reke Tolminke, ki izvira iz leta 2009. Podobno smo opazili tudi pri opaženi heterozigotnosti (He_{obs}) teh populacij, katera se je gibala med 0,198 in 0,307, z največjo heterozigotnostjo v populaciji ribogojnice Tolminka iz leta 2009. Visoko število polimorfni mest smo opazili še pri populaciji iz reke Adiže jadranskega povodja, 38.932, malo manjšo pa pri

populaciji iz reke Bistrice, 17.849. Medtem ko je bila opažena heterozigotnost populacije iz reke Adiže 0,191, je bila opažena heterozigotnost dravske populacije le 0,085. Vse populacije iz savskega povodja (Sava Bohinjka-BS, Unica-UN in populaciji iz ribogojnic, Bled-RB in Obrh-RO), so imele opaženo heterozigotnost praktično identično 0,076-0,077, medtem ko je bila pri populaciji iz Sesije še nižja (0,062). Pri teh populacijah smo zaznali tudi nižje število polimorfnih mest, in sicer med 7.335 in 7.838 pri savskih populacijah in 8.508 v Sesiji. Te vrednosti so nižje kot pri vzorcih muzejskih primerkov, pri katerih se je število polimorfnih mest gibalo med 10.941-14.338, z izjemo osebkov iz reke Soče (HS), kjer smo določili 7.485 polimorfnih mest. Opažena heterozigotnost je bila najnižja pri muzejskih vzorcih, kar lahko pripišemo majhnemu številu vzorcev in degradirani DNK. Podoben trend kot pri številu polimorfnih mest in opaženi heterozigotnosti opazimo tudi pri genetski raznolikosti (π), ki je najvišja pri populacijah iz povodja reke Soče (0,191-0,293) in Adiži (0,191), medtem ko je pri populacijah iz Drave in savskega porečja precej nižja (0,067-0,082). Genetska raznolikost je bila od ekstantnih populacij najnižja v reki Sesiji (0,055), kar je podobno kot pri muzejskih vzorcih (0,016-0,046). Vzorci muzejske Soče HS, so imeli vrednost 0,025.

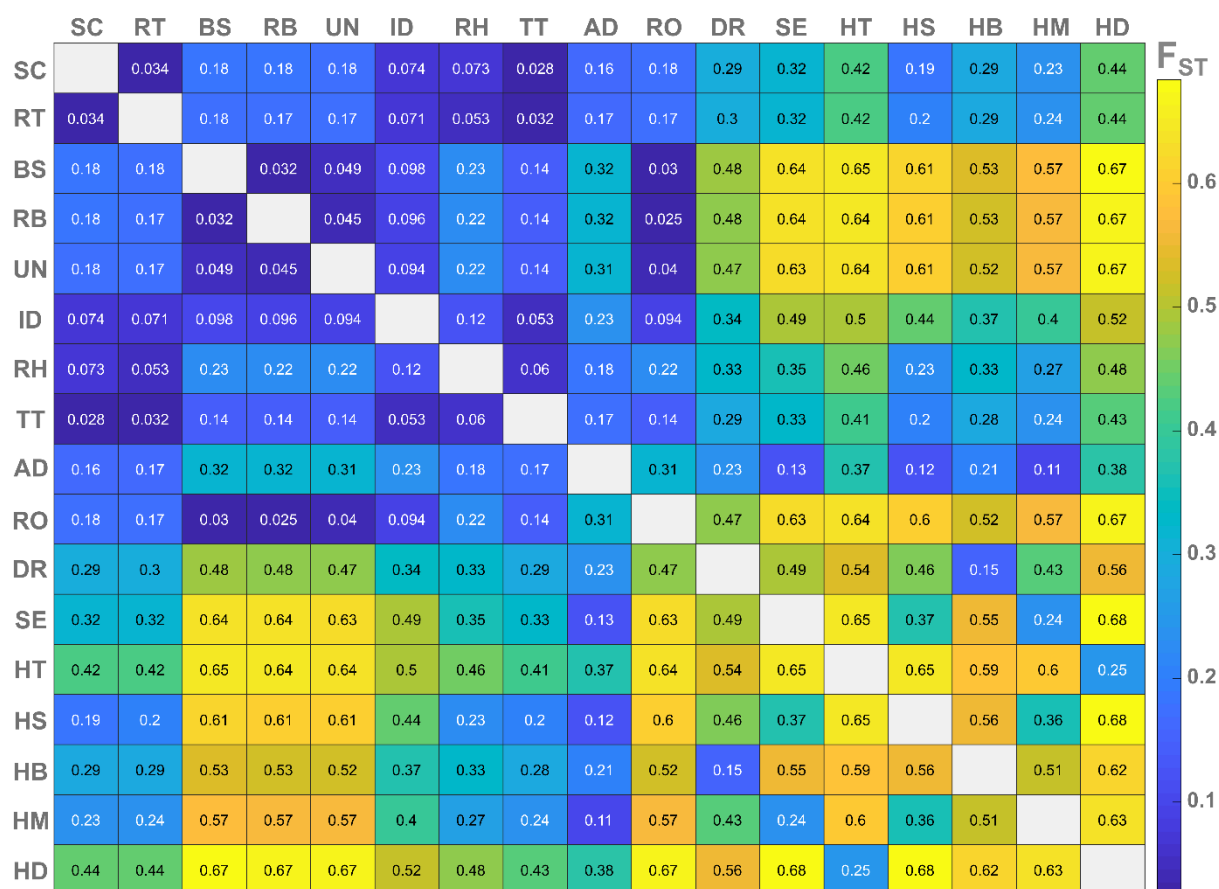
Glede na parameter parjenja v sorodstvu - F_{IS} , populacije ne izkazujejo parjenja v sorodstvu. Najvišje vrednosti F_{IS} so imele ribogojniške populacije, z najvišjo ($F_{IS} = -0,129$) zaznано v ribogojnici Tolminka leta 2009,. Ostale vrednosti pri ribogojniških populacijah (Ribogojnica Bled, Ribogojnica Obrh) so se gibale med -0,014 in -0,020. Opazili smo zanimiv trend v savskem porečju, kjer so bile enake vrednosti F_{IS} prisotne v ribogojnici in bližnji divji populaciji lipana (Ribogojnica Bled in Sava Bohinjka ($F_{IS} = -0,017$), Ribogojnica Obrh in Unica ($F_{IS} = -0,014$)).

Preglednica 9: Osnovni populacijsko genetski parametri populacij. N predstavlja poračun števila sestavljenih celotnih genotipov, SNP označuje delež variabilnih točkovnih mutacij v populaciji, $He(obs)$ je opažena heterozigotnost, $He(exp)$ pričakovana heterozigotnost, π genetska diverziteta in F_{IS} indeks parjenja v sorodstvu

Oznaka	n	Št. privatnih alelov	SNP	$He(obs)$	$He(exp)$	π	F_{IS}
SC	11,7	364	24733	0,294	0,280	0,293	-0,004
RT	11,7	420	24915	0,290	0,269	0,281	-0,020
BS	12,0	142	7335	0,076	0,065	0,067	-0,017
RB	12,0	166	7533	0,077	0,066	0,069	-0,017
UN	11,9	216	7747	0,077	0,067	0,070	-0,014
ID	6,0	170	20944	0,198	0,176	0,192	-0,011
RH	11,9	178	21754	0,307	0,237	0,248	-0,129
TT	11,9	520	25871	0,283	0,273	0,285	0,009
AD	9,9	8671	38932	0,191	0,181	0,191	0,005
RO	12,0	178	7838	0,077	0,067	0,070	-0,014
DR	7,9	2627	17849	0,085	0,077	0,082	-0,004
SE	8,0	1845	8508	0,062	0,052	0,055	-0,014
HT	2,0	6129	14338	0,039	0,026	0,036	-0,005
HS	2,8	4642	7485	0,028	0,020	0,025	-0,006

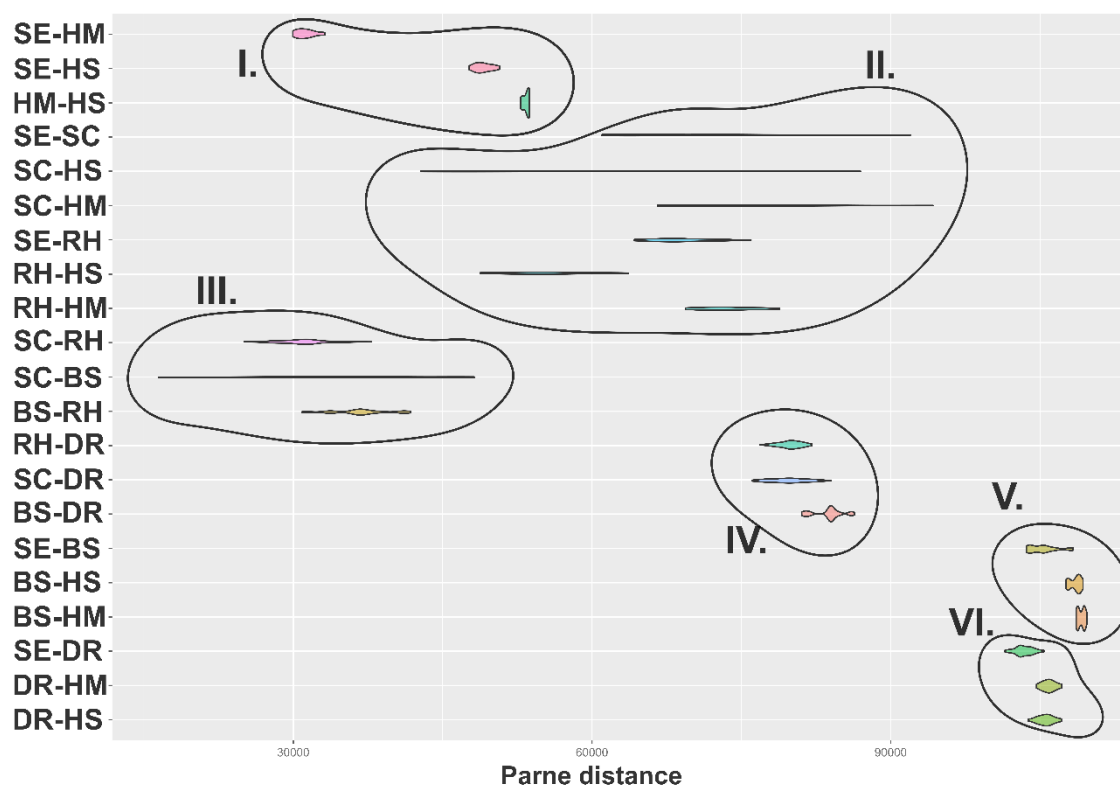
Oznaka	n	Št. privatnih alelov	SNP	He(obs)	He(exp)	π	F_{IS}
HB	1,8	8450	13394	0,044	0,026	0,039	-0,008
HM	1,8	8010	12488	0,045	0,033	0,046	0,001
HD	1,8	6861	10941	0,019	0,011	0,016	-0,004

Pri primerjavah parnih distanc (F_{ST}) polimorfnihih mest med pari populacij (Slika 9), smo zaznali najnižje vrednosti med savskimi populacijami (0,025-0,049), z najnižjo med populacijama ribogojnic Bled in Obrh. V populacijah Soškega porečja smo zaznali vrednosti med 0,028 in 0,12. Najbolj podobni sta si bili divji populaciji iz Soče in Tolminke 0,034, medtem ko so bile zaznane distance največje pri parnih primerjavah populacij iz Soče s populacijo iz Idrijce 0,071-0,12. Populaciji iz ribogojnice Tolminka, se razlikujeta za vrednost 0,053, kar je največ v Soških populacijah. Primerjava Soških populacij z muzejskima vzorcema, pri katerih smo identificirali jadranski mitohondrijski haplotip (HS) prikazuje vrednosti med 0,19-0,23, podobno se Soške populacije razlikujejo od Savskih populacij 0,14-0,22. Populacija iz Idrijce se napram Soškimi od Savskih populacij razlikuje manj, 0,094-0,098 in več od muzejske populacije HS 0,44. Ti trije muzejski vzorci so najbolj podobni populaciji iz reke Adiže 0,12, medtem ko so od muzejskih vzorcev iz reke Soče, pri katerih smo našli Dravski mitohondrijski haplotip razlikujejo za 0,42, od Dravske populacije pa 0,46. Razdalja z muzejskima vzorcema iz jezera Maggiore 0,36 je praktično enaka razdalji s populacijo iz reke Sesije 0,37, medtem ko se od Savskih loči za 0,61, kar je ena izmed najvišjih števil v naboru podatkov. Največje parne razlike smo zaznali med vzorci iz reke Sesije in Savskimi 0,64 in Sesije in dravskimi 0,49. Podobne razlike s preostankom nabora podatkov, kot jih zaznavamo pri dravski populaciji napram ostalim, zaznamo tudi pri muzejskih vzorcih, pri katerih smo našli mitohondrijske haplotipe značilne za donavsko alpsko filogenetsko linijo, HT, HB, HD, razlike med njimi pa so bile prav tako visoke 0,56-0,62, z izjemo populacije iz Drave in muzejskima vzorcema iz Save Bohinjke 0,15. Populacija iz reke Adiže se je z vrednostmi 0,11-0,13 shajala s populacijo iz reke Sesije in muzejskimi vzorci HS in HM., malo višje vrednosti pa smo zaznali s Soškimi populacijami 0,16-0,18, ter 0,23 z Dravsko populacijo.



Slika 9: Parne distance F_{ST} med populacijami. Barvna koda, s katero je pobarvan graf, označuje delež F_{ST} s prikazano skalo na desni strani, vrednosti so zapisane tudi v kvadratih, ki označujejo vrednost primerjave dveh populacij.

Rogersove distance poračune na vseh variabilnih lokusih nabora podatkov prikazujejo razmerja med populacijami na eni osi (Slika 10), kjer se ločijo skupine: I. HS, SE, HM, II. Ekstantne populacije Soškega povodja napram skupini I., III. Ekstantne populacije Soškega povodja med seboj in Savi Bohinjki, IV. Dravska populacija napram skupini III., V. Skupina I: napram Savi Bohinjki, VI. Skupina I napram Dravi. Distance prikazujejo, največjo ločenost populacij SE, HM in HS skupine I napram ostalim populacijam, medtem ko so si najbližje ekstantne populacije Soča in Ribojnica Tolminka iz leta 2009, z enako distanco kot sta si ti dve populaciji v relaciji do Save Bohinjke. Populacije znotraj Savskega povodja, so si še bližje pri distanci 10000, vendar zaradi preglednosti nismo risali vseh razmerji, in primerjav.

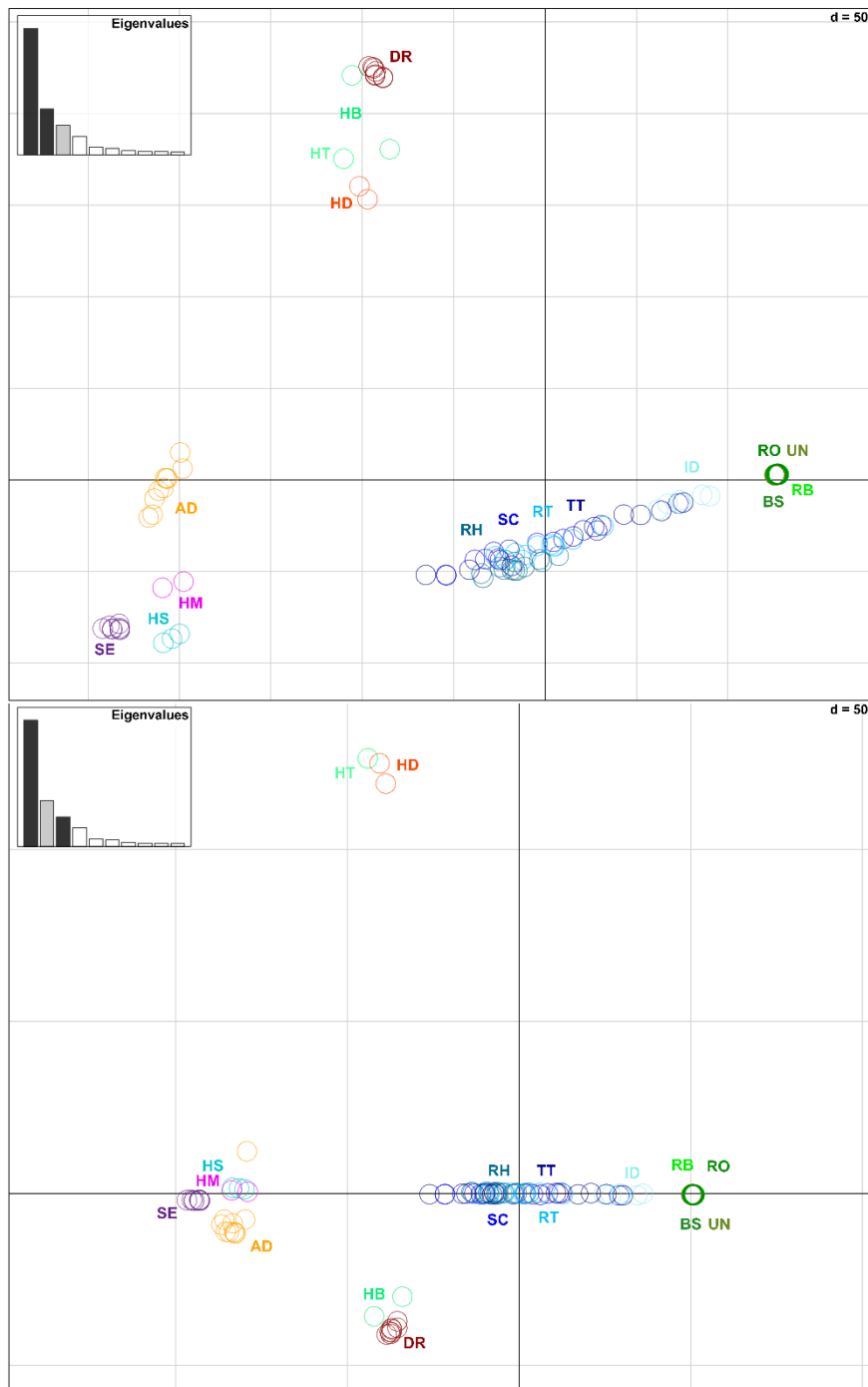


Slika 10: Parne distance med populacijami, izračunane po Rogersovi metodi. Violinski grafi predstavljajo koncentracijo distanc med lokusi dotične parne primerjave. Širši in ožji pomenijo večja razhajanja.

