

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE  
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA



# ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA PriF UK 2021

ZBORNÍK RECENZOVANÝCH PRÍSPEVKOV



**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE  
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**



**ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ  
KONFERENCIA PriF UK 2021**

Zborník recenzovaných príspevkov

21. Apríl 2021  
Bratislava, Slovenská republika  
Univerzita Komenského v Bratislave  
ISBN 978-80-223-5132-4

# Z východu na západ a späť: Fylogeografia slepúcha *Anguis colchica*

Adam Javorčík, Daniel Jablonski

Univerzita Komenského v Bratislavе, Prírodovedecká fakulta, Katedra zoologie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; [javorcik.adam@gmail.com](mailto:javorcik.adam@gmail.com)

## Abstract

From the east to west and back: Phylogeography of *Anguis colchica*

Slow worms (*Anguis* spp.) survived global climate oscillations during the Quaternary in the refuges, from where they have colonized areas with a favorable climate during interglacials. The Eastern Slow Worm (*A. colchica*) is the only polytypic representative of the genus with four main phylogenetic lines: *Incorta*, *Colchica*, *Pontica* and *Orientalis*. The so far largest dataset of mitochondrial and nuclear markers comprising 234 individuals from 184 localities were analyzed in this study in order to investigate phylogenetic diversity within this species. *Orientalis* is the basal line of a concatenated phylogenetic tree, located in the region below the Caspian Sea. The Glacial refugia of the *Colchica* line probably lay in the western part of the Caucasus and in northeastern Turkey. We can assume that the center of species radiation was in the current Caucasian or south Caspian region, from where it expanded through Anatolia to Europe. Postglacial colonization of the *Incorta* clade took place probably in the Carpathians and colonized wide area of Eurasia.

**Keywords:** *Anguidae*; Western Palearctic; genetic diversity; biogeography

## Úvod a formulácia cieľa

Slepúch východný (*Anguis colchica*), vykazuje vysokú vnútrodruhovú diverzitu a ako jediný z rodu *Anguis*, je polytypický. V celom areáli jeho výskytu, rozprestierajúcom sa na značnej časti západného Palearktu, sú známe štyri hlavné evolučné línie, z ktorých tri dnes nesú taxonomický status poddruhu. Sú to *A. c. colchica* vyskytujúci sa na Kaukaze, *A. c. incerta* s najrozšiahlejším Euroázijským areálom, *A. c. orientalis* vyskytujúci sa južne od Kaspického mora a línia zvaná „Pontická“, ktorá sa vyskytuje v oblasti Anatólie a severného Turecka [1].

Kvôli nedostatočnému vzorkovaniu v minulosti, vieme o fylogeografii tohto druhu mimo oblasť Balkánskeho polostrova veľmi málo. Nejasné sú taktiež poznatky z významných centier diverzity ako je severný Irán, Anatolia, či Kaukaz. Taktiež nie je známa genetická afinita populácií v kontinentálnom Rusku. Pomocou analýz mitochondriálnej a jadrovej DNA sme sa pokúsili zodpovedať tieto otázky a podať čo najkomplexnejší prehľad o fylogenéze a fylogeografii tohto druhu.

## Materiál a metódy

Ako zdroj DNA boli požité vzorky získané odberom krvi od živých zvierat, alebo odberom svalstva z mŕtvych zvierat (napr. usmrtené na cestách). Vzorky boli uložené v 96% etanole. DNA bola extrahovaná podľa protokolu dodávaného ku komerčnému kitu E.Z.N.A.

Tissue DNA Kit (Omega biotek, Norcross, GA, USA). DNA sme amplifikovali pomocou PCR (Tab. 1). Pre genetické analýzy boli použité nasledujúce gény: ND2, C-mos, BDNF, PRLR.

