

**GENETSKA RAZNOLIKOST MED FENOTIPSKO RAZLIČNIMA POSTRVEMA V
SLOVENIJI, AVTOHTONO IN VNESENO ***

A. SNOJ^{a)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale, Slovenija, mag., dipl. kmet. inž.

Delo je prispelo 1997-06-20, sprejeto 1997-08-29.
Received June 20, 1997, accepted August 08, 1997.

IZVLEČEK

Iskali smo genetski polimorfizem, s katerim bi bilo mogoče razlikovati med slovenskimi avtohtonimi (donavskimi) in vnešenimi (atlantskimi) populacijami postrvi (*Salmo trutta*). Znotraj kontrolne regije mitohondrijske DNK smo našli tri polimorfna mesta s štirimi genetskimi variantami, od katerih sta bili dve značilni za donavski tip postrvi, ena za atlantski tip in druga za ohridsko postrv. Pri analizi mikrosatelitne DNK smo našli en informativen lokus s štirimi aleli, ki so omogočali razlikovanje med donavskim in atlantskim tipom postrvi ter ohridsko postrvjo. S temi genetskimi markerji smo ugotovili, da je na območjih, kjer vlagajo ribogojniško postrv, ogrožena genetska in fenotipska identiteta slovenske avtohtone postrvi.

Ključne besede: genetski polimorfizem, genetski markerji, mitohondrijska DNA, mikrosateliti, postrv, *Salmo trutta*

**GENETIC VARIATION BETWEEN PHENOTYPICALLY DIFFERENT NATIVE AND
INTRODUCED BROWN TROUT IN SLOVENIA ***

ABSTRACT

The aim of the study was the identification of genetic polymorphism enabling a discrimination between Slovenian native (Danubian) and introduced (Atlantic) brown trout (*Salmo trutta*) populations. Within the mitochondrial DNA D-loop region three polymorphic sites with four different genotypes were found, two of them being characteristic for the Danubian brown trout, and the other two for the Atlantic and the Ohrid trout, respectively. Analyzing microsatellite DNA one informative locus was found, revealing four alleles which enabled the discrimination among the Danubian, the Atlantic and the Ohrid type of brown trout. Using these genetic markers it was confirmed that the genetic and phenotypic identity of Slovenian native brown trout is endangered with non-native one, especially at districts being intensively stocked with hatchery-reared brown trout.

Key words: genetic polymorphism, genetic markers, mitochondrial DNA, microsatellites, brown trout, *Salmo trutta*

* Prispevek je del doktorske disertacije, mentor prof. dr. P. Dovč, somentor prof. dr. J. Pohar
This paper is a part of dissertation thesis, supervisor Ass. Prof. P. Dovč, Ph. D., co-advisor Ass. Prof. J. Pohar, Ph. D.

Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika, 70(1997)