4.5.2 Multivariantne analize

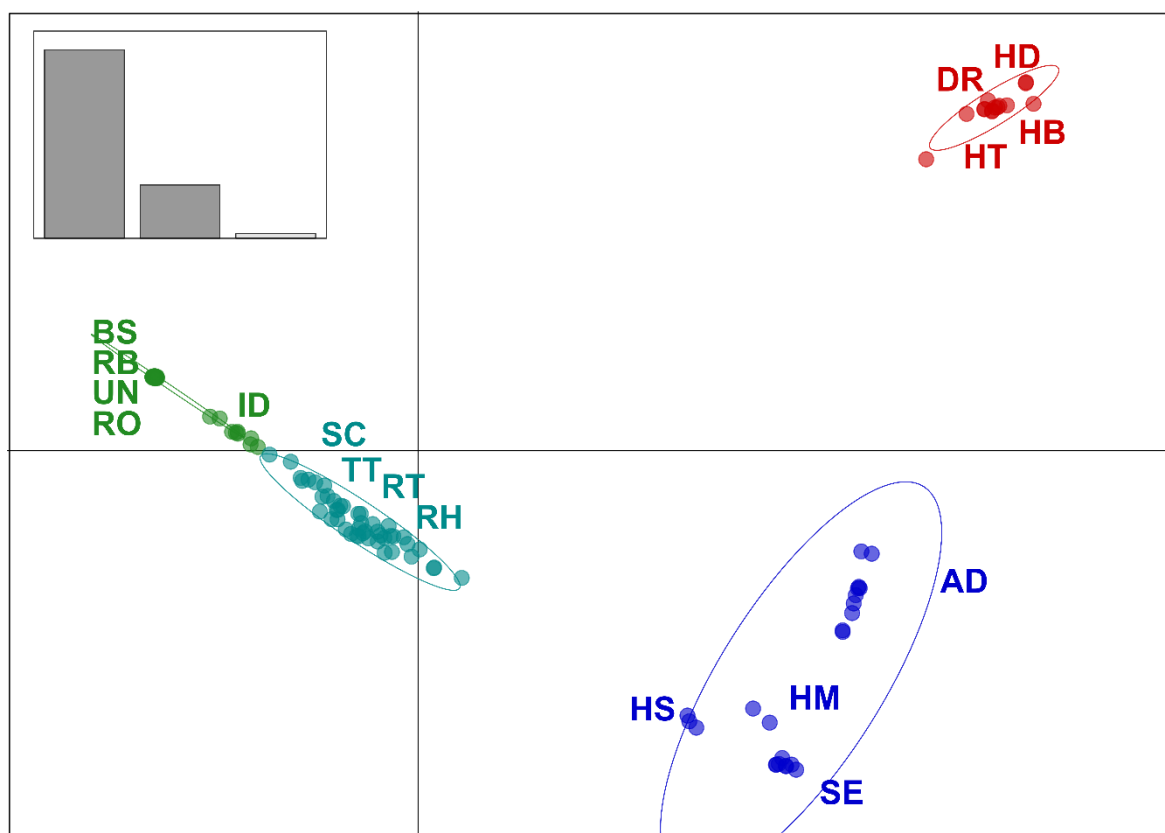
V analizo glavnih komponent (na podlagi mikrohplotipov) smo vključili tri komponente, s katerimi smo opisali 72% variacije med vzorci na podlagi 40.213 polimorfnihi ddRAD-značk (Slika 10). Vzorci so se združevali z vzorci, ki so prihajali iz iste populacije; recentnih migrantov ali recentnih prenosov osebkov med populacijami torej nismo zaznali. Največ variacije smo opisali v prostoru prve in druge komponente (67%), ki sta vzorce ločili glede na različna povodja. S PCA1, ki je opisala 55% variacije, smo razlikovali med vzorci nekaterimi vzorci Jadranskega povodja (Sesija in muzejski populaciji Soče HS in jezera Magiore HM) ter ekstantnimi vzorci iz Savskega povodja. Vsi ekstantni vzorci iz Soškega povodja so bili glede na PCA1 razprostrti na premici med vzorci Savskega in vzorci Jadranskega povodja, vključno z muzejskima vzorcema reke Soče, pri katerih smo odkrili jadranski mitohondrijski haplotip (HS). Vzorci ekstantnih Soških populacij so tvorili najmanj prekrivno skupino, medtem ko vzorcev savskih populacij na tej skali nismo uspeli ločiti, in so vsi vzorci tvorili »točkovno« skupino. Najbližje savskim populacijam je bila populacija iz Idrije. Muzejska vzorca HS iz reke Soče se glede na PCA analizo umeščata v bližino muzejskih vzorcev iz jezera Magiore, ter ekstantnih vzorcev iz reke Sesije in Adiže. Muzejska vzorca reke Soče HT, za katera je značilen donavsko alpski haplotipi CR mtDNK, pa se umeščata v bližino muzejskih vzorcev z donavsko alpskimi haplotipi in ekstantnimi vzorci iz reke Bistrice (Drava). Ti vzorci so se od

ostalnih ločili na osnovi PCA2, ki opiše 12% variacije. PCA3 z variacijo 5% je skupino vzorcev DR-HB-HT-HD ločila na 2 skupini (DR-HB in HT-HD), ki ustrežata tudi filogenetskim linijam donavske severno alpske in donavske južno alpske.



Slika 11: Analiza glavnih komponent (PCA). Zgornja slika opisuje PC1 in PC2, spodnja PC1 in PC3 (zgornji levi kot). Vzorci so predstavljeni s praznimi krogi, barvno kodirani glede na populacijo izvora. PC1 = 55%, PC2 = 12%, PC3 = 5 %

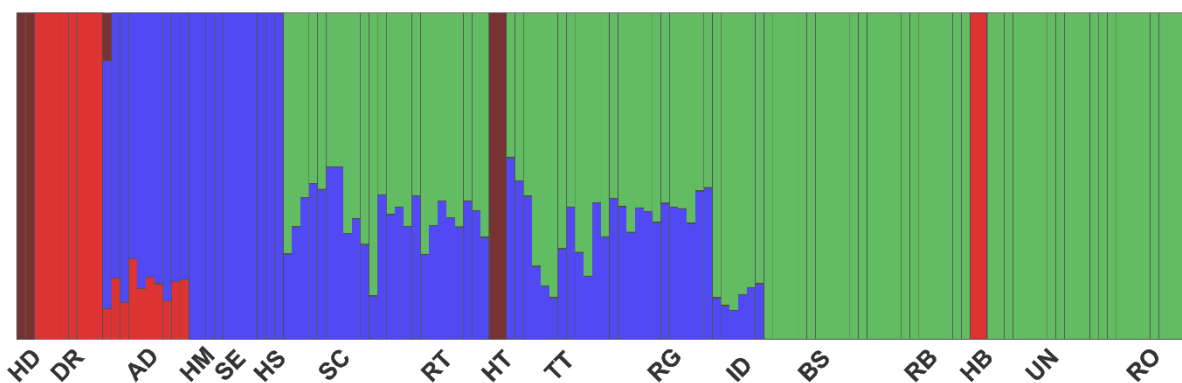
Z diskriminantno analizo glavnih komponent (DAPC), smo ugotavljali strukturiranost vzorcev brez predhodnih informacij pripadnosti povodju ali populaciji in sicer na podlagi 112.493 SNP-jev. Število skupin DAPC smo na osnovi desetih zaporednih analiz na podlagi ocene bayesijskega informacijskega kriterija BIC ocenili na 4. Glede na vrednost α smo zadržali 4 glavne komponente, ki opisujejo 64,3 % variabilnosti in vse diskriminante funkcije (3). Rezultati na podlagi DAPC analize SNP-ov so praktično identični PCA analizi na osnovi mikrohaptotipov. Pri DAPC analizi smo zaznali 4 skupine, ki sovpadajo s filogenetskimi linijami. T.i. jadransko skupino, (Slika 11, označeno z modro barvo), tvorijo vzorci lipanov iz populacij Sesije, Adiže, in muzejski primerki NMW07, NMW08 in NMW15 iz reke Soče in primerka NMW28 in NMW30 iz jezera Magiore. Med vzorci te skupine smo opazili največjo razpršenost. Populacije Savskega povodja tvorijo svojo skupino (na Slika 11 označeni z zeleno barvo), in med njimi ni opaziti variacij. V tej skupini se nahajajo tudi lipani iz reke Idrijce. V neposrednem kontaktu z vzorci Idrijce je skupina, označena s cian barvo («soška» skupina), v kateri najdemo vse ekstantne vzorce iz reke Soče. Vzorci te skupine so razvrščeni na premici med Savsko skupino in Jadransko skupino. V zadnji t.i. dravski skupini (na Slika 11 označeni z rdečo barvo) so vzorci iz ekstantne populacije reke Drave, ter muzejski primerki iz reke v okolici Dunaja NMW34 in NMW35, primerka iz Save Bohinjke NMW20 in NMW21 in primerka iz reke Soče NMW03 in NMW05. Pri vseh muzejskih primerkih dravske DAPC skupine smo našli mitohondrijske haplotipe, ki se uvrščajo v donavsko severno alpsko in donavsko južno alpsko filogenetsko linijo.



Slika 12: Diskriminantna analiza glavnih komponent (DAPC). Vzorci so barvno kodirani glede na pridobljene skupine, imena populacij so pripisana gruči vzorcev kateri pripadajo.

4.5.3 Analize križanj, migracij in introgresij

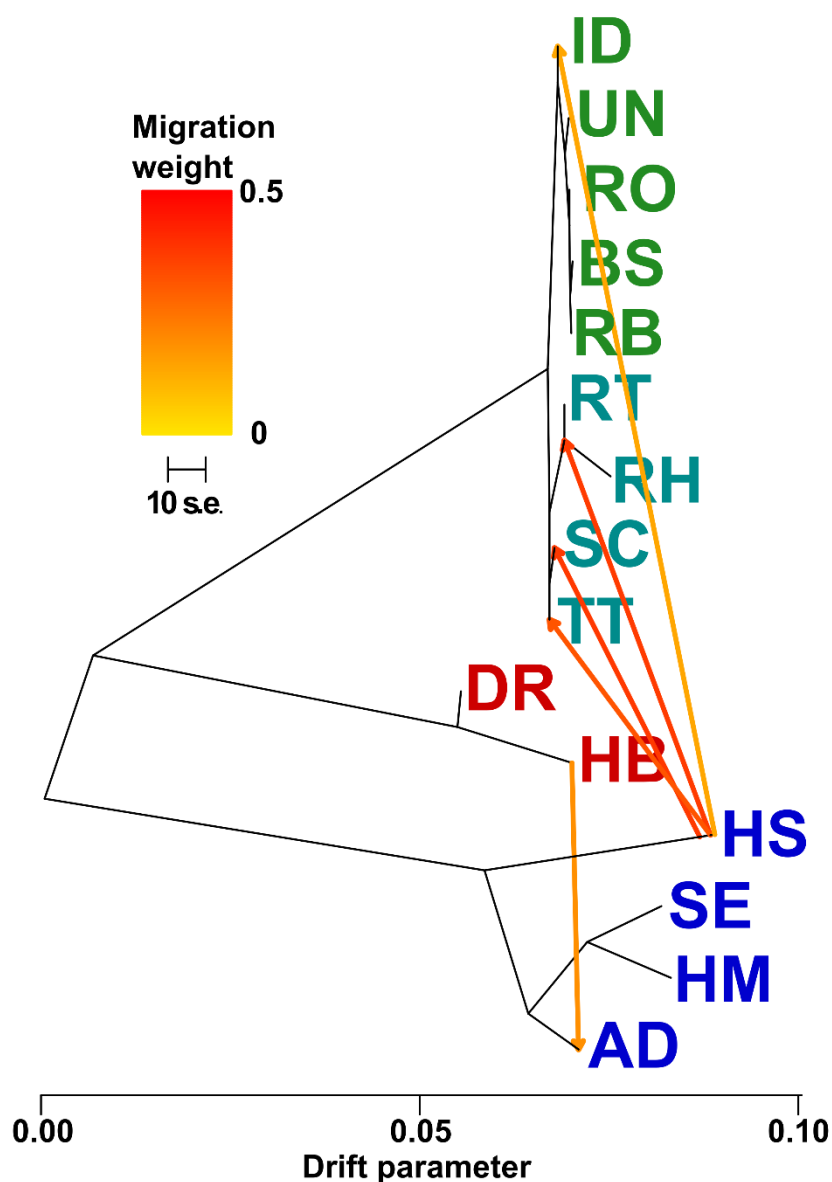
Na osnovi analize podatkovnega niza enega SNP-a na ddRAD-značko v programu FASTSTRUCTURE, z modelom kompleksnosti, ki na podlagi največjega verjetja maksimira mejno verjetnost, kot tudi z modelom komponent, ki najbolje opiše strukturo podatkov, smo določili, da je najverjetnejše število genetskih skupin med analiziranimi vzorci 4 (Slika 12). Skupine so podobno kot pri DAPC analizi sovpadale z geografsko lokacijo oz. s povodji: Jadranska, Savska skupina in dve skupini znotraj dravskega povodja. Število skupin je torej ustrezalo številu filogenetskih linij, ki smo jih zaznali pri analiziranih vzorcih (glej poglavje 4.2). FASTSTRUCTURE analiza ni pokazala ločene skupine za Soške populacije, saj smo v teh populacijah zaznali izključno hibridne osebkke jadranske in savske skupine. Jadranski skupini so v celoti pripadali vzorci reke Sesije, muzejski primerki iz jezera Magiore in vzorci NMW07, NMW08 in NMW15, ki izvirajo iz reke Soče leta 1899. Preostala dva vzorca NMW05 in NMW06 iz leta 1888 pripadata isti skupini kot vzorca iz Fische pri Lichtenworthu, ki je pritok Donave. Četrta skupini pripadajo ekstantni vzorci iz Drave in muzejska primerka iz leta 1880 ujeta v Savi Bohinjki. Tudi pri slednjima ni zaznati hibridizacije z avtohtonimi lipani Save. Savski skupini, označeni z zeleno, pripadajo vsi vzorci populacijah reke Save. Zaznali smo tudi hibridizirane osebkke, in sicer v reki Adiži med jadransko in dravsko skupino, ter pri populacijah Soškega porečja med jadransko in savsko skupino. Pri hibridnih populacijah Soškega povodja največji delež savske skupine zaznamo pri vzorcih iz reke Idrijce ($Q = 0,86$; $sd = 0,031$). Največji delež avtohtonosti jadranskega lipana smo zaznali pri populaciji iz ribogojnice Tolminke leta 2009 ($Q = 0,40$), medtem ko je imela populacija iz reke Tolminke istega leta najnižji delež izmed Soških populacij ($Q = 0,32$), a hkrati tudi največji razpon pri vzorcih in najčistejši zaznani hibridni osebek ($Q = 0,55$) izmed 48ih analiziranih vzorcev iz soškega porečja. Trenutna situacija v reki Soči je s povprečnim deležem avtohtonosti 0,38 precej slaba, z enim odkritim osebkom z zgolj 0,13 in dvema z 0,52 Q vrednostjo jadranske skupine, Nehibridiziranih ekstantnih osebkov v soškem porečju tako nismo zaznali, hibridni indeks osebkov v populacijah pa nakazuje tako imenovano popolno hibridizacijo oziroma hibridni roj. Pri hibridnem roju jadranske in dravske skupine v reki Adiži je bil delež avtohtonega jadranskega lipana precej večji ($Q = 0,75 - 0,88$) v primerjavi s populacijami soškega porečja.