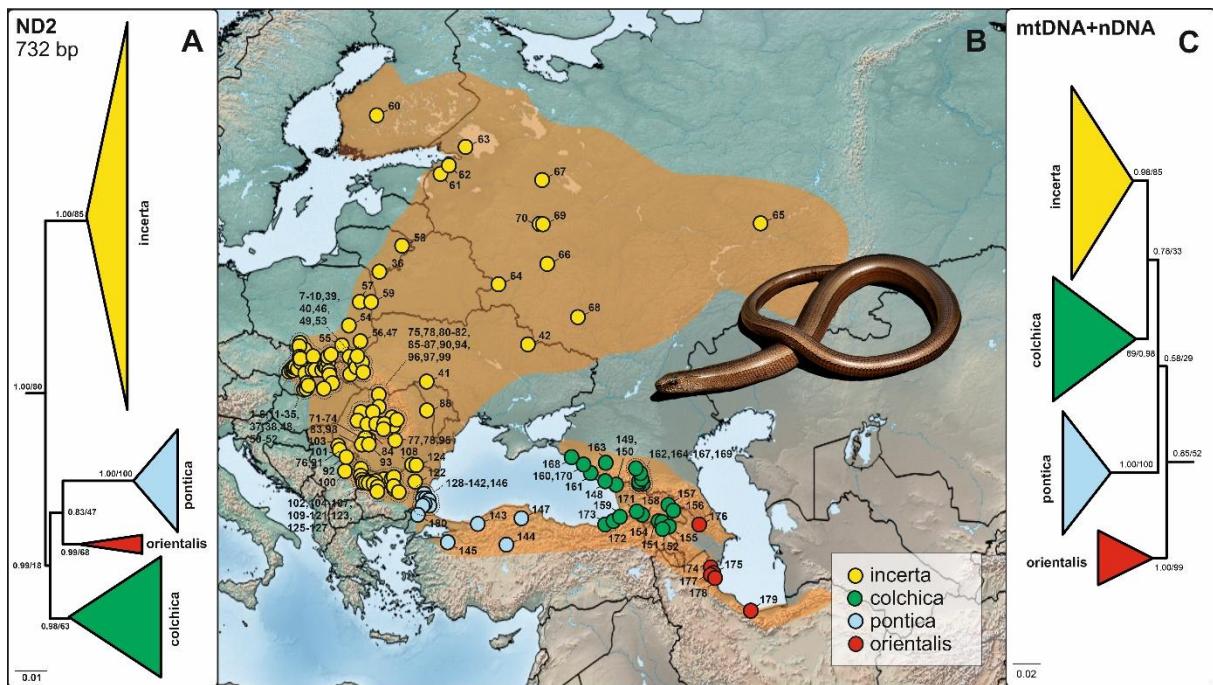
**Tab. 1. PCR profil pre jednotlivé gény**

Kroky	ND2		C-mos		BDNF		PRLR	
	Teplota	Čas	Teplota	Čas	Teplota	Čas	Teplota	Čas
1. Počiatočná denaturácia	94 °C	2 min.	94 °C	7 min.	94 °C	5 min.	94 °C	5 min.
2. Denaturácia	94 °C	35 sek.	94 °C	40 sek.	94 °C	20 sek.	94 °C	40 sek.
3. Anelácia	50 °C	35 sek.	48 °C	30 sek.	51 °C	45 sek.	54,5 °C	30 sek.
4. Polymerizácia	72 °C	1 min.	72 °C	1 min.	72 °C	20 sek.	72 °C	1 min.
5. Polymerizácia	72 °C	10 min.	72 °C	7 min.	72 °C	10 min.	72 °C	5 min.
Opakovane	35x		40x		39x		40x	

Do datasetu boli zahrnuté aj sekvencie získané z databázy GenBank. Celkový dataset obsahoval 234 sekvencií génu ND2 (732bp) zo 184 lokalít, 35 sekvencií génu C-mos (550bp) z 26 lokalít, 25 sekvencií génu BDNF (669bp) z 23 lokalít a 55 sekvencií génu PRLR (554bp) z 33 lokalít. Sekvencie sme spracovali v BioEdit. Výber najvhodnejších substitučných modelov prebehol v programe PartitionFinder. Fylogenetické stromy boli počítané pomocou Bayesovského prístupu (BA) a maximálnej pravdepodobnosti (ML). Haplotypové siete boli robené v programe TCS a PHASE. Mapové výstupy boli spracované v programoch QGIS a Inkscape.