UVOD

Postrv je avtohtona salmonidna vrsta v porečjih Evrazije in severne Afrike. Naseljuje območja, ki se raztezajo od severne Norveške in severo-vzhodnega dela severne Rusije na severu do pogorja Atlas v severni Afriki na jugu; od zahoda proti vzhodu pa od Islandije do Aralskega morja (Behnke, 1986). Postrv se pojavlja v najrazličnejših geografsko pogojenih oblikah. Tudi znotraj določenega geografskega območja prihaja med osebkami do izrazitih fenotipskih razlik in razhajanj glede na tip njihovega življenjskega vzorca. Ta se odraža v eni od treh oblik (potočna, jezerska in anadromna), ki jih *S. trutta* razvije glede na danosti, pogojene z njenim življenjskim okoljem (Bernatchez in sod., 1992). Zaradi njene očitne raznolikosti so geografske in ekološke oblike postrvi tudi taksonomsko opredeljevali. To je povzročilo zmedo v nomenklaturi, saj so nekateri avtorji njene ekološke ali morfološke oblike označevali kot samostojne vrste ali podvrste (Behnke, 1986). Strokovne raziskave so pokazale, da taka klasifikacija ni ustrezna, ker ne predstavlja naravnih populacij, ki bi nastale z razvojem iz monofiletskega prednika (Bernatchez in sod., 1992; Giuffra in sod., 1994; Giuffra in sod., 1996; Apostolidis in sod., 1996). Poleg tega z elektroforetsko analizo aloencimskega polimorfizma in s preučevanjem kontrolne regije mitohondrijske dezoksiribonukleinske kisline (mtDNK) niso našli med različnimi ekološkimi formami postrvi nikakršnih razlik (Hindar in sod., 1991; Bernatchez in sod., 1992). Nasprotno pa so na osnovi istih analiz opazili veliko genetsko raznolikost pri geografsko ločenih populacijah postrvi (Krieg in Guyomard, 1985; Garcia Marin in sod., 1991; Apostolidis in sod., 1996; Largiadèr in Scholl, 1996; Berrebi, osebna informacija; Bernatchez in sod., 1992; Giuffra in sod., 1996), ki so jih, glede na porečja, od koder izhajajo, v grobem lahko razvrstili v štiri osnovne tipe: atlantski, donavski, sredozemski in *marmoratus* (porečje reke Pad). V splošnem kaže, da je genetska raznolikost znotraj atlantskih populacij in populacij *marmoratus* relativno majhna, medtem ko donavske in sredozemske populacije izražajo večjo genetsko intraspecifično variabilnost (Guyomard in Krieg, 1983; Krieg in Guyomard, 1983; Bernatchez in sod., 1992; Apostolidis, 1996). Zanimivo je, da vse do sedaj raziskovane ribogojniške (domesticirane) populacije postrvi kažejo atlantsko poreklo.

V pričujoči raziskavi smo analizirali nekatere slovenske avtohtone (donavski tip) in ribogojniške (atlantski tip) populacije postrvi. V prvi vrsti smo želeli poiskati zanesljiv genetski marker, ki bi omogočal razlikovanje med nativnimi in ribogojniškimi populacijami postrvi, ter oceno razširjenosti neavtohtone postrvi v slovenskih vodah. Osredotočili smo se na kontrolno regijo mtDNK in na mikrosatelitno DNK, ki zaradi svoje značilne hipervariabilnosti predstavlja odličen objekt za molekularno genetske in populacijske študije rodu in vseh nižjih taksonomskih enot ter za izdelavo genetskih markerjev (Harrison, 1989; Queller in sod., 1993).

MATERIAL IN METODE

V raziskavo smo vključili primerke šestih geografsko ločenih populacij postrvi, ki so izvirali iz Iške, Mahnečice, Cerkniščice, ribogojnic Povodje in Mount Lassen Fish Farm, Kalifornija, ter iz Ohridskega jezera. Iška spada v donavsko porečje in jo redno poribljajo s postrvjo iz ribogojnice Povodje, ki razpolaga s postrvmi domnevno atlantskega porekla. Mahnečica predstavlja del kraškega rečnega sistema in se izliva v Cerkniščico, kamor so do nedavnega redno vlagali ribogojniško postrv. Ker je lokacija vzorčenja v Mahnečici od preostalega vodotoka ločena z visokim slapom, ki preprečuje migracijo rib proti toku, smo predvidevali, da ti vzorci predstavljajo avtohtono populacijo.

DNK smo izolirali iz krvi, ki smo jo jemali iz lateralne vene anesteziranih rib. Uporabljali smo dvo- ali trimililitske vakuumske zbiralce (Becton-Dickinson) z EDTA (K_3) in igle 0,5 X 17 ali 0,7 x 40 mm, odvisno od velikosti ribe. Volumni krvnih vzorcev so se gibali med 50 do 500 μ l. Mitohondrijsko DNK smo izolirali po protokolu, ki ga opisuje Bernatchez in sod. (1992), genomsko DNK pa po protokolu Medrana in sod. (1990).

S polimerzno verižno reakcijo (PCR) smo pomnoževali variabilni fragment 5'-konca kontrolne regije mtDNK. Uporabljali smo naslednji par oligonukleotidnih začetnikov (Dovč in Hecht, 1994):

- HF (Haevy strand Forward), ki je bil na 5'-koncu označen z digoksigeninom:

5'-CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG-3'

- 28RIBa, ki predstavlja skrajšano obliko oligonukleotidnega začetnika "28":

5'-CAC CCT TAA CTC CCA AAG CTA AG-3'

Komplementarno zaporedje oligonukleotida HF je v ohranjenem osrednjem delu kontrolne regije, medtem ko oligonukleotid 28RIBa prepozna nukleotidno zaporedje v genu za tRNA^{Phe}. Omenjen oligonukleotidni par omogoča pomnoževanje iste regije mtDNK pri mnogih vrstah vretenčarjev.