Slika 13: Analiza populacijske strukture FASTSTRUCTURE. Vertikalne črte predstavljajo osebek, z genetskim deležem ki pripada določeni skupini. Z zeleno je kodirana skupina balkanske

filogenetske linije, z modro jadranske filogenetske linije, z rdečo donavsko južno alpske linije, ter bordo donavsko severne alpske Črne vertikalne črte delijo populacije oziroma označene pod grafom

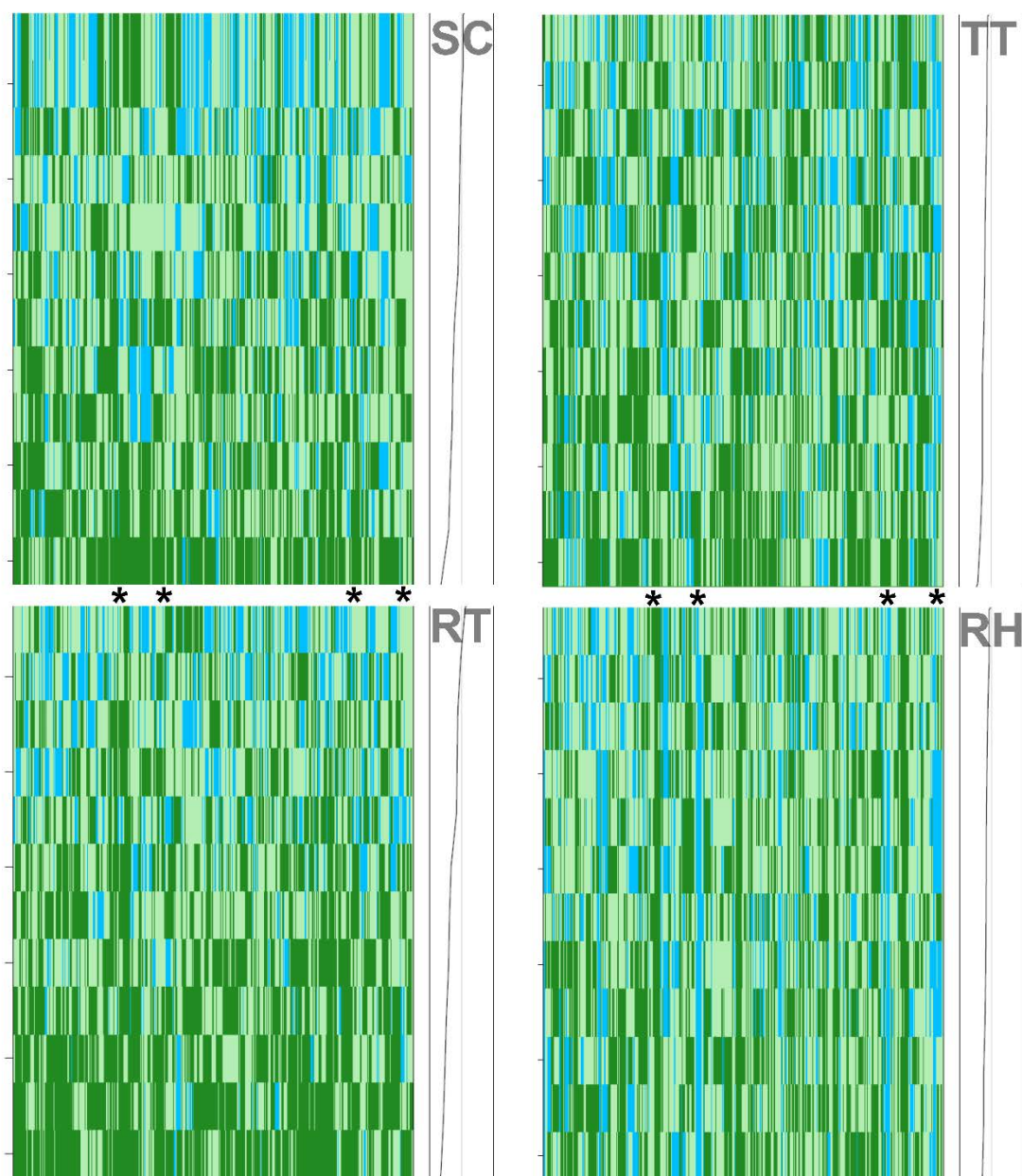
Z uporabo programa Treemix smo izdelali filogenetsko drevo, ki prikazuje genetski zdrs in migracije med populacijami. Na filogenetskem drevesu populacije iz reke Adiže, Sesije in muzejski vzorci iz jezera Magiore tvorijo sestrsko skupino čistim muzejskim primerkom iz reke Soče, in skupaj tvorijo t.i. jadranski klad (Slika 13). Jadranski klad tvori sestrski odnos z Dravsko-Savskim kladom, znotraj katerega lahko ločimo t.i. dravski klad, ki ga sestavljajo vzorci iz Drave in muzejska populacija iz Save Bohinjke, in t.i. savski klad, ki ga tvorijo vsi primerki iz populacij Savskega povodja in Idrijce, in se sestrsko grupirajo s populacijami iz reke Soče. Muzejski primerki iz čiste referenčne populacije iz reke Soče (HS) se torej grupirajo skupaj s preostalimi jadranskimi populacijami, ekstantne Soške populacije pa se grupirajo s Savskimi populacijami. Zaznana je bila precejšnja stopnja migracij, in sicer iz predpostavljene avtohtone populacije reke Soče (referenčni muzejski vzorci) v ekstantne populacije Soškega porečja. To nakazuje na visoko stopnjo introgresije, kjer so glede na genetski zdrs populacije v reki Soči prepoznane kot sestrke Savskim, s tem ko je delež jadranskega klada pri populacijah soškega lažje opisan z visoko stopnjo potencialnih migracij. Migracije smo zaznali tudi iz Dravskih populacij v populacijo reke Adiže.



Slika 14: Drevo maksimalnega verjetja izdelano s TREEMIX. Po globini drevo opisuje parameter genetskega zdrsa, medtem ko je s puščico prikazana smer in intenziteta migracij, barvno kodiarna glede na barvno lestvico (zgoraj levo). Imena populacij so barvno kodirana glede na pridobljene skupine analize DAPC (slika 11)

Introgresijo genoma t.i. savskega lipana, ki se je uporabljal za poribljanje soškega porečja do leta 2006, v genom avtohtonega jadranskega lipana pri populacijah, ki danes naseljujejo Soško porečje, smo ocenjevali s programom Introgress (Slika 14). Za oceno introgresije smo uporabili 21.316 ddRAD-značk, ki se razlikujejo med čistimi referenčnimi genotipi jadranskega lipana iz reke Soče (muzejski vzorci HS) in genotipi, ki so značilni za populacije lipana iz savskega porečja. Ugotovili smo, da je pri vseh ekstantnih vzorcih soškega porečja prišlo do skoraj popolne introgresije z rekombinacijo, kjer ni več zaznati večjih genomskega blokov jadranskega lipana. Tako zaznavamo mešanje linij na nivoju genotipov, ter velik delež hibridne heterozigotnosti izbranih

ddRAD-značk, ki je izrazitejši v ribogojniških populacijah. Razdrobljenost jadranskih alelov onemogoča povrnitve čistega avtohtonega lipana jadranske filogenetske linije iz trenutno živečih populacij oziroma osebkov. Pri populaciji RH opazimo 3 daljše regije genoma, pri katerih ni prišlo do vnosa savskih alelov ter eno, pri kateri je introgresija 100%.



Slika 15: Introgresija v genomih ekstantnih osebkov iz reke Soče. Modro so označeni homozigotni aleli jadranskega lipana, zeleno savskega, peščeno pa heterozigoti. Zvezdice označujejo mesta upora introgresije pri populaciji RH.

5 RAZPRAVA

5.1 LIPAN KOT SAMOSTOJNA VRSTA

Jadranski lipan že od samega začetka raziskav (Cuvier in Valenciennes, 1848) velja za posebno entiteto evropskega prostora, pa naj si bo to kot vrsta (Bianco, 2014) ali kot filogenetska linija. Dokazov o edinstvenosti je precej, tako na podlagi morfologije (Bajić in sod., 2018) kot genetskih raziskav (Sušnik in sod., 2001; Meraner in Gandolfi, 2012), čeprav se izsledki prvih glede na različne avtorje razlikujejo (Kottelat in Freyhof, 2007; Bianco, 2014). Evolucijska edinstvenost tega taksona je bila večkrat potrjena s kontrolno regijo mtDNK (Sušnik in sod., 2001; Weiss in sod., 2002; Gum in sod., 2009; Marić in sod., 2012; Meraner in Gandolfi, 2012). Kot potrjujemo tudi mi (Slika 4), haplotipi, ki jih najdemo izključno v jadranskem povodju, formirajo monofiletsko skupino, ločeno od drugih kladov na evropskem prostoru. Vendar pa so bile vse filogenetske analize jadranske linije narejene v le v odnosu do preostalih populacij v Evropi, medtem ko analize na nivoju rodu ali družine, iz katere bi lahko sklepali o odnosu *T. thymallus* – *T. aeliani* napram drugimi pripadnikom družine, še ni bilo (Koskinen in sod., 2002). Vendar lahko kontrolna regija mtDNK kot najbolj variabilna na mitogenomu (Brown in sod., 1982), zaradi povratnih mutacij pri cepitvah, ki segajo globoko v Miocen (Crête-Lafrenière in sod., 2012), zamegli evolucijsko zgodovino proučevanih taksonov. V nasprotju pa analiza in primerjava celotnih mitogenomov omogoča lažje sledenje evolucijski dinamiki kogeneričnih vrst (Gissi in sod., 2008) in s tem hkratnemu razreševanju evolucijskih odnosov tako bližje sorodih kot bolj oddaljenih taksonov (Miya in Nishida, 2014). Mitohondrijska DNK je idealna zaradi primerljive molekularne ure med entitetami in preprostega mehanizma dedovanja ter s tem olajšane rekonstrukcije koalescence. Prav uporaba celotnega mitogenoma pa omogoči primerjave na različnih evolucijskih časovnih komponentah, se pravi dobro loči tako globlje kot plitve cepitve in se je že izkazala kot zanesljiv marker ločevanja na nivoju družine Salmonidae (Yasuike in sod., 2010; Miya in Nishida, 2014). S filogenetsko analizo mitohondrijskega genoma smo želeli odnos mitogenoma jadranskega lipana in evropskega lipana umestiti v kontekst rodu ter evolucijski odnos *T. aeliani* – *T. thymallus* relativizirati s primerjavo odnosov priznanih vrst v rodovih družine Salmonidae.

Filogenetska razrešenost odnosov naših analiz (Slika 3) na nivoju rodov je primerljiva z rezultati, pridobljenimi z najobsežnejšo analizo na podlagi matrike morfoloških znakov ter jedrnih in mitohondrijskih markerjev (Crête-Lafrenière in sod., 2012), kar potrjuje moč filogenetskega signala mitohondrijskega genoma in s tem dodaja težo temu markerskemu sistemu. Bazalna cepitev družine (Thymallinae, Coregoninae in Salmoninae), še vedno ni nedvoumno razrešen odnos. Kot omenjeno ta cepitev na podlagi mitogenoma sovпада z matričnimi analizami, vendar se razhaja s študijo na največjem številu jedrnih markerjev, ki prepozna Coregoninae kot bazalno skupino v družini Salmonidov.

Sami rezultati v odnosu jadranskega in evropskega lipana ne prinašajo nič pretresljivega, saj pričakovano, kot je bilo dokazano že na haplotipih CR mtDNK, jadranski lipan tvori sestrsko skupino evolucijsko najbolj sorodnim populacijam evropskega lipana. Zanimiva je tudi točnost

molekularne ure (Shedlock in sod., 1992), ki se uproablja pri salmonidih, in je bila določena zelo arbitrarno (Brown in sod., 1979), zato smo predvidevali, da je tudi čas cepitve med jadranskim in evropskim lipanom, izračunan na osnovi CR (med 3,45 – 7,84 m.l.n.) zelo približen (Sušnik in sod., 2001). Vendar pa se je izkazalo, da genetska distanca (5,68%) oziroma časovni interval cepitve (3,35 – 8,22 m.l.n.), ki smo ju ocenili z analizo celotnega mitogenoma, dejansko sovпада s prejšnjimi rezultati dobljenimi na CR, kar kaže na precejšno točnost kalibracije molekularne ure na osnovi kontrolne regije. Kar nas je predvsem zanimalo, so razdalje oziroma časi cepitev med opisanimi vrstami lipanov in ali sta klasifikacija in posledično poimenovanje jadranskega lipana dejansko usklajena s trenutno prakso identifikacij in poimenovanj drugih vrst lipanov in vrst drugih rodov v družini salmonidov. Razvidno je da se je mnogo taksonov v okviru rodov *Brachymystax*, *Hucho*, *Salvelinus* in *Coregonus*, ki se jih obravnava kot samostojne vrste, ločilo v praktično istem časovnem obdobju, kot sta se jadranski in evropski lipan, kar nakazuje, da bi lahko glede na dolgo samostojno evolucijsko zgodovino jadranskega lipana po analogiji tudi ta takson smatrali za samostojno vrsto.. Na tem mestu je pomembno omeniti, da je veliko vrst drugih salmonidov bilo določenih in priznanih na podlagi morfoloških razlik ter zasedanja različnih ekoloških niš (*Coregonus*), medtem ko so lipani morfološko dokaj siromašni predstavniki te družine. Tako se morfološki znaki med *T. thymallus* in *T. arcticus*, katerih divergenca sega 11 m.l.n., praktično prekrivajo na vseh točkah (Kottelat in Freyhof, 2007), kar bi raziskovalcem bil lahko namig, da klasifikacija na podlagi morfologije za lipane ne more biti odločujoče merilo. Na znatno divergenco jadranskega lipana pokaže tudi filogenetska primerjava med taksoni znotraj rodu *Thymallus*. Cepitve med osmimi uradno priznanimi vrstami lipanov so namreč nekaj milijonov let mlajše kot cepitev med *T. aeliani* in *T. thymallus*. Zanimivo je, da sta bila taksona *T. burjenensis* (Antonov, 2004) in *T. tugarinae* (Knizhin in sod., 2007) iz »azijske skupine« s časom cepitve od skupnega prednika 0,55 – 2 m.l.n. priznani kot samostojni vrsti, medtem ko zadnji pregled evropske ihtiofaune (Kottelat in Freyhof, 2007) jadranskega lipana ni klasificiral kot samostojno vrsto, ampak ga je umestil znotraj evropskega lipana. To bi lahko nakazovalo na drugačno obravnavanje evropske ihtiofaune napram azijski, a prav nasprotno dokazuje klasifikacija vrste, s katero si jadranski lipan deli areal, in sicer marmorirane postrvi (*S. marmoratus*), ki se po zunanem videzu –ne pa tudi po ostalih morfoloških znakih- očitno loči od sestrške potočne postrvi (*S. trutta*) (Sušnik in sod., 2015). Prav različen zunaji videz je očitno pripomogel k temu, da je bila marmorirana postrv brez dilem že davno priznana kot samostojna vrsta, kljub temu, da je genetska distanca marmorirane in potočne postrvi ca. dvakrat manjša kot med jadranskim in evropskim lipanom. Najnovejši izmed pristopov delimitacije vrst, ki se v praksi pogosto uporablja, je »DNA barcoding« (Hebert in sod., 2004), kjer se vrste določajo na podlagi genetskih distanc mitohondrijskega gena za citokromoksidazo I (COI) (Collins in sod., 2012; Rannala, 2015). Za priznavanje sladkovodnih vrst rib se v praksi uporablja mejna vrednost 2% (Geiger in sod., 2014); genetska distanca na osnovi COI, ki smo je izračunali med *T. aeliani* in *T. thymallus*, pa je bila 3,2%. Kljub prepričljivim genetskim distancam in času cepitve ter preostalim posrednim izpolnjenim pogojem za prepoznavanje jadranskega lipana kot samostojne vrste *T. aeliani*, pa delineacija vrst samo na mitohondrijski DNK, ni vedno zanesljiva. MtDNK predstavlja en sam lokus, ki je od jedrne DNK dokaj neodvisen in zato ne odraža nujno tudi filogenije organizma oz. vrste (Jones, 2016). Preko mtDNK ni mogoče zaznavati hibridizacije, izginotja avtohotnih linij, nepopolnega razvrščanja

linij (angl. incomplete lineage sorting) ter zajemov mitogenomov (angl. mtDNA capture) v vrste, ki so potencialno recentni kolonizatorji (Wilson in Bernatchez, 1998). Vendar se, kot je razvidno iz naših populacijskih analiz, jadranske populacije nedvoumno grupirajo v lastno skupino tudi na jedrnih SNP markerjih visoke gostote. Tejj skupini pripadajo tudi muzejski primerki iz jezera Maggiore, ki je tipska lokaliteta za takson *T. aeliani*. Obenem so tipprimerki, ki so bili ob vzorčenju leta 1888 prepoznani kot *T. aeliani*, tudi najbližji približek tipskim primerkom te vrste; originalni tipski primerki iz leta 1848, ki so bili shranjeni v Naravoslovnem muzeju v Parizu (Muséum National d'Histoire Naturelle), namreč več ne obstajajo (osebna komunikacija s kuratorjem zbirke).