## Výsledky a diskusia

Na základe analýz konkatenovaného datasetu (mtDNA + nDNA) zahŕňajúceho 17 jedincov, sme zhovili fylogenetický strom, ktorého štyri zretelne oddelené klastre potvrdzujú predchádzajúce fylogenetické hypotézy [1]. Línia Orientalis s podporou 1.00/99 je bazálna a sesterská ku všetkým ostatným (Obr. 1C). Najvyššiu genetickú diverzitu môžeme pozorovať v oblasti Kaukazu, Anatolie a severného Iránu. Na základe konkatenovaného fylogenetického stromu môžeme za centrum šírenia druhu *Anguis colchica* považovať oblasť Kaukazu alebo juh kaspického regiónu, odkiaľ sa šíril cez Anatoliu do Európy. V období pleistocénu našiel refúgiá v oblasti Karpát, odkiaľ následne kolonizoval oblasti strednej a východnej Európy. Topológia konkatenovaného stromu a ND2 stromu sa v našej práci líši. Na strome zostrojenom na základe mitochondriálneho génu ND2 je bazálna línia Incerta (1.00/80) (Obr. 1A). Jediná línia bez taxonomickej zaradenia (Pontica), má pri konkatenovanom aj mitochondriálnom strome úplnú podporu (1.00/100). Samostatné línie sú v oboch analýzach dobre podporené, avšak hlbšie divergencie medzi líniemi sú podporené slabo. Geografickú distribúciu jednotlivých línií na základe mitochondriálneho génu ND2 môžeme vidieť na Obrázku 1B.



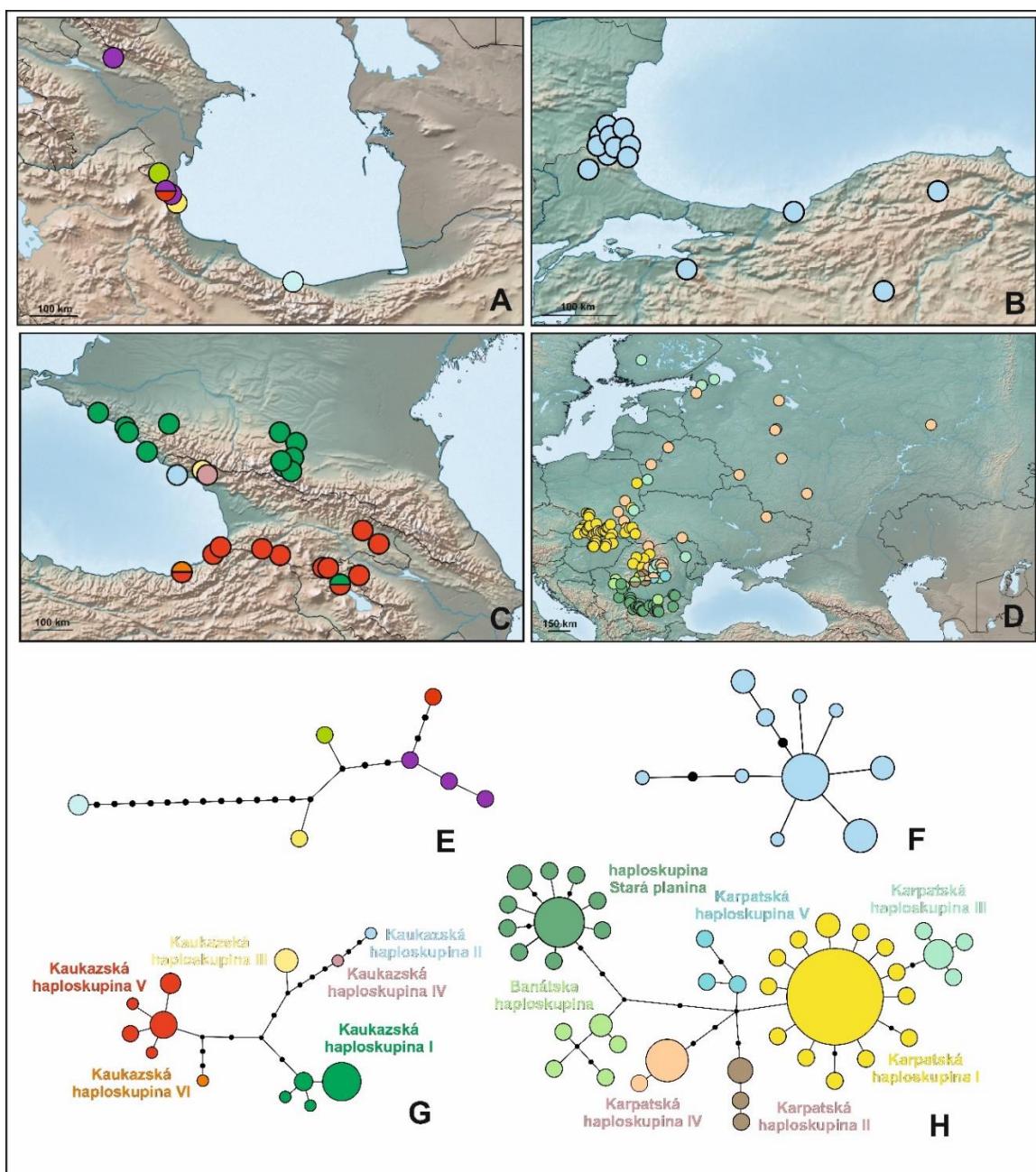
**Obr. 1. (A) Fylogenetický strom na základe fragmentu mtDNA (ND2), (B) geografická distribúcia jednotlivých línií (ND2) (C) konkatenovaný fylogenetický strom (mtDNA + nDNA).**