PCR se je začela s petminutno denaturacijo mtDNK pri 94 °C, ki ji je sledilo 32 ciklov z naslednjim časovno-temperaturnim profilom: 1 min pri 94 °C, 1 min pri 46 °C in 1 min pri 72 °C. Pomnoženo DNK smo sekvencirali ali analizirali z restrikcijskimi encimi. Analizo sekvenc smo opravili z računalniškim programom DNASIS (Pharmacia).

Biblioteko DNK smo pripravili iz 100 do 600 bp dolgih fragmentov genomske DNK, razrezane z restrikcijskim encimom *Sau3AI*, ki smo jih vnesli v vektor (pBluescript II SK; Stratagene), lineariziran z restrikcijskim encimom *BamHI*. Namnoževanje kloniranih insertov DNK je potekalo v celicah *E. coli* (Epicurian Coli[®] Supercompetent Cells; Stratagene). Biblioteko smo pregledali z oligonukleotidnima sondama (CA)_n in (GA)_n, pri čemer smo uporabljali kemiluminiscenčni detekcijski kit (Quick-Light[™] Genome Mapping Probe Kit; FMC) Fragmente DNK, ki so vsebovali ustrezne mikrosatelite, smo sekvencirali in na osnovi nukleotidnih zaporedij, ki so mikrosatelite obdajala, izbrali specifične pare oligonukleotidnih začetnikov.

Nukleotidno zaporedje pomnoženih fragmentov DNK smo ugotavljali po ustaljeni dideoksi metodi (Sanger in sod., 1977). Uporabljali smo kit (Taq DNA Sequencing Kit; Boehringer Mannheim) za neradioaktivno sekvenciranje eno- ali dvovijačne DNK z oligonukleotidnim začetnikom, označenim z digoksigeninom, in ciklično sekvenčno reakcijo. Sekvenčne reakcije smo pripravili natančno po navodilih proizvajalca. Uporabljali smo deaza-deoksinukleotide. Gelska elektroforeza in prenos sekvenčnih produktov na membrano sta potekala na napravi "Direct-Blotting-Electrophoresis GATC 1500 DNA-Sequencer" (GATC, Inc.). Uporabljali smo 4 % poliakrilamidni denaturacijski gel. Sekvenčne produkte na membrani smo obarvali z detekcijskim kitom (DIG Nucleic Acid Detection Kit; Boehringer Mannheim), katerega delovanje temelji na imunološkem prepoznavanju in encimski reakciji.

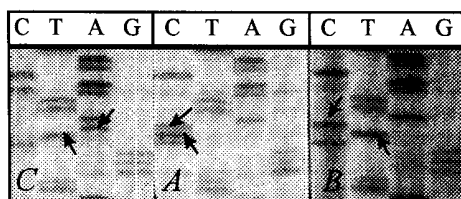
REZULTATI IN DISKUSIJA

Med analiziranimi populacijami postrvi smo na 330 bp dolgem delu kontrolne regije mtDNK odkrili tri variabilna nukleotidna mesta, ki so vključevala tri mutacijske dogodke: tranzicijo in transverzijo. Na tej osnovi smo našli štiri različne genotipe A, B, C in E (preglednica 1).

Preglednica 1. Polimorfna mesta in genotipi, oblikovani na osnovi opaženih mutacij
Table 1. Polymorphic sites and genotypes constructed according to the detected mutations

Polimorfna mesta/Polymorphic sites			
Genotipi/Genotypes			
A	G	C	C
B	G	C	T
C	G	A	T
E	C	A	T

Genotipa A in B (slika 1) sta bila značilna za avtohtono postrv, medtem ko so postrvi z atlantskim poreklom izražale genotip C (slika 1), genotip E pa ohridsko postrv. Genotipe A, B in C smo glede na razlike v restrikcijskih mestih medsebojno uspešno ločevali tudi z restrikcijsko analizo z encimoma *AvaI* in *SmaI*.