Na podlagi tega, da jadranski in evropski lipan naravno poseljujeta geografsko ločene areale, da med njima obstajajo določene morfološke distinkcije ter ju tudi po jedrnih in mitohondrijskih genetskih markerjih (CR, COI, mitogenom in jedrni SNP markerji) jasno ločimo in da sta glede na medsebojno genetsko distanco primerljiva z drugimi pari taksonov v družini salmonidov kot tudi v poddružini Thymallinae, ki se jih obravnava kot samostojne vrste, zagovarjamo stališče, da se kot samostojno vrsto prepozna tudi jadranskega lipana in se ga poimenuje z lastnim znanstvenim imenom *T. aeliani*, ki ga je za jadranskega lipana prvi predlagal Valenciennes l. 1848.

Poleg zadostitve osnovnim načelom biološke klasifikacije in nomenklature je določitev vrste za takson zaradi specifičnih zakonodajnih smernic v EU bistvenega pomena tudi v smislu njegovega varovanja. Nižje takonomske kategorije od vrste (e.g., evolucijsko signifikantna enota /ESU/, enota upravljanja /MU/ etc) za razliko od zakonsko predpisanega varovanja, ki ga imajo le-te v Ameriki, takega varstvenega statusa v Evropi nimajo, ker se na ravni evropske zakonodaje prvenstveno varuje le vrste. Varovanje vrst v EU določa Bernska konvencija in njej sledeče implementacije, kot sta Direktiva za varovanje ptic in Habitatna direktiva. Habitatna direktiva ima več aneksov, s katerimi se ščitijo habitati in vrste. Tako aneks II varuje okoli 900 vrst in njihove habitate, katere uvrščamo v omrežje Nature 2000. Ta območja se morajo varovati glede na ekološke potrebe zaščitene vrst. Od salmonidov v aneksu II najdemo atlantskega lososa (*Salmo salar*), mediteransko postrv (*Salmo macrostigma*), marmorirano postrv (*Salmo marmoratus*) in sulca (*Hucho hucho*), obenem pa se v tem aneksu nahaja tudi navadni kapelj (*Cottus gobio*), ki si velikokrat deli habitat z jadranskim lipanom. Evropskega lipana (*T. thymallus*) najdemo v aneksu V, v katerem je 90 vrst; ta aneks preprečuje eksploatacijo divjih populacij s ciljem ohranjanja le-teh v ugodnem številu. Vendar pa implementacija kljub dobri zasnovi Nature 2000 v praksi ni vedno izvajanja predvsem zaradi križanja z evropsko kmetijsko politiko (Crofts, 2014). V Sloveniji evropskega lipana po pravilniku o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam (Uradni list RS, št. 82/02 in 42/10) najdemo v prilogi 7, kjer je naveden kot ranljiva vrsta (Povž, 1992; Povž, 1996). Jadranskega lipana se uradno še vedno smatra kot linijo, ki spada v vrsto *T. thymallus*, in se jo zato obravnava na enak način kot ostale populacije lipana v Evropi. Problem nastane zaradi večje ogroženosti populacij jadranskega lipana od tistih iz ostalih evropskih rek, obenem pa je eden izmed ogrožajočih faktorjev te entitete ravno hibridizacija z evropskim lipanom, ki se ga je desetletja vnašalo v jadranske reke in se ga formalno pravno zaradi nepriznavanja jadranskega lipana kot samostojne vrste lahko goji v jadranskem rečnem sistemu še danes. Zakonodajne smernice, tako v Sloveniji kot v Italiji sicer preprečujejo prenos rib med

povodji, vendar se zaradi zakonske ohlapnosti, še posebno v italijanskih provincih praksa vnašanja donavskega lipana v jadranski sistem še vedno nadaljuje (Splendiani in sod., 2019). Z uradnim priznanjem vrstnega statusa jadranskega lipana bi tovrstne prakse postale nelegalne in varovanje in upravljanje jadranskega lipana v smeri njegove zaščite in/ali revitalizacijev bi postalo veliko bolj učinkovito.

5.2 SREDNJEVEŠKI PRENOSI IN PROBLEMI MUZEJSKIH ZBIRK

Zajem mitogenoma pri ribah ni redek pojav; pogost je predvsem pri morskih vrstah, ki imajo drugačno evlucijsko dinamiko kot sladkovodne vrste, opažen pa je bil tudi pri salmonidih (Wilson in Bernatchez, 1998). Da bi se o možnosti tega dogodka prepričali pri evropske lipanu in i jadranskem lipanu, bi bilo potrebno opraviti genetske analize širokega nabora filogenetskih linij v Evropi živečih lipanov na nivoju nuklearnih označevalcev, ki bi, kot je to opisano v novejših filogenetskih člankih, lahko zaznali popolno zgodovino evropskega lipana *sensu lato*. Na podlagi dosedanjih genetskih označevalcev, katerih število je sicer zadostno, za detajlno filogenetsko analizo evropskega lipana manjkajo predstavniki še drugih oddaljenih evropskih populacij in pa dodaten nabor nuklearnih označevalcev, s katerimi bi lahko zadovoljivo ocenili evlucijski kontekst jadranskega lipana *sensu lato*. Vendar pa v našem naboru podatkov, ki temelji na več tisoč nuklearnih SNP lokusih, in do katerih smo prišli na osnovi čistih genomov jadranskega lipana, kot je populacija iz italijanske Sesije in muzejski primerki iz Soče, pleistocenske introgresije v jadranskih lipanih ni zaznati, nasprotno, jadranske populacije tvorijo močno dinstinktno skupino, kar smo pokazali z različnimi analizami. Zanimiva izjema je populacija iz italijanske reke Adiže, pri kateri smo opazili historično introgresijo z dravsko filogenetsko linijo. To so zaznali že s predhodno analizo na mikrosatelitnih lokusih, ter jo umestili v obdobje srednjega veka ca. 116 (lipanskih) generacij nazaj (Meraner in sod., 2014). Glede na zgodovinske vire, da naj bi cesar Maximilian I. Habsburški (1486–1519) podpiral poribljanje devastiranih rek in ob tem tudi transalpske prenose rib iz Avstrije v vode severne Itaije (Meraner in sod., 2014), domnevajo, da je morda pojav dravskih genov v Adiži posledica njegovega ravnanja. Znano jesicer, da je tehnologija prenosa živih lipanov zelo zahtevna zaradi njihove občutljivosti na pomanjkanje kisika in potrebe po dodatnem dovajanju le-tega. Prvi zabeleženi uspešni prenosi salmonidov so bili izvedeni v 19. stoletju, vendar le pri šarenkah (*Oncorhynchus mykiss*; iz zahoda na vzhod ZDA ter proti koncu 19. stoletja tudi v Evropo; Halverson, 2010) in potočnih postrvih (*Salmo trutta*; iz Evrope v Ameriko). Za lipana nismo uspeli najti pisnih podatkov o njegovih starejših prenosih. Tehnologija vzreje postrvi v ribogojnicah je napram vzreji lipana neprimerno lažja, tako so se ribogojniške plemenske jate lipanov začele pojavljati komaj proti koncu 20. stoletja. Prve zapise o prenosih iker lipana, ki so jih dobili neposredno na dristiščih, najdemo šele v zapisih po drugi svetovni vojni. To bi se načelno lahko zgodilo tudi začasa srednjega veka, vendar zaradi zahtevnosti postopka to ni zelo verjetno. Dopuščamo sicer možnost antropogenega vnosa dravskega lipana v Adižo v srednjem veku, vendar zaradi v to zaradi zgoraj povedanega močno dvomimo. Verjetneje se nam zdi, da je introgresija pri jadranskih lipanih v Adiži posledica ledeniških rečnih zajemov (angl. *river capture*) zadnje pleistocenske glaciacije, ki so omogočili začasno migracijo dravskih lipanov v Adižo; zgornji

tokovi Adiže so namreč v dolini Dobacchio razmejeni z zgornjimi dravskimi pritoki le z višinsko razliko 30 metrov.

Proti pričakovanju smo našli pri analizi muzejskih vzorcev visok odstotek alohtonih (dravskih) haplotipov v porečju Soče ter v porečju zgornje Save. Primerjava s sestavo sedanjih populacij na istih območjih nakazuje, da so vsi alohtoni haplotipi, ki smo jih našli v muzejskih primerkih, tako v Savi kot v Soči izginili. Lahko domnevamo, da je to posledica antropogenih prenosov lipanov, saj je malo verjetno, da bi dravski haplotipi prišli v zgornjo Savo po naravni poti; medtem ko pri muzejskih zaznavamo prenose iz dravskega porečja, pri recentnih zaznavamo prenose iz savskega povodja v reko Sočo, kjer več kot polovica haplotipov dandanes živečih lipanov pripada balkanski filogenetski liniji.

Za razlago take strukture se ob upoštevanju mtDNA ponujata dva scenarija. Prvi zagovarja že zgoraj omenjene antropogene prenose, ki so se pri pojavljali že z začetkom industrijske revolucije, kar je za lipana novo, saj so se ti zgodnji prenosi do sedaj nanašali le na postrvi. Ker so odrasli lipani in mladice občutljivi za transport, bi bile verjetno edina možnost prenosa oplojene ikre, ki jih je ob predpostavki preproste tehnologije možno prenašati npr. v sodih z vlažnim mahom. Ta scenarij je podprt tudi z dejstvom, da alohtoni haplotipi muzejskih vzorcev izvirajo iz dravske regije, ki je bila center moči Avstro-ogrskega cesarstva, medtem ko alohtoni haplotipi današnjih populacij izvirajo iz savskega porečja, ki je (bil) pod upravo Jugoslavije in današnje Slovenije. Možno je, da so bili ti prenosi izvedeni kot doplonilna vlaganja, saj so se v 18. stoletju izvajala upravljanja ribjih populacij. Vendar proti temu scenariju govori težavnost prenosa iker v dolino Soče, ki je bila do izgradnje ceste čez Vršič I. 1915 zelo izolirana in težko dostopna. Drugi scenarij oz. razlaga take strukture bi bila, podobno kot v primeru Adiže, naravna kolonizacija kot posledica zajetja reke z ledeniškimi jezeri začasa pleistocenskih poledenitev. Taki primeri so bili dokazani pri drugih vrstah rib, npr. pri kaplju (*C. gobio*), pri katerem v zgornjih pritokih Drave najdemo samo jadranske haplotipe.

Oba scenarija pa nekoliko spodbija dejstvo, da navkljub tako visokemu deležu dravskih haplotipov, na katere sklepamo preko muzejskih vzorcev, danes niti v Savi niti v Soči ne zaznamo več nobenega dravskega haplotipa. Na tem izhodišču ponujamo tretji scenarij, ki pa se razkrije šele ob podrobni analizi jedrnih markerjev; genotipizacija na podlagi ddRAD sekvenciranja, nuklearnih SNP markerjev in populacijskih analiz je pokazala, da prav noben izmed muzejskih dravskih vzorcev ni introgresiran z aleli soških ali savskih lipanov niti niso soški ali savski muzejski vzorci introgresirani z muzejskimi dravskimi. Prav tako z omenjeno analizo nismo zasledili pri sedanjih vzorcih soških ali savskih lipanov niti najmanjše sledi introgresije z dravskimi aleli. Pri naravnih populacijah taka strukturiranost populacije ni možna, zato lahko scenarij naravne kolonizacije izključimo. Ostaja torej možnost scenarija poribljanja, prav tako pa se ponuja zgoraj omenjen tretji scenarij, ki upošteva možnost napake pri katalogiziranju muzejskih vzorcev v sami zbirki ali napake pri označitvi mesta vzorčenja, saj vsi »problematični« vzorci prihajajo iz leta 1888. Najbrž je z materialom, ki je na voljo, nemogoče dokazati, kateri od obeh scenarijev je previlen, dejstvo pa je, da odsotnost introgresije pri vseh muzejskih vzorcih (11) kot tudi odsotnost genetskih sledi muzejskih vzorcev v današnjih vzorcih iz Soče in Save nakazuje, da v populacijah lipana v 19.

stoletju ni prihajalo do mešanja osebkov med različnimi linijami, kar še dodatno izpostavlja pomembnost ohranjanja jadranskega lipana v soškem porečju, saj je hibridizacija tu izključno posledica nedavne človeške dejavnosti.

5.3 STANJE IN MOŽNOSTI REŠEVANJA JADRANSKEGA LIPANA V SOČI

Jadranski lipan v Soči je močno ogrožen, saj smo tekom raziskave ugotovili, da je populacija tam v močnem upadu. Posledično smo v naravi le s težavo našli dovolj osebkov za genomske študije. Trend upadanja populacije že od leta 2009 opazamo tudi pri vsakoletnih genotipizacijah, kjer se je skozi leta močno znižala številčnost lipanov na sami drsti. To je pravzaprav edini statistični dokaz za upad lipana v Soči, saj se je vzorčilo vsakoletno na enak način na isti lokaciji.

Z genomsko analizo smo potrdili dognanja izpred dveh desetletij (Sušnik in sod., 2001), namreč da so v soški populaciji lipana močno prisotni tujerodni aleli, ki izvirajo iz savskih lipanskih populacij in so posledica intenzivnega dokumentiranega več desetletnega prenašanja (vlaganja) savskih lipanov v Sočo (Marko Bertok in Budihna, 1999). Močan vpliv vlaganja in upravljanja z lipanom smo opazili ne samo v Soči ampak tudi v savskem porečju v Sloveniji in sicer s populacijsko genomskimi analizami, kjer genetske diferenciacije (nizke parne F_{ST} vrednosti) med divjimi populacijami in ribogojniškimi jatami, ki se uporabljajo za podporno vlaganje dotičnih divjih populacij, praktično nismo zasledili. Tudi z multivariantnimi analizami med savskimi populacijami nismo zaznali genetske diferenciacije, torej so si vsi osebki genetsko gledano zelo podobni. To nakazuje, da v vzorčenih populacijah odprtih vod v Sloveniji prevladujejo potomci ribogojniških osebkov oz. je v vseh populacijah zaznati močan vpliv podpornega vlaganja in torej težko govorimo še o pravih divjih populacijah. Glede na Structure analizo soške populacije jadranskega lipana odražajo višji genetski delež značilen za savske populacije, od deleža, značilnega za referenčni vzorec soških lipanov iz muzejske zbirke. To nakazuje tudi filogenetsko drevo, kjer se visoko hibridirane jadranske populacije kladirajo skupaj s savskimi. Razlog temu je seveda intenzivno poribljanje soškega porečja s savskimi lipani in njegovo genetsko mešanje z avtohtonimi jadranskimi lipani.

5.3.1 Nov genotipizacijski test temelječ na SNP markerjih visoke genomske gostote

Nov genotipizacijski test, temelječ na SNP markerjih visoke genomske gostote, pridobljen preko ddRAD-sekvenciranja, je razkril nekatere pomanjkljivosti preteklega testa, ki je baziral na enajstih mikrosatelitnih lokusih. Za razliko od mikrosatelitnih analiz nov genotipizacijski test izhaja iz sodobne NGS tehnologije, ki omogoča pregled genoma v enormnih razsežnostih in s tem predstavlja najvišjo stopnjo genotipizacijskih testov, podrejeno le primerjavi celotnih genomov. Tako trenutno razpolagamo z 42.000 SNP markerji, ki razlikujejo med jadranskim in evropskim lipanom, 24.000 SNP markerji za razlikovanje med soškim in savskim lipanom ter 8.158 markerji, s katerimi ja možno določati poreklo določenim populacijam znotraj jadranskega lipana.