U línie Orientalis pozorujeme vysokú genetickú diverzitu v oblasti pohoria Talysh, na východe Azerbajdžánu (Obr. 2A), ktoré je považované za refúgium [2]. Teplé obdobie interglaciálu po prvom glaciálnom maxime v období spodného pleistocénu, pravdepodobne prispelo k expanzii fauny po severných svahoch smerom k západnému Alborzu a taktiež k horám južného Azerbajdžanu [3]. Haplotyp z pohoria Alborz v Iráne je značne geneticky vzdialený (Obr. 2E). Toto pohorie a južné pobrežie Kaspického mora sú viacerými autormi považované za refúgiá [4,5] a taktiež sa celá oblasť Hyrcanie javí ako radiačné centrum s množstvom mikrorefúgií [6].

Línia Pontica vykazuje najnižšiu haplotypovú diverzitu. Haplotypy tejto línie, predtým známej iba z pohoria Stradža [1], sme detekovali aj v oblasti severného Turecka (Obr. 2B). V pohorí Stradža leží pravdepodobne refúgium ako nám naznačuje star-like štruktúra haplotypovej siete (Obr. 2F). Jedná sa o jedinú ázijskú líniu zasahujúcu až na Balkánsky polostrov.

Línia Colchica vykazuje druhú najvyššiu haplotypovú diverzitu (Obr. 2G). Táto línia bola detekovaná východne od Čierneho mora na lokalitách v Rusku, Abcházku, Arménsku a na východe Turecka (Obr. 2C). Najvyššiu haplotypovú diverzitu môžeme pozorovať na severozápade Abcházka v oblasti Veľkého Kaukazu, kde sme detekovali Kaukázskú haploskupinu II, III, IV. Vysoká diverzita haplotypov v tejto oblasti pravdepodobne indikuje

jedno z refúgií tejto línie. Kaukazská haploskupina VI sa v oblasti Rize vyskytuje spolu s Kaukazskou haploskupinou V, ktorá je ďalej rozšírená vo východnom Gruzínsku a v pohorí Malý Kaukaz. Jedná sa pravdepodobne o rôzne historické refúgiá. V prospech tejto hypotézy hovorí fakt, že Kaukazská haploskupina V tvorí star-like vzor a centrálny haplotyp zahŕňa aj vzorky z lokality Rize.



**Obr. 2.** (A) Geografická distribúcia línie *Orientalis*, (B) geografická distribúcia línie *Pontica*, (C) geografická distribúcia línie *Colchica*, (D) geografická distribúcia línie *Incerta*, (E) haplotypová sieť línie *Orientalis* (ND2), (F) haplotypová sieť línie *Pontica* (ND2), (G) haplotypová sieť línie *Colchica* (ND2), (H) haplotypová sieť línie *Incerta* (ND2).

Fauna v pohoriach Malého a Veľkého Kaukazu sa začala fragmentovať počas zaľadnení v období skorého a stredného pliocénu. Hlavným centrom šírenia druhu *Anguis colchica* bola Colchická oblasť s relatívne teplomilnou vegetáciou, ktorá sa udržala aj v najchladnejšom období. Refúgiá v tejto oblasti ležali v úzkych vlhkých roklinách s relatívne konštantnou klímou [7].