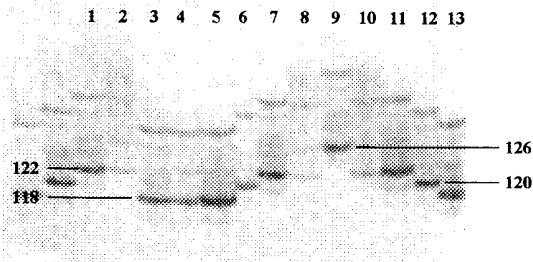


Slika 1. Genetski polimorfizem v delu kontrolne regije mtDNK pri geografsko različnih populacijah postrvi. Puščice kažejo mutacijska mesta, genotipi so označeni z velikimi kurzivnimi črkami.

Figure 1. Genetic polymorphism within a part of mtDNA control region found among geographically remote brown trout populations, revealing three different genotypes (italic letters). Arrows show mutation sites.

Izmed 22 mikrosatelitnih lokusov, kolikor smo jih našli v pričujoči raziskavi, se je kot genetski marker, primeren za razlikovanje med avtohtonimi in vnešenimi populacijami postrvi, pokazal lokus BFRO 002 (sekvenca je v podatkovni bazi "GenBank" dostopna pod šifro AF 005074). Zanj je značilno osrednje ponavljajoče se nukleotidno zaporedje s 14 do 26 dinukleotidi (TG) in obrobni nukleotidni regiji, ki omogočata pomnoževanje mikrosatelita v PCR (tri-minutna denaturacija pri 94 °C; 45 s pri 94 °C in 25 s pri 60 °C, 30 ciklov) z nukleotidnima začetnikoma 5'-ATG TTT TTG ACT GCA CTA TGT ATT-3' in 5'-GGA GAT AAG AGT CAA CGA GGC-3'. Za lokus BFRO 002 so značilni štiri aleli (118, 120, 122 in 126 bp; slika 2), ki specifično opredeljujejo atlantski (alel 126), donavski (alela 122 in 118) ter ohridski tip postrvi (alel 120).

Genotip C in alel 126 sta prevladovala v ribogojniških populacijah postrvi, poleg preostalih alelov pa smo ju našli še v Iški in Cerknici. Zaradi vlaganja ribogojniških postrvi v ti dve reki smo introgresijo atlantskega tipa v avtohtoni populaciji tu pričakovali. Za populacijo postrvi iz Mahnečice so bili značilni samo genetski markerji, specifični za donavski tip postrvi, kar kaže na to, da ta reka še ni kontaminirana z neavtohtonimi populacijami postrvi.



Slika 2. Locus BFRO 002 s štirimi aleli in petimi različnimi genotipi. Linije 1, 2, 7, 8, 9, 10 in 11: donavski tip postrvi; linije 3, 4, 5, in 13: atlantski tip postrvi; liniji 6 in 12: ohridska postrv. Dolžine alelov v bp so označene na robovih.

Figure 2. Locus BFRO 002 representing four alleles and five different genotypes. Lanes 1, 2, 7, 8, 9, 10, and 11: Danubian brown trout; lanes 3, 4, 5 and 13: Atlantic brown trout; lanes 6 and 12: Ohrid brown trout. Allele sizes in bp are indicated on the margins.

Avtohtoni in vnešeni tip postrvi se med seboj tudi fenotipsko jasno razlikujeta. Najbolj očitno se ločita po obarvanosti. Ribogojniška oz. atlantska postrv v večini primerov nima rdečih pik, lahko pa se v majhnem številu pojavljajo po bokih pod pobočnico. Hrbet in boke ima srebrno-rjavo-sive barve in gosto posejane s črnimi pegami. Za slovenski avtohtoni oz. donavski tip postrvi so značilne izrazite rdeče pike, enakomerno razporejene nad in pod pobočnico, črne, ki prevladujejo na hrbtu, ter rumenkasto-zeleno-rjav hrbet in boki. Oba fenotipa se v svojih osnovnih potezah ohranjata tako v ribogojniškem kot v naravnem okolju. Genotipi mikrosatelitnega lokusa BFRO 002, opredeljeni z geografskim izvorom določene populacije postrvi, sovpadajo s fenotipskimi značilnostmi te populacije. Heterozigotne živali z aleloma geografsko različnih populacij (118 in 122/126) večinoma kažejo vmesni fenotip, ki pa ne prihaja vedno do izraza. Vmesni fenotip križancev in neobčutljivost osnovnih fenotipskih znakov za okoliške vplive kažeta, da so značilnosti, ki pogojujejo donavski oz. atlantski tip postrvi, genetsko pogojene. Mitohondrijski genotipi A, B in C odražajo značilen fenotip manj dosledno kot mikrosatelitni lokus BFRO 002. Vzrok temu je maternalno dedovanje mtDNK, ki ne zagotavlja zanesljivega opredeljevanja genetsko čistih populacij, omogoča pa zasledovanje porekla živali daleč v preteklost.