5.3.2 Uporabnost novega genotipizacijskega sistema

Genotipizacijski test, temelječ na 11 mikrosatelitnih lokusih, ki smo ga izdelali l. 2001 z namenom prepoznavati stopnjo introgresije jadranskih lipanov iz Soče z geni savskih lipanov in s tem odbiro najprimernejših osebkov za revitalizacijo jadranskega lipana, je bil problematičen že na samem začetku, ker lokusi, ki naj bi bili sposobni specifično prepoznavati jadranskega lipana, niso bili odbrani na osnovi genetsko čistih referenčnih osebkov, ker le-teh že takrat v Soči ni bilo več, muzejskih vzorcev pa zaradi takratne tehnologije, ki je bila na voljo, ni bilo mogoče uporabiti v ta namen. Te objektivne omejitve kot tudi relativno majhno število mikrosatelitnih lokusov (11) in njihova nepoznana lokacija na genomu so privedli do delno nepopolnih spoznanj (Palti in sod., 2015; Lemopoulos in sod., 2019). Rezultati analiz novega genotipizacijskega testa (42 tisoč markerjev – prbl. 800 markerjev na kromosom), nekatere ugotovitve, pridobljene s prejšnjim genotipizacijskim testom, potrjujejo, medtem ko so se nekatere izkazale za ne povsem točne. Tako mikrosatelitni test omogoča dobro oceno raznih populacijskih parametrov, kot so genetska pestrost, stopnja inbreedinga, efektivna velikost populacije itd. ter odkrivanje hibridizacij in njihovega porekla. Mikrosatelitni markerji so se izkazali kot primerni tudi za prepoznavanje in razločevanje filogenetskih skupin, vendar pa je bila identifikacija genetskih deležev pri hibridnih osebkih in populacijah premalo občutljiva; tako npr. pri jadranskih lipanih iz Adiže ni bilo moč zaznati siceršnje skoraj 18-odstotne introgresije z dravskimi lipani, medtem ko je bila ocena jadranskega genetskega deleža napram savskemu za jadranske lipane iz Soče malenkostno precenjena. Z novim genotipizacijskim sistemom smo sicer odkrili 24.000 markerjev, ki natančno razlikujejo med jadranskim lipanom iz Soče in savskim lipanom ter podajajo zelo zanesljivo oceno prisotnosti obeh genetskih deležev za posamezen osebek ter bi bili kot taki zelo primerni za izbiro najprimernejših osebkov za razplod. Vendar stopnja in porazdeljenost introgresije (v genomu) jadranskega lipana v Soči, kar smo ugotovili tudi s pomočjo SNP markerjev, nakazuje, da je iskanje genetsko ustreznih osebkov za namen revitalizacije jadranskega lipana v Soči neprimeren ukrep. Genomski podatki treh referenčnih muzejskih osebkov čistega soškega lipana so s pomočjo novega testa namreč razkrili popolno pretopitev genoma soškega lipana z genomom savskega lipana; na prvi pogled se zdi, da proti hibridom ni nobene selekcije, vendar je vpliv naravne selekcije v tako močno upravljanih sistemih onemogočen, zato je o tem težko presojati. Edine obsežnejše avtohtone genomske komplekse smo zaznali pri vzorcih iz ribogojnice Tolmin, ki segajo v leto 2009; opazili smo tri bloke, ki so se »upirali« vsesplošni introgresiji, vendar so se v sledečih generacijah tudi ti zabrisali. Ne samo da je introgresija skoraj 80% in med osebki enakomerno porazdeljena, ampak v genomih trenutno živečih lipanov v Soči torej ni niti več večjih avtohtonih genomskih blokov, s katerimi bi se lahko preko pravilne selekcije plemenskih živali ter nadaljnje večgeneracijske selekcije približali genomu čistega lipana. Z drugimi besedami, jadranski lipani v Soči predstavljajo hibridni roj (angl. hybrid swarm), znotraj katerega imajo vsi osebki celoten genom enakomerno premešan s savskimi geni, pri čemer je izpodrinjeno približno tričetrt avtohtonega genoma, zato med njimi ni možno najti osebkov z nadpovprečnim avtohtonim genetskim deležem niti ni možno najti obsežnih kontinuiranih avtohtonih genetskih sekvenc, zato na osnovi današnjih osebkov lipana v Soči ni mogoče povrniti v originalno stanje, kakor je bilo sprva predvideno. To lahko potrdimo tudi preko analize rezultatov preteklega programa selekcije

ter odbire plemenskih živali s predhodnim genotipizacijskim testom. Monitoring selekcije je jasno kazal porast avtohtonega genetskega deleža skozi leta, vendar pa se je z novim genotipizacijskim sistemom pokazalo, da je do zviševanja avtohtonega genetskega deleža prihajalo samo na odbranih markerjih, medtem ko je stanje celotnega genoma ostalo zaradi popolne genetske pretopljenosti (angl. complete genetic admixture) praktično nespremenjeno. Torej je bila ocena stopnje introgresije tudi »najčistejših osebkov«, ki so kazali npr. 80-odstotno čistost, preveč optimistična, ker ta vrednost zaradi popolne pretopljenosti genomov ni odražala stanja na celotnem genomu.

Rezultati raziskave torej kažejo, da je revitalizacija jadranskega lipana v Soči v smislu povišanja avtohtonega genetskega deleža populacije na osnovi lastnega materiala praktično nemogoča. Hibridne populacije, še posebno tiste s popolnoma pretopljenimi genomi brez ostanka primarnih parentalnih osebkov, so načeloma v varstveni genetiki nezaželeni in se jih ne ohranja (Allendorf s sod., 2001). Situacija pa je posebna, če taka populacija predstavlja poslednji preostanek avtohtonega genoma neke vrste. V takem primeru je potreben razmislek, ali naj se hibridi vendarle zaščitijo, saj je to edini način, če se želimo izogniti izumrtju celotnega genoma avtohtone hibridizirane vrste. Vendar pa se v primeru jadranskega lipana glede na še obstoječo čisto populacijo, ki se nahaja v Sesiji v italijanskem Piemontu, ponuja alternativna opcija, ki temelji na morebitnem prenosu tega materiala v Sočo, kar bi pomagalo dvigniti raven avtohtonega genetskega deleža jadranskega lipana kot tudi genetsko pestrost in številčnost soške populacije. Ta možnost je privlačna tudi zaradi trenutnega klavnega stanja lipanov v Soči, kateri tudi v primeru, da bi se odločili za reševanje jadranskega lipana na osnovi lastnih možnosti, morda ne zagotavljajo zadosti številnega in dovolj vitalnega materiala, ki bi bil nujen za uspešno repopulacijo.

5.3.3 Potencialni prenos jadranskih lipanov iz Sesije v Sočo

S pomočjo genomske analize smo neitrogresirane (čiste) genome jadranskega lipana našli v muzejskih primerkih iz jezera Maggiore in v treh muzejskih vzorcih (HS-vzorec), ki izvirajo iz Soče in so datirani z. l. 1861 in 1899; le-ti so edini obstoječi genomi jadranskega lipana iz Soče. Pri divjih populacijah smo čiste jadranske genome našli tudi v Sesiji.

Genomska sorodnost lipanov iz Sesije in HS-vzorca potrjuje, da je v Soči pred antropogenimi prenosi bival *T. aeliani*, in nakazuje, da bi za njegovo revitalizacijo v Soči osebkovi iz Sesije lahko predstavljali donorske kolonizatorje. Vse opravljene analize namreč grupirajo vzorec sesijskih lipanov in HS-vzorec skupaj v eno homogeno enoto; bistvenih razlik med genomoma obeh vzorcev torej nismo zaznali. Zaznali smo le 3.775 alelnih variant, ki so bile v avtohtoni čisti populaciji, ki je nekoč naseljevala Sočo, pristne, medtem ko jih v Sesiji ni moč zaznati. To predstavlja glede na celokupno število polimorfnihih ddRAD-značk (42.000) majhen delež ($\approx 9\%$). Tudi glede na adaptivne gene (rezultati niso prikazani), ki so značilni za posamezne populacije oz. vrste lipana, je analiza pokazala, da na teh med sesijskim in HS-vzorcem ni razlik. Vseeno pa parna F_{ST} vrednost, izračunana med tema populacijama na osnovi 8.185 ddRAD-značka, kolikor je variabilnih lokusov, pri katerih se frekvenca alelov med populacijama razlikuje, precej visoka. To pomeni, da bi menjava okolja lahko imela določen vpliv na uspešnost kolonizacije. Zato bi bilo preneseni

populaciji potrebno dati čas in prostor, da nanjo vpliva naravna selekcija in izbere tiste genotipe, ki so najprimernejši za življenje v Soči, kar bi v nekaj generacijah omogočilo prilagoditev in utrditev prenesene populacije. Tako selekcionirana populacija, bi lahko služila kot vir za nadaljnje kolonizacije soškega porečja.

Mnenja smo, da je v dani situaciji za revitalizacijo jadranskega lipana v Soči najboljša izbira prenos osebkov iz Sesije v lipanski habitat v soškem porečju, ki je po možnosti trenutno nenaseljen z lipanom ali iz katerega bi izlovili do sedaj živeče lipane, kar bi preprečilo introgresivno hibridizacijo naseljenih osebkov s križanci in s tem »razbijanje« koadaptivnih delov genoma. Zaradi relativno visoke stopnje F_{ST} na polimorfni lokusih med sesijskim in HS-vzorcem bi morali preneseno populacijo zaščititi pred ribolovom in upravljanjem, da se prilagodi na lokalne razmere. Ker se lipani, ki so prilagojeni na lokalne razmere, večinoma vračajo na ista drstišča (Pavlov in sod., 1998; Ovidio in sod., 2004) ter so zelo občutljivi za fizične lastnosti habitata, kot so vsebnost kisika, nihanja T, sestava substrata in ter hitrost vodnega toka (Northcote, 1995), je še toliko bolj pomembno, da se prenešenih osebkov in nekaj sledečih generacij njihovih potomcev ne vznemirja niti s športnim ribolovom niti s kakršnimi koli posegi za namene upravljanja. Izvzeto je vzorčenje za občasno spremljanje populacijsko genetske dinamike vnesene populacije z novim genotipizacijskim testom, s katerim bi lahko sledili spremembam alelnih frekvenc in s tem približevanju originalnemu genotipu Jadranskega lipana.

Potencialno lokacijo za take prenose predstavlja reka Tolminka, ki gorvodno od jezua pri ribogojnici v Mostu na Soči predstavlja primeren habitat za lipana. Vendar ta del že več let z lipanom ni naseljen, ker so celotno populacijo iz Tolminke uničili zemeljski plazovi koncem prejšnjega stoletja, od česar pa si je struga Tolminke do danes že precej opomogla in se obnovila. Gorvodno migracijo lipanov v ta del preprečuje omenjeni jezik. Za učinkovitejšo realizacijo tega varstvenega ukrepa bi bilo priporočljivo poleg omenjene lokacije poiskati ali vzpostaviti še kakšno. V vsakem primeru bi bilo modeliranje fizikalnih parametrov donorskega in recipientskega habitata ter izbira najprimernejše lokacije pred izvedbo samega prenosa zelo smiselno.

5.4 VZPOSTAVITEV KVALITETNE PLEMENSKE JATE

Funkcionalne plemenske jate jadranskega lipana zaradi različnih težav trenutno ne obstajajo, zato tudi ni bilo možno izvajati genetskih izboljšav le-teh, kot smo načrtovali ob prijavi projekta pred tremi leti. Neglede na trenutno stanje novi genotipizacijski test na osnovi SNP markerjev omogoča učinkovito odbiro plemenskih osebkov - tako za namen varstvene ali komercialne vzreje - z nadpovprečno visoko stopnjo heterozigotnosti in to na izjemno velikem številu lokusov vključno z adaptivnimi, kar je zanesljiv pristop za povečanje fitness plemenskih osebkov in njihovega potomstva. Test je torej na voljo in ga bo možno implementirati v prakso, takoj ko se bo za to pojavila potreba.

6 ZAHVALA

Zavodu za ribištvo Slovenije in vsem ribiškim družinam, ki so sodelovale pri zbiranju vzorcev, se lepo zahvaljujemo za učinkovito pomoč in dobro voljo na terenu in po nejm. Hvala Anji Palandačič za vse v zvezi z muzejskimi vzorci, Andrei Gandolfiju in Stefanijski Trasferino za vzorce iz Italije in Stevu Weissu za vzorce iz Drave in ker se tako srčno bori proti gradnji jezov. Posebna zahvala gre Dušanu Jesenšku, ki nam je s svojim bogatim znanjem s področja vzreje lipanov pomagal pri delu na projektu.

7 VIRI

- Abbott, R.J., Barton, N.H., Good, J.M., 2016. Genomics of hybridization in its evolutionary consequences. *Molecular Ecology* 25, 2325–2332.
- Adams, J.R., Vucetich, L.M., Hedrick, P.W., Peterson, R.O., Vucetich, J.A., 2011. Genomic sweep in potential genetic rescue during limiting environmental conditions in an isolated wolf population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278, 3336–3344.
- Albertini, D., Tagliacozzo, A., 2004. Fresh water fishing in Italy during the Late Glacial period : the example of Riparo Dalmeri (Trento). *Petits Animaux et Sociétés Humaines : Du Complément Alimentaire Aux Ressources Utilitaires*. Antibes, 131–136.
- Alessio, G., Gandolfi, G., 1983. Censimento e distribuzione attuale delle specie ittiche nel bacino del fiume Po. *Consiglio nazionale delle ricerche*.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK, 2001. The problem with hybrids: Setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 613–622.
- Allendorf, F., Waples, R., 1996. Conservation in genetics of salmonid fishes., 2nd ed, In *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman in Hall, New York.
- Allendorf, F.W. et al. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nat. Rev. Genet.* 11, 697–709.
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., 1988. Conservation in distribution of genetic variation in a polytypic species, the cutthroat trout. *Conservation Biology* 2, 170–184.
- Alexander, D.H., Novembre, J., Lange, K., 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19:1655–1664, 2009.
- Almódovar, A., Suarez, J., Nicola, G.G., Nuevo, M., 2001. Genetic introgression between wild and stocked brown trout in the Douro River basin, Spain. *Journal of Fish Biology* 59, 68–74.
- Anderson, E.C., Thompson, E.A., 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160, 1217–1229.
- Andrews, K.R., Good, J.M., Miller, M.R., Luikart, G., Hohenlohe, P.A., 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews. Genetics* 17, 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28>
- Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [WWW Document]. URL <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 12.1.17).
- Angeloni, F., N. Wagemaker, P. Vergeer, J. Ouborg. 2012. Genomic toolboxes for conservation biologists. *Evolutionary Applications* 5:130–143.
- Antonov, A.L., 2004. A new species of grayling *Thymallus burejensis* sp. nov. (Thymallidae) from the Amur Basin. *Journal of Ichthyology* 44, 401–411.
- Araki, H., Ardren, W.R., Olsen, E., Cooper, B., Blouin, M.S., 2007a. Reproductive success of captive-

- bred steelhead trout in the wild: evaluation of three hatchery programs in the Hood River. *Conservation Biology* 21, 181–190.
- Araki, H., Berejikian, B.A., Ford, M.J., Blouin, M.S., 2008. Fitness of hatchery-reared salmonids in the wild. *Evolutionary Applications* 1, 342–355.
- Araki, H., Cooper, B., Blouin, M.S., 2007b. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318, 100–103.
<https://doi.org/10.1126/science.1145621>
- Arnold, M.L., 1997. *Natural hybridization in evolution*. Oxford University Press on Demand.
- Arnold, M.L., Hodges, S.A., 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology in Evolution* 10, 67–71.
- Awise, J. C. 2010. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. *Conservation Genetics*, 11:665–669.
- Ayala, F.J., Powell, J.R., 1972. Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69, 1094–1096.
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A., Johnson, E.A., 2008. Rapid SNP discovery in genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS One* 3, e3376.
- Bajić, A., Jojić, V., Snoj, A., Miljanović, B., Askeyev, O., Askeyev, I., Marić, S., 2018. Comparative body shape variation of the European grayling *Thymallus thymallus* (Actinopterygii, Salmonidae) from wild populations in hatcheries. *Zoologischer Anzeiger* 272, 73–80.
<https://doi.org/10.1016/J.JCZ.2017.12.005>
- Baldaccini, G.N., Ercolini, P., 2016. Gestione della fauna ittica alloctona: riflessioni sulla normativa di settore. *Biologia Ambientale* 30, 57–66.
- Ball, R.D., 2013. Designing a GWAS: power, sample size, in data structure. *Genome-Wide Association Studies in Genomic Prediction*. Springer, 37–98.
- Banarescu, P., 1973. Origin in affinities of the freshwater fish fauna of Europe. *Ichthyologia* 5, 1–8.
- Barton NH, Hewitt GM, 1989 Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 1989, 341 (6242):497-503
- Barton, N.H., 1979. Gene flow past a cline. *Heredity* 43, 333.
- Barton, N.H., 1980. The hybrid sink effect. *Heredity* 44, 277–278.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M., 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 16 16, 113–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.000553>
- Battistella, S., Modonut, M., Vicentini, C., 2014. Uso di marcatori molecolari per la caratterizzazione genetica del Temolo (*Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758) di ceppo adriatico, a fini riproduttivi e di ripopolamento, *Italian Journal of Freshwater Ichthyology*.
- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London – Series B: Biological Sciences*, 263, 1619–1626.
- Beaumont, M.A., Balding, D.J., 2004. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology* 13, 969–980.
- Benestan, L., Gosselin, T., Perrier, C., Sainte-Marie, B., Rochette, R., Bernatchez, L., 2015. RAD genotyping reveals fine-scale genetic structuring in provides powerful population assignment in a widely distributed marine species, the American lobster (*Homarus americanus*). *Molecular Ecology* 24, 3299–3315.
- Bernatchez, L., 2016. On the maintenance of genetic variation in adaptation to environmental change: considerations from population genomics in fishes. *Journal of Fish Biology* 89, 2519–2556. <https://doi.org/10.1111/jfb.13145>
- Bernatchez, L., Colombani, F., Dodson, J.J., 1991. Phylogenetic relationships among the subfamily

- Coregoninae as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis. *Journal of Fish Biology* 39, 283–290. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1991.tb05091.x>
- Bernatchez, L., Glémet, H., Wilson, C.C., Danzmann, R.G., 1995. Introgression in fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries in Aquatic Sciences* 52, 179–185.
- Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F., 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically in morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* 1, 161–173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00172.x>
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsche, G., Pütz, J., Middendorf, M., Stadler, P.F., 2013. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics in Evolution* 69, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>
- Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, Juanchich A, Bernard M et al., 2014. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications* 5: 3657.
- Bertok M, Budihna N (1999). Annual report of Fish Cadastral Register for year 1997. Fisheries Research Institut, Ljubljana, Slovenia.
- Bertok, Marko, Budihna, N., 1999. Vpliv vlaganja šarenke (*Oncorhynchus mykiss*) na avtohtono ihtiofavno v Sloveniji. Zavod za ribištvo Ljubljana.
- Bianco, P.G., 1990. Potential role of the palaeohistory of the Mediterranean in Paratethys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*. Munchen 1, 167–184.
- Bianco, P.G., 1995. Factors affecting the distribution of freshwater fishes especially in Italy. *Cybiun* 19, 241–259.
- Bianco, P.G., 2014. An update on the status of native in exotic freshwater fishes of Italy. *Journal of Applied Ichthyology* 30, 62–77. <https://doi.org/10.1111/jai.12291>
- Bijlsma, R., Westerhof, M.D.D., Roekx, L.P., Pen, I., 2010. Dynamics of genetic rescue in inbred *Drosophila melanogaster* populations. *Conservation Genetics* 11, 449–462.
- Boecklen, W.J., Howard, D.J., 1997. Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers in power of resolution. *Ecology* 78, 2611–2616.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Botsford, L. W., Brumbaugh, D. R., Grimes, C., Kellner, J. B., Largier, J., O'Farrell, M. R., ... Wespestad, V. (2009). Connectivity, sustainability, and yield: Bridging the gap between conventional fisheries management and marine protected areas. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(1), 69–95. <http://doi.org/10.1007/s11160-008-9092-z>
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A.J., 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology* 10, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Brown, W.M., George, M., Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 1967–1971.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., Wilson, A.C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo in mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution* 18, 225–239. <https://doi.org/10.1007/BF01734101>
- Burrell, A.S., Disotell, T.R., Bergey, C.M., 2015. The use of museum specimens with high-throughput DNA sequencers. *Journal of Human Evolution* 79, 35–44.
- Butlin, R.K., 2010. Population genomics in speciation. *Genetica* 138, 409–418.

- Cahill, J.A., Stirling, I., Kistler, L., Salamzade, R., Ersmark, E., Fulton, T.L., Stiller, M., Green, R.E., Shapiro, B., 2015. Genomic evidence of geographically widespread effect of gene flow from polar bears into brown bears. *Molecular Ecology* 24, 1205–1217.
- Campton, D.E., 1987. Natural hybridization in introgression in fishes: methods of detection in interpretation. *Population Genetics in Fishery Management*.
- Carlson, S.M., Cunningham, C.J., Westley, P.A.H., 2014. Evolutionary rescue in a changing world. *Trends in Ecology in Evolution* 29, 521–530.
- Catchen JM, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, Postlethwait JH (2011) Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1, 171–182
- Cavallo, O., Gaudant, J., 1987. Observations complémentaires sur l'Ichthyofaune des Marnes Messiniennes de Cherasco (Piémont): implications géodynamiques. *Bollettino Della Società Paleontologica Italiana* 26, 177–198.
- Cavender, T.M., 1991. The fossil record of the Cyprinidae. *Cyprinid Fishes*. Springer Netherlands, Dordrecht, 34–54. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3092-9_2
- Clarke, B., Johnson, M.S., Murray, J., 1998. How 'molecular leakage' can mislead us about island speciation. *Evolution on Islands* 181–195.
- Collins, R.A., Boykin, L.M., Cruickshank, R.H., Armstrong, K.F., 2012. Barcoding's next top model: an evaluation of nucleotide substitution models for specimen identification. *Methods in Ecology in Evolution* 3, 457–465. [https://doi.org/10.1111/J.2041-210X.2011.00176.X@10.1111/\(ISSN\)2041-210X.EVOL2013](https://doi.org/10.1111/J.2041-210X.2011.00176.X@10.1111/(ISSN)2041-210X.EVOL2013)
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.R.P., Mace, G.M., Wayne, R.K., 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology in Evolution* 15, 290–295. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01876-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01876-0)
- Crête-Lafrenière, A., Weir, L.K., Bernatchez, L., 2012. Framing the Salmonidae Family Phylogenetic Portrait: A More Complete Picture from Increased Taxon Sampling. In: Fontaneto, D. (Ed.), *PLoS ONE* 7, e46662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046662>
- Crofts, R., 2014. The European Natura 2000 protected area approach: a practitioner's perspective. *Parks* 20, 75–86.
- Crow, J.F., Kimura, M., 1970. An introduction to population genetics theory. *An Introduction to Population Genetics Theory*.
- Cuenco, M.L., Backman, T.W.H., Mundy, P.R., 1993. The use of supplementation to aid in natural stock restoration. *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*. Springer, 269–293.
- Cuvier & Valenciennes. 1848. *Histoire Naturelle des Poissons*, p. 447–448. (Reimpression 1969, A. Asher & Co, Amsterdam)
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics in parallel computing. *Nature Methods* 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Davey, J.W., Blaxter, M.L., 2010. RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics* 9, 416–423.
- Dawnay, N., Dawnay, L., Hughes, R.N., Cove, R., Taylor, M.I., 2011. Substantial genetic structure among stocked in native populations of the European grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in the United Kingdom. *Conservation Genetics* 12, 731–744.
- de Medeiros, B.A.S., Farrell, B.D., 2018. Whole-genome amplification in double-digest RADseq results in adequate libraries but fewer sequenced loci. *PeerJ* 6, e5089.
- De Mita, S., Thuillet, A., Gay, L., Ahmadi, N., Manel, S., Ronfort, J., Vigouroux, Y., 2013. Detecting selection along environmental gradients: analysis of eight methods in their effectiveness for outbreeding in selfing populations. *Molecular Ecology* 22, 1383–1399.

- De Wit P, Pespeni MH, Ladner JT, Barshis DJ, Seneca F, Jaris H, Overgaard Therkildsen N, Morikawa M and Palumbi SR (2012) The simple fool's guide to population genomics via RNA-Seq: an introduction to high-throughput sequencing data analysis. *Molecular Ecology Resources* 12, 1058-1067.
- Demarais, B.D., Dowling, T.E., Douglas, M.E., Minckley, W.L., Marsh, P.C., 1992. Origin of *Gila seminuda* (Teleostei: Cyprinidae) through introgressive hybridization: implications for evolution in conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 2747–2751.
- Doadrio, I.V., 1981. Restos de la ictiofauna del Mioceno de los Valles de Fuentidueña (Segovia). *Estudios Geológicos* 37, 353–354.
- Dowling, T.E., Childs, M.R., 1992. Impact of hybridization on a threatened trout of the southwestern United States. *Conservation Biology* 6, 355–364.
- Dowling, T.E., Secor, C.L., 1997. The role of hybridization in introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 593–619.
- Earl, D.A., vonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website in program for visualizing STRUCTURE output in implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Edmands, S., 2007. Between a rock in a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding in outbreeding for conservation in management. *Molecular Ecology* 16, 463–475.
- Edmands, S., Timmerman, C.C., 2003. Modeling factors affecting the severity of outbreeding depression. *Conservation Biology* 17, 883–892.
- Escalante, M.A., García-De-León, F.J., Dillman, C.B., de los Santos Camarillo, A., George, A., de los A. Barriga-Sosa, I., Ruiz-Luna, A., Mayden, R.L., Manel, S., 2014. Genetic introgression of cultured rainbow trout in the Mexican native trout complex. *Conservation Genetics* 15, 1063–1071. <https://doi.org/10.1007/s10592-014-0599-7>
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Everett, M. V, Grau, E. D., & Sciences, F. (2011). Short reads and nonmodel species : exploring the complexities of next-generation sequence assembly and SNP discovery in the absence of a reference genome, 11, 93–108. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02969.x>
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of pro- grams to perform population genetics analyses under Linux and Win- dows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population struc- ture using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.
- Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers in null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7, 574–578. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Fenster, C.B., Galloway, L.F., Chao, L., 1997. Epistasis in its consequences for the evolution of natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 12, 282–286.
- Ferguson, M.M., Danzmann, R.G., Allendorf, F.W., 1985. Absence of developmental incompatibility in hybrids between rainbow trout in two subspecies of cutthroat trout. *Biochemical Genetics* 23, 557–570.
- Figueiró, H. V, Li, G., Trindade, F.J., Assis, J., Pais, F., Fernandes, G., Santos, S.H.D., Hughes, G.M., Komissarov, A., Antunes, A., 2017. Genome-wide signatures of complex introgression in adaptive evolution in the big cats. *Science Advances* 3, e1700299.
- Fitzpatrick, B. M., Fordyce, J.A., Niemiller, M.L., R. G. Reynolds, 2012. What can DNA tell us about biological invasions? *Biological Invasions* 14, 245–253.

- Fitzpatrick, B.M., Johnson, J.R., Kump, D.K., Smith, J.J., Voss, S.R., Shaffer, H.B., 2010. Rapid spread of invasive genes into a threatened native species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3606–3610.
- Fitzpatrick, B.M., Ryan, M.E., Johnson, J.R., Corush, J., Carter, E.T., 2015. Hybridization in the species problem in conservation. *Current Zoology* 61, 206–216.
- Foll M, Gaggiotti O (2008) A Genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics*, 180, 977–993.
- Foll, M., 2012. BayeScan v2. 1 user manual. *Ecology* 20, 1450–1462.
- Frankham, R. 2010. Where are we in conservation genetics and where do we go? *Conservation Genetics*, 11, 661–663.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Ralls, K., Eldridge, M., Dudash, M.R., Fenster, C.B., Lacy, R.C., Sunnucks, P., 2017. Genetic Management of Fragmented Animal in Plant Populations, First Edit. ed. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198783398.001.0001>
- Fricke, R., Eschmeyer, W.N., Van Der Laan, R., 2018. Catalog of fishes: genera, species, references. California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA [Http://Researcharchive. Calacademy. Org/Research/Ichthyology/Catalog/Fishcatmain. Asp](http://Researcharchive.calacademy.org/Research/Ichthyology/Catalog/Fishcatmain.Asp).
- Funk, W. C., J. K. McKay, P. A. Hohenlohe, and F. W. Allendorf. 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution*, 27:489–496.
- Futschik, A., & Schlötterer, C. (2010). The next generation of molecular markers from massively parallel sequencing of pooled DNA samples. *Genetics*, 186(1), 207–218. <http://doi.org/10.1534/genetics.110.114397>
- Galaverni, M., Caniglia, R., Pagani, L., Fabbri, E., Boattini, A., Randi, E., 2017. Disentangling Timing of Admixture, Patterns of Introgression, in Phenotypic Indicators in a Hybridizing Wolf Population. *Molecular Biology in Evolution* 34, 2324–2339. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx169>
- Gaudant, P.J., 1989. Nouvelles observations sur l'ichthyofaune miocène de Steinheim am Albuch (Wurtemberg, Allemagne): Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde: Serie B/Geologie und: Paläontologie.
- Geiger, M.F., Herder, F., Monaghan, M.T., Almada, V., Barbieri, R., Bariche, M., Berrebi, P., Bohlen, J., Casal-Lopez, M., Delmastro, G.B., Denys, G.P.J., Dettai, A., Doadrio, I., Kalogianni, E., Käst, H., Kottelat, M., Kovačić, M., Laporte, M., Lorenzoni, M., Marčić, Z., Özüluğ, M., Perdices, A., Perea, S., Persat, H., Porcelotti, S., Puzzi, C., Robalo, J., Šanda, R., Schneider, M., Šlechtová, V., Stoumboudi, M., Walter, S., Freyhof, J., 2014. Spatial heterogeneity in the mediterranean biodiversity hotspot affects barcoding accuracy of its freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources* 14, 1210–1221. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12257>
- Gissi, C., Iannelli, F., Pesole, G., 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity* 101, 301–320. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.62>
- Glover K, Hansen M, Lien S, Als T, Høyheim B, Skaala Ø, 2010, A comparison of SNP and STR loci for delineating population structure and performing individual genetic assignment, *BMC Genetics*, 2010,11:2
- Gompert, Z., Alex Buerkle, C., 2010. Introgress: A software package for mapping components of isolation in hybrids. *Molecular Ecology Resources* 10, 378–384. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02733.x>
- Gompert, Z., Buerkle, C.A., 2016. What, if anything, are hybrids: enduring truths in challenges associated with population structure in gene flow. *Evolutionary Applications* 9, 909–923.

- Gonen, S., Lowe, N. R., Cezard, T., Gharbi, K., Bishop, S. C., & Houston, R. D. (2014). Linkage maps of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome derived from RAD sequencing. *BMC Genomics*, 15, 166. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-166>
- Grabenstein, K.C., Taylor, S.A., 2018. Breaking barriers: Causes, consequences, in experimental utility of human-mediated hybridization. *Trends in Ecology in Evolution* 33, 198–212. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.12.008>
- Grewe, P.M., Billington, N., Hebert, P.D.N., 1990. Phylogenetic Relationships Among Members of *Salvelinus* Inferred from Mitochondrial DNA Divergence. *Canadian Journal of Fisheries in Aquatic Sciences* 47, 984–991. <https://doi.org/10.1139/f90-113>
- Gross, M.R., 1991. Salmon breeding behavior in life history evolution in changing environments. *Ecology* 72, 1180–1186.
- Gum, B., Gross, R., Geist, J. 2009 Conservation genetics and management implications for European grayling, *Thymallus thymallus*: synthesis of phylogeography and population genetics, *Fisheries Management and Ecology*, 16, 1, 37–51.
- Gum, B., Gross, R., Kuehn, R., 2005. Mitochondrial in nuclear DNA phylogeography of European grayling (*Thymallus thymallus*): evidence for secondary contact zones in central Europe. *Molecular Ecology* 14, 1707–1725.
- Haddon, M., 1984. A re-analysis of hybridization between mallards in grey ducks in New Zealand.
- Hahn, C., Bachmann, L., Chevreaux, B., 2013. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads—a baiting in iterative mapping approach. *Nucleic Acids Research* 41, e129–e129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt371>
- Hall, T., Biosciences, I., Carlsbad, C., 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci* 2, 60–61.
- Halverson A. 2010. An Entirely Synthetic Fish: How Rainbow Trout Beguiled America and Overran the World. New Haven: Yale University Press.
- Hand et al. 2015. Genomics and introgression: Discovery and mapping of thousands of species-diagnostic SNPs using RAD sequencing *Current Zoology* 61 (1): 146–154.
- Hansen, M.M., Mensberg, K.-L.D., 2009. Admixture analysis of stocked brown trout populations using mapped microsatellite DNA markers: indigenous trout persist in introgressed populations. *Biology Letters* 5, 656–659.
- Harrison, R.G., 1993. Hybrids in hybrid zones: historical perspective. In: Harrison, R.G. (Ed.), *Hybrid Zones in the Evolutionary Process*. Oxford University Press Oxford, 3–12.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14812–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Hedrick, P.W., 1995. Gene flow in genetic restoration: the Florida panther as a case study. *Conservation Biology* 9, 996–1007.
- Hedrick, P.W., Fredrickson, R., 2010. Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves in Florida panthers. *Conservation Genetics* 11, 615–626.
- Hewitt, G.M., 1988. Hybrid zones-natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology in Evolution* 3, 158–167.
- Hindar, K., Ryman, N., Utter, F., 1991. Genetic effects of aquaculture on natural fish populations. *Aquaculture* 98, 259–261. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90389-O](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90389-O)
- Hohenlohe PA, Day MD, Amish SJ, Miller MR, Kamps-Hughes N et al., 2013. Genomic patterns of introgression in rainbow and westslope cutthroat trout illuminated by overlapping paired endRAD sequencing. *Molecular Ecology* 22: 3002–3013.
- Hohenlohe, P.A., Amish, S.J., Catchen, J.M., Allendorf, F.W., Luikart, G., 2011. Next-generation