Na osnovi rezultatov naše raziskave ugotavljamo, da je slovenska avtohtona postrv na območjih, kjer vlagajo ribogojniško postrv, ogrožena. V nevarnosti je tako njena genetska kot tudi fenotipska prvobitnost. Mnenja smo, da je potrebno takoj prenehati z vsakršnim vlaganjem postrvi atlantskega porekla v slovenske vode in le-to nadomestiti z vlaganjem potomstva plemenk donavskega tipa, katerih izvor bi bil preverjen vsaj z genetskimi markerji, ki jih predstavljamo v tem prispevku. Nadalje bi bilo potrebno razviti še dodatne genetske markerje in jih analizirati na čim večjem številu geografsko različnih populacij avtohtone postrvi, s čimer bi povečali zanesljivost genetskih testov.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem Petru Dovču za pomoč pri delu in za tehtne pripombe pri končnem oblikovanju prispevka.

VIRI

- Apostolidis, A./ Karakousis, Y./ Ryantaphyllidis, C. Genetic divergence and phylogenetic relationships among *Salmo trutta* L. (brown trout) populations from Greece and other European countries. *Heredity*, 76(1996), s. 551-560.
- Behnke, R.J. Brown Trout. *Trout*, 27(1986), s. 42-47.
- Bernatchez, L./ Guyomard, R./ Bonhomme, F. DNA variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Mol. Ecol.*, 1(1992), s. 161-173.
- Dovč, P./ Hecht, W. Molecular analysis of the D-loop of caprine mitochondrial DNA. V: *Animal Genetics*, 25(1994), s. 30, Proceedings of the 24th ISAG Conference, Prague, 1994-07-23/29.
- Garcia-Marin, J.L./ Jorde, P.E./ Ryman, N./ Utter, F./ Pla, C. Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture*, 95(1991), s. 235-249.
- Giuffra, E./ Bernatchez, L./ Guyomard, R. Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Mol. Ecol.*, 3(1994), s. 161-171.
- Giuffra, E./ Guyomard, R./ Forneris, G. Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian brown trout (*Salmo trutta* L. complex). *Mol. Ecol.*, 5(1996), s. 207-220.
- Guyomard, R./ Krieg, F. Electrophoretic variation in six populations of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Can. J. Genet. Cytol.*, 25(1983), s. 403-413.
- Harrison, R.G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.*, 4(1989), s. 6-11.
- Hindar, K./ Jonsson, B./ Ryman, N./ Ståhl, G. Genetic relationship among landlocked, resident, and anadromous Brown trout, *Salmo trutta*. *Heredity*, 66(1991), s. 83-91.
- Krieg, F./ Guyomard, R. Electrophoretic evidence for large differentiation between trout populations in Corsica. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 296(1983), s. 1089-1093.
- Krieg, F./ Guyomard, R. Population genetics of French brown trout (*Salmo trutta* L.): large geographical differentiation of wild populations and high similarity of domesticated stocks. *Génét. Sélect. Evol.*, 17(1985), s. 225-242.
- Largiadčr, C.R./ Scholl, A. Genetic introgression between native and introduced brown trout *Salmo trutta* L. populations in the Rhône river basin. *Mol. Ecol.*, 5(1996), s. 417-426.
- Medrano, F.J./ Aasen, E./ Sharrow, L. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*, 8(1990), s. 43.
- Queller, D.C./ Strassmann, J.E./ Hughes, C.R. Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.*, 8(1993), s. 258-288.
- Sanger, F./ Nicklen, S./ Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(1977), s. 5463-5467.