- RAD sequencing identifies thousands of SNPs for assessing hybridization between rainbow in westslope cutthroat trout. *Molecular Ecology Resources* 11, 117–122.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02967.x>
- Houston RD, Taggart JB, Cézard T, et al., 2014. Development and validation of a high density SNP genotyping array for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 15: 90
- Hsü, K.J., Ryan, W.B.F., Cita, M.B., 1973. Late miocene desiccation of the mediterranean. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/242240a0>
- Hubisz, M.J., Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9, 1322–1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>
- Hudson AG, Vonlanthen P, Seehausen O (2011) Rapid parallel adaptive radiations from a single hybridogenetic ancestral population. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 278,58–66
- Hunt, M., Silva, N. De, Otto, T.D., Parkhill, J., Keane, J.A., Harris, S.R., 2015. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. *Genome Biology* 16, 294.
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0849-0>
- Innal, D., Erk'akan, F., 2006. Effects of exotic in translocated fish species in the inland waters of Turkey. *Reviews in Fish Biology in Fisheries* 16, 39–50.
- Janković, D., 1960. Sistematika i ekologija lipljena (*Thymallus thymallus* L.) u Jugoslaviji. *Biol. Inst. NRS i Stručno Udruženje Slatkovodnog Ribarstva Jugoslavije* 1–145.
- Jesenšek, D. & Šumer, S. 2004. Jadranski lipan v porečju Soče v Sloveniji. *RD Tolmin in ETP, Tolmin*, 2004, pp. 32.
- Jesenšek, D., Šumer, S., Valič, P., Fratnik, M., 2004. Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*, Linnaeus, 1758) in the Soča river basin, Slovenia: action plan. *Ribiška družina*.
- Johnson, M.S., 2000. Measuring in interpreting genetic structure to minimize the genetic risks of translocations. *Aquaculture Research* 31, 133–143.
- Jombart T, Devillard Sb, Balloux Fo (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11, 94
- Jombart, T., Ahmed, I., 2011. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* 27, 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Jones, G., 2016. Algorithmic improvements to species delimitation in phylogeny estimation under the multispecies coalescent. *Journal of Mathematical Biology* 74, 1–21.
<https://doi.org/10.1007/s00285-016-1034-0>
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M: KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* 2012, 40:D109–D114
- Karl, S.A., Bowen, B.W., Avise, J.C., 1995. Hybridization among the ancient mariners: characterization of marine turtle hybrids with molecular genetic assays. *Journal of Heredity* 86, 262–268.
- Karlsson S, Moen T, Lien S, Glover K, Hindar K (2011) Generic genetic differences between farmed and wild Atlantic salmon identified from a 7K SNP chip. *Molecular Ecology Resources*
- Kelly BP, Whiteley A, Tallmon D. 2010. The Arctic melting pot. *Nature*, 468, 891.
- Knizhin, I.B., Antonov, A.L., Safronov, S.N., Weiss, S.J., 2007. New species of grayling *Thymallus tugarinae* sp. nova (Thymallidae) from the Amur River Basin. *Journal of Ichthyology* 47, 123–139.
- Koskinen, M., Knizhin, I., Primmer, C., Schlötterer, C., Weiss, S., 2002. Mitochondrial in nuclear DNA phylogeography of *Thymallus* spp. (grayling) provides evidence of ice-age mediated environmental perturbations in the world's oldest body of fresh water, Lake Baikal. *Molecular Ecology* 11, 2599–2611. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01642.x>

- Koskinen, M.T., Nilsson, J., Veselov, A.J., Potutkin, A.G., Ranta, E., Primmer, C.R., 2002. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity* 88, 391–401. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800072>
- Koskinen, M.T., Ranta, E., Piironen, J., Veselov, A., Titov, S., Haugen, T.O., Nilsson, J., Carlstein, M., Primmer, C.R., 2000. Genetic lineages in postglacial colonization of grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) in Europe, as revealed by mitochondrial DNA analyses. *Molecular Ecology* 9, 1609–1624.
- Kottelat, M. 1997. European Freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematists and comments on nomenclature and conservation. *Biologia (Bratislava) Sect. Zool.*, 52 (Suppl.):1–271.
- Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. Maurice Kottelat, Jorg Freyhof -Handbook of European Freshwater Fishes (2007). Publications Kottelat Cornol.
- LANFEAR, R., FRANDSEN, P.B., WRIGHT, A.M., SENFELD, T., CALCOTT, B., 2017. Partitionfinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular in morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology in Evolution* 34, 772–773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
- Largiadèr, C.R., Scholl, A., 1996. Genetic introgression between native in introduced brown trout *Salmo trutta* L. populations in the Rhone River Basin. *Molecular Ecology* 5, 417–426.
- Larson, WA, Seeb, LW, Everett, MV, Waples, RK, Templin, WD, Seeb, JE. 2014. Genotyping by sequencing resolves shallow population structure to inform conservation of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Evolutionary Applications*, 7, 355–369.
- Le Cam, S., Perrier, C., Besnard, A.-L., Bernatchez, L., Evanno, G., 2015. Genetic in phenotypic changes in an Atlantic salmon population supplemented with non-local individuals: a longitudinal study over 21 years. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282, 20142765.
- Le Luyer, J., Laporte, M., Beacham, T.D., Kaukinen, K.H., Withler, R.E., Leong, J.S., Rondeau, E.B., Koop, B.F., Bernatchez, L., 2017. Parallel epigenetic modifications induced by hatchery rearing in a Pacific salmon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 12964–12969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711229114>
- Leary, R.E., Gould, W.R., Sage, G.K., 1996. Success of basibranchial teeth in indicating pure populations of rainbow trout in failure to indicate pure populations of westslope cutthroat trout. *North American Journal of Fisheries Management* 16, 210–213.
- Leary, R.F., Allendorf, F.W., Forbes, S.H., 1993. Conservation genetics of bull trout in the Columbia in Klamath River drainages. *Conservation Biology* 7, 856–865.
- Lecis, R. et al. 2006. Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 15, 119–131.
- Lemay et al., 2013. Using sequence transcriptome data to develop genome-wide SNP markers is an essential step towards fine-scale stock identification, and may enable a direct investigation of the genetic basis of ecotype divergence.
- Lemopoulos, A., Prokkola, J.M., Uusi-Heikkilä, S., Vasemägi, A., Huusko, A., Hyvärinen, P., Koljonen, M., Koskiniemi, J., Vainikka, A., 2019. Comparing RADseq in microsatellites for estimating genetic diversity in relatedness — Implications for brown trout conservation. *Ecology in Evolution* 9, ece3.4905. <https://doi.org/10.1002/ece3.4905>
- Lepais, O., Weir, J.T., 2014. SimRAD: An R package for simulation-based prediction of the number of loci expected in RADseq in similar genotyping by sequencing approaches. *Molecular Ecology Resources* 14, 1314–1321. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12273>
- Lester, L.J., 1992. Marine species introductions in native species vitality: genetic consequences of marine introductions. *Introduction in Transfers of Marine Species South Carolina Sea Grant*

- Consortium. 79–89.
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast in accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The sequence alignment/map format in SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
- Lippman, Z.B., Zamir, D., 2007. Heterosis: revisiting the magic. *Trends in Genetics* 23, 60–66.
- Lischer, H.E.L., Excoffier, L., 2011. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics in genomics programs. *Bioinformatics* 28, 298–299.
- Liu L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/251364> (Article ID 251364)
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, 4, 981–994.
- Lynch, M., 1991. The genetic interpretation of inbreeding depression in outbreeding depression. *Evolution* 45, 622–629.
- Lynch, M., Conery, J.S., 2000. The evolutionary fate in consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151–1155.
- Lynch, M., Walsh, B., 1998. *Genetics in analysis of quantitative traits*. Sinauer Sunderland, MA.
- Ma, B., Jiang, H., Sun, P., Chen, J., Li, L., Zhang, X., Yuan, L., 2015. Phylogeny in dating of divergences within the genus *thymallus* (Salmonidae: Thymallinae) using complete mitochondrial genomes. *Mitochondrial DNA* 27, 3602–3611. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1079824>
- Macchio, S., Rossi, G.L., Balzamo, S., Martone, C., 2016. Fitting the revised assessment method for rivers in Italy using fishes to the results of the completed intercalibration exercise. commissioned by Ministry of Environment, Land in Sea Authors.
- Macqueen, D.J., Johnston, I.A., 2014. A well-constrained estimate for the timing of the salmonid whole genome duplication reveals major decoupling from species diversification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 20132881–20132881. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2881>
- Malenfant RM, Coltman DW; Davis, CS, 2015. Design of a 9K illumina BeadChip for polar bears (*Ursus maritimus*) from RAD and transcriptome sequencing. *MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES* 15: 587–600.
- Marić, S., B. Kalamujić, A. Snoj, A. Razpet, L. Lukić-Bilela, N. Pojskić & S. Sušnik Bajec, 2012. Genetic variation of European grayling (*Thymallus thymallus*) populations in the Western Balkans. *Hydrobiologia* 691: 225–237.
- Martini, E., 1983. *Die Fischfauna von Langenau bei Ulm (Unter-Miozän, Ottnang-Stufe): mit 1 Tabelle*. Staatliches Museum für Naturkunde.
- McFarlane, S.E., Pemberton, J.M., 2019. Detecting the True Extent of Introgression during Anthropogenic Hybridization. *Trends in Ecology in Evolution* 34, 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.12.013>
- McGinnity, P., Prodöhl, P., Ferguson, A., Hynes, R., Maoiléidigh, N. ó, Baker, N., Cotter, D., O’Hea, B., Cooke, D., Rogan, G., 2003. Fitness reduction in potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, 2443–2450.
- McGinnity, P., Prodöhl, P., Ó Maoiléidigh, N., Hynes, R., Cotter, D., Baker, N., O’hea, B., Ferguson, A., 2004. Differential lifetime success in performance of native in non-native Atlantic salmon examined under communal natural conditions. *Journal of Fish Biology* 65, 173–187.

- McMahon BJ, Teeling EC, Hoglund J, 2014. How and why should we implement genomics into conservation? *Evolutionary Applications* 7: 999–1007.
- Meraner, A. & Gandolfi, A. 2012. Phylogeography of European grayling, *Thymallus thymallus* (Actinopterygii, Salmonidae), within the Northern Adriatic basin: evidence for native and exotic mitochondrial DNA lineages. *Hydrobiologia* 693(1): 205–221.
- Meraner, A., Cornetti L., Gandolfi, A. 2014. Defining conservation units in a stocking-induced genetic melting pot: unraveling native and multiple exotic genetic imprints of recent and historical secondary contact in Adriatic grayling. *Ecology and Evolution*, 4(8): 1313–1327.
- Meraner, A., Unfer, G., & Gandolfi, A. (2013). Good news for conservation: mitochondrial and microsatellite DNA data detect limited genetic signatures of inter-basin fish transfer in *Thymallus thymallus* (Salmonidae) from the Upper Drava River. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, (409), 01. <http://doi.org/10.1051/kmae/2013046>
- Meyer et al., 2013. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos, *Nature*, 505, 403–406.
- Meyer, M., Kircher, M., Gansauge, M.-T., Li, H., Racimo, F., Mallick, S., Schraiber, J.G., Jay, F., Prüfer, K., De Filippo, C., 2012. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science* 338, 222–226.
- Miller, M.R., Dunham, J.P., Amores, A., Cresko, W.A., Johnson, E.A., 2007. Rapid in cost-effective polymorphism identification in genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research* 17, 240–248.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215.
- Miller, W. et al. 2012. Polar and brown bear genomes reveal ancient admixture and demographic footprints of past climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 2382–2390.
- Miya, M., Nishida, M., 2014. The mitogenomic contributions to molecular phylogenetics in evolution of fishes: a 15-year retrospect. *Ichthyological Research* 62, 29–71. <https://doi.org/10.1007/s10228-014-0440-9>
- Moore, W.S., Price, J.T., 1993. Nature of selection in the northern flicker hybrid zone in its implications for speciation theory, *Hybrid Zones in the Evolutionary Process*. Oxford University Press.
- Morin, P.A., Luikart, G., Wayne, R.K., 2004. SNPs in ecology, evolution in conservation. *Trends in Ecology in Evolution* 19, 208–216.
- Muhlfeld, C.C., Kalinowski, S.T., McMahon, T.E., Taper, M.L., Painter, S., Leary, R.F., Allendorf, F.W., 2009. Hybridization rapidly reduces fitness of a native trout in the wild. *Biology Letters* 5, 328–331.
- Nachman, MW, 2013. Genomics and museum specimens. *Molecular Ecology* 22: 5966–5968.
- Narum, S. R., C. A. Buerkle, J. W. Davey, M. R. Miller, and P. A. Hohenlohe. 2013. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Molecular Ecology*, 22:2841–2847.
- Narum, S.R., Hess, J.E., 2011. Comparison of *F*_{ST} outlier tests for SNP loci under selection. *Molecular Ecology Resources* 11, 184–194.
- Near, T.J., Eytan, R.I., Dornburg, A., Kuhn, K.L., Moore, J.A., Davis, M.P., Wainwright, P.C., Friedman, M., Smith, W.L., 2012. Resolution of ray-finned fish phylogeny in timing of diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 13698–703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206625109>
- Nocita, A., Zerunian, S., 2007. L'ittiofauna aliena nei fiumi e nei laghi d'Italia. *Biologia Ambientale* 21, 93–96.
- Nolte, A.W. & Tautz, D. 2010. Understanding the onset of hybrid speciation. *Trends Genet.* 26, 54–58.

- Nolte, A.W., Freyhof, J., Stemshorn, K.C., Tautz, D., 2005. An invasive lineage of sculpins, *Cottus* sp. (Pisces, Teleostei) in the Rhine with new habitat adaptations has originated from hybridization between old phylogeographic groups. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272, 2379–2387. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3231>
- Northcote, T.G., 1995. Comparative biology in management of Arctic in European grayling (*Salmonidae*, *Thymallus*). *Reviews in Fish Biology in Fisheries* 5, 141–194.
- O'Toole, C.L., Reed, T.E., Bailie, D., Bradley, C., Cotter, D., Coughlan, J., Cross, T., Dillane, E., Mcevoy, S., Ó Maoiléidigh, N., Prodöhl, P., Rogan, G., McGinnity, P., 2015. The signature of fine scale local adaptation in Atlantic salmon revealed from common garden experiments in nature. *Evolutionary Applications* 8, 881–900. <https://doi.org/10.1111/eva.12299>
- Oberdorff, T., Pont, D., Hugueny, B., Porcher, J., 2002. Development in validation of a fish-based index for the assessment of 'river health' in France. *Freshwater Biology* 47, 1720–1734.
- Orr, H.A., 1998. The population genetics of adaptation: the distribution of factors fixed during adaptive evolution. *Evolution* 52, 935–949.
- Orr, H.A., Turelli, M., 2001. The evolution of postzygotic isolation: accumulating Dobzhansky-Muller incompatibilities. *Evolution* 55, 1085–1094.
- Ovidio, M., Parkinson, D., Sonny, D., Philippart, J.-C., 2004. Spawning movements of European grayling *Thymallus thymallus* in the River Aisne (Belgium). *Folia Zoologica* 53, 87–98.
- Palti, Y., Gao, G., Liu, S., Kent, M.P., Lien, S., Miller, M.R., Rexroad, C.E., Moen, T., 2015. The development in characterization of a 57K single nucleotide polymorphism array for rainbow trout. *Molecular Ecology Resources* 15, 662–672. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12337>
- Palumbi, S.R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13: S146-S158.
- Palumbi, S.R. 2004. Marine Reserves and Ocean Neighborhoods: The Spatial Scale of Marine Populations and Their Management. *Annual Review of Environmental Resources* 29: 31-68.
- Pavlov, D.S., Nezdolii, V.K., Ostrovskii, M.P., Fomin, V.K., 1998. Homing in the grayling *Thymallus thymallus* in the basin of the upper Volga. *Journal of Ichthyology* 38, 552–553.
- Payseur, B.A., Rieseberg, L.H., 2016. A genomic perspective on hybridization in speciation. *Molecular Ecology* 25, 2337–60. <https://doi.org/10.1111/mec.13557>
- Pekkala, N., E. Knott, K., Kotiaho, J.S., Nissinen, K., Puurtinen, M., 2012. The benefits of interpopulation hybridization diminish with increasing divergence of small populations. *Journal of Evolutionary Biology* 25, 2181–2183. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02594.x>
- Perrier, C., Baglinière, J.L., Evanno, G., 2013. Understanding admixture patterns in supplemented populations: A case study combining molecular analyses in temporally explicit simulations in Atlantic salmon. *Evolutionary Applications* 6, 218–230. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00280.x>
- Persat, H., Mattersdorfer, K., Charlat, S., Schenekar, T., Weiss, S., 2016. Genetic integrity of the European grayling (*Thymallus thymallus*) populations within the Vienne River drainage basin after five decades of stockings. *Cybiurn* 40, 7–20.
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012) Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7, 11.
- Pfennig, K.S., Kelly, A.L., Pierce, A.A., 2016. Hybridization as a facilitator of species range expansion. *Proceedings. Biological Sciences* 283.
- Pickrell, J.K., Patterson, N., Barbieri, C., Berthold, F., Gerlach, L., Güldemann, T., Kure, B., Mpoloka, S.W., Nakagawa, H., Naumann, C., 2012. The genetic prehistory of southern Africa. *Nature Communications* 3, 1143.

- Pina-Martins, F., Silva, D.N., Fino, J., Paulo, O.S., 2017. Structure_threader: An improved method for automation in parallelization of programs structure, fastStructure in Maverick on multicore CPU systems. *Molecular Ecology Resources* 17, e268–e274.
- Povž, M., 1992. The red list of endangered Pisces in Cyclostomata in Slovenia. *Varstvo Narave* 17, 51–59.
- Povž, M., 1995. Status of freshwater fishes in the Adriatic catchment of Slovenia. *Biological Conservation* 72, 171–177.
- Povž, M., 1996. The Red Data List of the freshwater lampreys (Cyclostomata) in fish (Pisces) of Slovenia. *Conservation of Endangered Freshwater Fish in Europe*. Springer, 63–72.
- Povž, M., Sket, B., Furlan, B., Červek, S., Raičkovič, B., Sedmak, A., 1990. Naše sladkovodne ribe. Mladinska knjiga.
- Prodöhl, P.A., Ferguson, A., Bradley, C.R., Ade, R., Roberts, C., Keay, E.J., Costa, A.R., Hynes, R., 2019. Impacts of acidification on brown trout *Salmo trutta* populations in the contribution of stocking to population recovery in genetic diversity. *Journal of Fish Biology*.
- Pukk, L., Ahmad, F., Hasan, S., Kisand, V., & Gross, R. (2015). Less is more: extreme genome complexity reduction with ddRAD using Ion Torrent semiconductor technology. *Molecular Ecology Resources*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12392>
- Pustovrh, G., Snoj, A., Bajec, S.S., 2011. A set of SNPs enabling identification of trouts in their hybrids in *Salmo* genus. *Conservation Genetics Resources* 3, 147–150. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9310-6>
- Pustovrh, G., Snoj, A., Sušnik Bajec, S. 2014. Molecular phylogeny of *Salmo* of the western Balkans, based upon multiple nuclear loci. *Genetics Selection Evolution*, 46, 1-12.
- R Core Team, 2017. R: A Language in Environment for Statistical Computing.
- Raj, A., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2014. FastSTRUCTURE: Variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics* 197, 573–589. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.164350>
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2007. Tracer v1.6. BEAST [WWW Document]. URL <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> (accessed 5.3.15).
- Rannala, B., 2015. The art in science of species delimitation. *Current Zoology* 61, 846–853. <https://doi.org/10.1093/czoolo/61.5.846>
- Razpet, A., Marić, S., Parapot, T., Nikolić, V., Simonović, P., 2007a. Re-evaluation of *Salmo* data by Gridelli (1936) - Description of stocking, hybridization in repopulation in the River Soča basin. *Italian Journal of Zoology* 74, 63–70. <https://doi.org/10.1080/11250000601090081>
- Razpet, A., Sušnik, S., Jug, T., Snoj, A., 2007b. Genetic variation among trout in the River Neretva basin, Bosnia in Herzegovina. *Journal of Fish Biology* 70, 94–110. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01392.x>
- Recknagel, H., Jacobs, A., Herzyk, P., & Elmer, K. R. (2015). Double-digest RAD sequencing using Ion Proton semiconductor platform (ddRADseq-ion) with non-model organisms. *Molecular Ecology Resources*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12406>
- Renaut, S., N. Maillet, E. Normandeau, C. Sauvage, N. Derome, S. M. Rogers, L. Bernatchez 2012. Genome-wide patterns of divergence during speciation: the lake whitefish case study. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 367:354–363.
- Rhymer, J.M., Simberloff, D., 1996. Extinction by hybridization in introgression. *Annual Review of Ecology in Systematics* 27, 83–109.
- Rius, M., Darling, J.A., 2014. How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations? *Trends in Ecology in Evolution* 29, 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.02.003>
- Rochette, N.C., Rivera-Colón, A.G., Catchen, J.M., 2019. Stacks 2: Analytical Methods for Paired-

- end Sequencing Improve RADseq-based Population Genomics. *BioRxiv* 615385.
- Santure, A. W. et al. 2010. On the use of large marker panels to estimate inbreeding and relatedness: empirical and simulation studies of a pedigreed zebra finch population typed at 771 SNPs. *Mol. Ecol.* 19, 1439–1451.
- Sävilampi, T., Primmer, C.R., Varadharajan, S., Guyomard, R., Guiguen, Y., Sandve, S.R., Vøllestad, L.A., Papakostas, S., Lien, S., 2019. The Chromosome-Level Genome Assembly of European Grayling Reveals Aspects of a Unique Genome Evolution Process Within Salmonids. *G3* (Bethesda, Md.) 9, 1283–1294. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200919>
- Schoffmann, J., 2000. The grayling species (Thymallinae) of three different catchment areas of Mongolia. *The Grayling Society Journal*, Spring.
- Seeb, J. E. et al. 2011. Transcriptome sequencing and high-resolution melt analysis advance single nucleotide polymorphism discovery in duplicated salmonids. *Molecular Ecology Resources* 11:335–348.
- Seeb, J.E., Carvalho, G., Hauser, L., Naish, K., Roberts, S., Seeb, L.W., 2011. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery in applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Molecular Ecology Resources* 11, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02979.x>
- Shafer A.B.A. et al. 2015. Genomics and the challenging translation into conservation practice. *TREE*, 30, 78–87.
- Shafer, A.B.A., Peart, C.R., Tusso, S., Maayan, I., Brelsford, A., Wheat, C.W., Wolf, J.B.W., 2017. Bioinformatic processing of RAD-seq data dramatically impacts downstream population genetic inference. *Methods in Ecology and Evolution* 8, 907–917. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12700>
- Shedlock, A.M., Parker, J.D., Crispin, D.A., Pietsch, T.W., Burmer, G.C., 1992. Evolution of the salmonid mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1, 179–192.
- Slatkin, M., 1993. Isolation by distance in equilibrium in non-equilibrium populations. *Evolution* 47, 264–279.
- Šlechtová, V., Bohlen, J., Freyhof, J., Persat, H., Delmastro, G.B., 2004. The Alps as barrier to dispersal in cold-adapted freshwater fishes? Phylogeographic history in taxonomic status of the bullhead in the Adriatic freshwater drainage. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33, 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.05.005>
- Smith, C.T., Seeb, L.W., 2008. Number of alleles as a predictor of the relative assignment accuracy of short tandem repeat (STR) in single-nucleotide-polymorphism (SNP) baselines for chum salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 137, 751–762.
- Snoj, A., Sušnik, S., Pohar, J., Dovč, P., 1999. The first microsatellite marker (BFRO 004) for grayling, informative for its Adriatic population. *Animal Genetics* 30, 74–75.
- Sønstebo, J.H., Borgstrøm, R., Heun, M., 2008. High genetic introgression in alpine brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Hardangervidda, Norway. *Ecology of Freshwater Fish* 17, 174–183.
- Splendiani, A., Giovannotti, M., Righi, T., Fioravanti, T., Cerioni, P.N., Lorenzoni, M., Carosi, A., La Porta, G., Barucchi, V.C., 2019. Introgression despite protection: the case of native brown trout in Natura 2000 network in Italy. *Conservation Genetics* 20, 343–356.
- Stearley, R.F., Smith, G.R., 2016. Fishes of the Mio-Pliocene Western Snake River Plain in Vicinity: I. Salmonid fishes from Mio-Pliocene lake sediments in Western Snake river plain in the Great Basin. In: *Arbor, A. (Ed.). Miscellaneous publications - Museum of Zoology, University of Michigan.*
- Stoch, F., 2000. How many endemic species? Species richness assessment in conservation priorities in Italy. *Belgian Journal of Entomology* 2, 125–133.
- Sullivan, C.A., Jesensek, B., Jesensek, D., Zuza, A., 2003. An assessment of the importance of

- recreational sports fishing in the upper Soca basin, Slovenia. Project Report to Tour Du Valat, CEH, Wallingford, UK.
- Sušnik Bajec, S., Snoj, A. 2005. Lipan (*Thymallus thymallus*) v porečju Soče. *Ribič*, 64, št. 5, str. 115–116.
- Sušnik S, Snoj A, Dovč P. 1999. Microsatellites in grayling (*Thymallus thymallus*): comparison of two geographically remote populations from the Danubian and Adriatic river basin in Slovenia. *Mol. Ecol.*, 8, 1756–1758.
- Sušnik S, Snoj A, Dovč P. 2001. Evolutionary distinctness of grayling (*Thymallus thymallus*) inhabiting the Adriatic river system, as based on mtDNA variation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74, 3, 375–385.
- Sušnik, S., P. Berrebi, P. Dovč, M. M. Hansen & A. Snoj, 2004. Genetic introgression between wild and stocked salmonids and the prospects for using molecular markers in population rehabilitation: the case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus* L. 1785). *Heredity* 93: 272–282.
- Sušnik, S., Pustovrh, G., Jesenšek, D., Snoj, A., 2015. Population genetic SNP analysis of marble in brown trout in a hybridization zone of the Adriatic watershed in Slovenia. *Biological Conservation* 184, 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.01.033>
- Sušnik, S., Snoj, A., Wilson, I.F., Mrdak, D., Weiss, S., 2007. Historical demography of brown trout (*Salmo trutta*) in the Adriatic drainage including the putative *S. letnica* endemic to Lake Ohrid. *Molecular Phylogenetics in Evolution* 44, 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.08.021>
- Svetina, M., 1982. Sladkovodno ribištvo na Slovenskem. *Ribiški Zbornik*. Ribiška zveza Slovenija, Ljubljana.
- Taberlet, P., Waits, L.P., Luikart, G., 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology in Evolution* 14, 323–327.
- Tallmon, D.A., Luikart, G., Waples, R.S., 2004. The alluring simplicity in complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology in Evolution* 19, 489–496.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology in Evolution* 30, 2725–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thomas, W.K., Withler, R.E., Beckenbach, A.T., 1986. Mitochondrial DNA analysis of Pacific salmonid evolution. *Canadian Journal of Zoology* 64, 1058–1064. <https://doi.org/10.1139/z86-158>
- Todesco, M., Pascual, M.A., Owens, G.L., Ostevik, K.L., Moyers, B.T., Hübner, S., Heredia, S.M., Hahn, M.A., Caseys, C., Bock, D.G., Rieseberg, L.H., 2016. Hybridization in extinction. *Evolutionary Applications* 9, 892–908. <https://doi.org/10.1111/eva.12367>
- Turner, S.D., 2014. qqman: an R package for visualizing GWAS results using QQ in manhattan plots. *Biorxiv* 5165.
- Twyford AD, Ennos RA, 2012. Next-generation hybridization and introgression. *Heredity* 108: 179–89.
- Twyford, A.D., Ennos, R.A., 2012. Next-generation hybridization in introgression. *Heredity* 108, 179–189. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.68>
- Uiblein F., Jagsch A., Kossner G., Weiss S., Gollmann P., Kainz E. 2000. Untersuchungen zu lokaler Anpassung, Gefährdung und Schutz der Asche (*Thymallus thymallus*) in drei Gewässern in Oberösterreich. *Osterreichische Fischerei* 53 89–165.
- Uiblein, F., Jagsch, a., Honsig-Erlenburg, W., Weiss, S., 2001. Status, habitat use, in vulnerability of the European grayling in Austrian waters. *Journal of Fish Biology* 59, 223–247. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2001.1762>

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3—new capabilities in interfaces. *Nucleic Acids Research* 40, e115–e115.
- Vähä, J.P., Primmer, C.R., 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios in with different numbers of loci. *Molecular Ecology* 15, 63–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02773.x>
- Van de Peer, Y., Maere, S., Meyer, A., 2009. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews Genetics* 10, 725.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying in correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Varadharajan, S., Sandve, S.R., Gillard, G.B., Tørresen, O.K., Mulugeta, T.D., Hvidsten, T.R., Lien, S., Vøllestad, L.A., Jentoft, S., Nederbragt, A.J., Jakobsen, K.S., 2018. The grayling genome reveals selection on gene expression regulation after whole-genome duplication. *Genome Biology in Evolution* 10, 2785–2800. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy201>
- Vasemagi A, Primmer CR (2005) Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies. *Molecular Ecology*, 14, 3623–3642
- Vilà, C., Amorim, I.R., Leonard, J.A., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci-Fonseca, F., Crandall, K.A., Ellegren, H., Wayne, R.K., 1999. Mitochondrial DNA phylogeography in population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology* 8, 2089–2103.
- Vøllestad, L.A., Primmer, C.R., 2019. Understanding local adaptation in a freshwater salmonid fish: evolution of a research programme. *ICES Journal of Marine Science*. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsz037>
- Wall, J.D., Yang, M.A., Jay, F., Kim, S.K., Durand, E.Y., Stevison, L.S., Gignoux, C., Woerner, A., Hammer, M.F., Slatkin, M., 2013. Higher levels of Neanderthal ancestry in East Asians than in Europeans. *Genetics* 194, 199–209.
- Wallis, G.P., Cameron-Christie, S.R., Kennedy, H.L., Palmer, G., Sanders, T.R., Winter, D.J., 2017. Interspecific hybridization causes long-term phylogenetic discordance between nuclear in mitochondrial genomes in freshwater fishes. *Molecular Ecology* 26, 3116–3127.
- Wandeler, P., Hoeck, P.E.A., Keller, L.F., 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology in Evolution* 22, 634–642.
- Wang, S., Furmanek, T., Kryvi, H., Krossøy, C., Totland, G. K., Grotmol, S., & Wargelius, A. (2014). Transcriptome sequencing of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) notochord prior to development of the vertebrae provides clues to regulation of positional fate, chordoblast lineage and mineralisation. *BMC Genomics*, 15(1), 141. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-141>
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10, 57.
- Wayne, R.K., Shaffer, H.B., 2016. Hybridization in endangered species protection in the molecular era. *Molecular Ecology* 25, 2680–2689.
- Weiss S, Persat H, Eppe R, Schloetterer C, Uiblein F. 2002. Complex pattern of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region. *Mol Ecol* 11: 1393–1407.
- Weiss, S., Schlötterer, C., Waidbacher, H., Jungwirth, M., 2001. Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish—by man or nature? *Molecular Ecology* 10, 1241–1246.
- Weiss, S.J., Kopun, T., Sušnik Bajec, S., 2013. Assessing natural in disturbed population structure in European grayling *Thymallus thymallus*: melding phylogeographic, population genetic in

- jurisdictional perspectives for conservation planning. *Journal of Fish Biology* 82, 505–521.
- Westemeier, R.L., Brawn, J.D., Simpson, S.A., Esker, T.L., Jansen, R.W., Walk, J.W., Kershner, E.L., Bouzat, J.L., Paige, K.N., 1998. Tracking the long-term decline in recovery of an isolated population. *Science* 282, 1695–1698.
- Whiteley, A.S., Jenkins, S., Waite, I., Kresoje, N., Payne, H., Mullan, B., Allcock, R., O'Donnell, A., 2012. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) platform. *J. Microbiol. Meth.* 91, 80–88.
- Whitlock, M.C., 2000. Fixation of new alleles in the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, in sexual selection. *Evolution* 54, 1855–1861.
- Whitlock, M.C., Phillips, P.C., Moore, F.B.-G., Tonsor, S.J., 1995. Multiple fitness peaks in epistasis. *Annual Review of Ecology and Systematics* 26, 601–629.
- Wiley, E.O., 2006. The Evolutionary Species Concept Reconsidered. *Systematic Zoology* 55, 17. <https://doi.org/10.2307/2412809>
- Wilson, C.C., Bernatchez, L., 1998. The ghost of hybrids past: fixation of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in an introgressed population of lake trout (*S. namaycush*). *Molecular Ecology* 7, 127–132.
- Wilson, M.V.H., Li, G.Q., 1999. Osteology in systematic position of the Eocene salmonid †*Eosalmo driftwoodensis* Wilson from western North America. *Zoological Journal of the Linnean Society* 125, 279–311. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1999.tb00594.x>
- Wolf, J.B.W., Ellegren, H., 2017. Making sense of genomic islands of differentiation in light of speciation. *Nature Reviews Genetics* 18, 87.
- Wright, S., 1984. *Evolution in the Genetics of Populations, Volume 2: Theory of gene frequencies*, 2nd ed. University of Chicago Press.
- Yamasaki, Y.Y., Nishida, M., Suzuki, T., Mukai, T., Watanabe, K., 2015. Phylogeny, hybridization, in life history evolution of *Rhinogobius* gobies in Japan, inferred from multiple nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 90, 20–33.
- Yasuike, M., Jantzen, S., Cooper, G.A., Leder, E., Davidson, W.S., Koop, B.F., 2010. Grayling (*Thymallinae*) phylogeny within salmonids: Complete mitochondrial DNA sequences of *Thymallus arcticus* in *Thymallus thymallus*. *Journal of Fish Biology* 76, 395–400. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02494.x>
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1–16.
- Zerunian, S., 2002. Iconografia dei pesci delle acque interne d'Italia. *Quaderni Di Conservazione Della Natura* 259.