Línia Incerta má najväčší areál výskytu (Obr. 2D). Južnú hranicu areálu línie Incerta tvorí línia Stará Planina, nachádzajúca sa v oblasti južných Karpát v Bulharsku a vo východnom Srbsku. Vysokú haplotypovú diverzitu môžeme vidieť v oblasti južných Karpát (Banátska haploskupina a Karpatské haploskupiny II, I) kde lokalizujeme pravdepodobne jedno z refúgií. Odtiaľ jedince Karpatskej haploskupiny I zasahujú cez Ukrajinu až na naše územie, do Čiech, Poľska a Maďarska. Významnými migračnými trasami sa javí vonkajší oblúk Karpát a územie Panónskej nížiny [8]. Na základe rozsiahleho datasetu sme zistili že Karpatská haploskupina IV sa šíri až do západného Ruska a Karpatská haploskupina III až do Fínska. Nami novozistená Karpatská haploskupina V, zastúpená tromi haplotypmi, sa vyskytuje spolu s haplotypmi Karpatskej haploskupiny III a IV v oblasti Južných Karpát, kde na základe vysokej diverzity môžeme predpokladať východnejšie ležiace mimo-mediteránne Karpatské refúgium. V oblasti Karpát môžeme pozorovať hned' niekoľko oblastí s vysokou haplotypovou diverzitou, ktoré nám naznačujú pozíciu historických refúgií. Oblasti strednej a východnej Európy boli kolonizované z Karpát, podobne ako u *Zootoca vivipara* alebo *Vipera berus* [9,10]. Taktiež sa však slepúchy odtiaľto šírili aj na juh, ako vidíme na príklade Banátskej haploskupiny [1].

## Záver

Pomocou genetických analýz, boli v predchádzajúcich štúdiách u druhu *Anguis colchica* detekované štyri evolučné línie: Incerta, Colchica, Orientalis a Pontica. Celkový dataset spracovaný v tejto práci obsahoval 234 sekvencii zo 184 lokalít, z ktorých 127 bolo novo sekvenovaných a 107 predtým publikovaných. Na oboch nami vytvorených fylogenetických stromoch všetky línie vykazujú vysokú hodnotu bootstrapovej podpory pre maximálnu vierošnosť (ML) aj hodnoty vyjadrujúcej Bayesovskú posteriornu pravdepodobnosť (BI). Ich vzájomné postavenie však zostáva nevyriešené, nakoľko bazálnejšie divergencie vo fylogenetických stromoch nie sú dostatočne podporené. Analýzy mitochondriálnej DNA a konkatenového datasetu, v kontexte existencie niekoľkých poddruhov naznačujú, že v budúcnosti nemôžeme vylúčiť taxonomicke prehodnotenie vnútri *A. colchica*. Vďaka výrazne väčšiemu datasetu, ktorý sme mali k dispozícii oproti predchádzajúcim štúdiám, sme mohli zmapovať geografickú distribúciu haplotypov v oblasti severnej

a východnej Európy a detektovať novú haploskupinu v oblasti Karpát (Karpatská haploskupina V). Dáta jasne ukazujú, že kolonizácia rozsiahlych území druhom *A. colchica* v Európe, išla z juhokarpatských mimo-mediteránnych refúgií. Refúgium Banátskej haploskupiny leží pravdepodobne v oblasti južných Karpát. Karpatská haploskupina III sa dostala až do Fínska, zatiaľ čo rozsiahle oblasti východnej Európy kolonizovala Karpatská haploskupina IV.

### Zoznam použitej literatúry

- [1] Jablonski D., Jandzik D., Mikulíček P., et al. (2016) BMC Evol. Biol. 16, p. 99
- [2] Wielstra B., Crnobrnja-Isailović J., Litvinchuk S. N., et al. (2013) Front. Zool. 10, p. 13
- [3] Asadi, A., Montgelard C., Nazarizadeh M., et al.. (2019) Sci. Rep-UK. 9, p. 1224
- [4] Veith M., Schmidtler J., Kosuch J., et al. (2003) Mol. Ecol. 12, p. 185
- [5] Tarkhnishvili D. (2012) Adv. Ecol. Res. 2, p. 79
- [6] Gegechkori A., Didmanidze E. (2015) Am. J. Environ. Prot. 4, p. 82
- [7] Tuniyev B. S. (1990) Asian Herpetol. Res. 3, p. 67
- [8] Joger U., Fritz U., Guicking D., et al. (2010) Relict populations and endemic clades in palearctic reptiles: evolutionary history and implications for conservation. In: Habel J.C., Assmann T. (ed.) RelictSpecies: Phylogeography and Conservation Biology. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Nemecko, p. 119
- [9] Horreo J. L., Pelaez M. L., Suárez T., et al. (2018) J. Biogeogr. 45(7), p. 1616
- [10] Ursenbacher S., Carlsson M., Helfer V., et al. (2006) Mol. Ecol. 15(11), p. 3425

**Študentská vedecká konferencia 2021  
Zborník recenzovaných príspevkov**

Dátum a miesto konania: 21. apríl 2021  
Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta  
MS TEAMS

Editori: RNDr. Eva Viglašová, PhD.  
RNDr. Mária Chovancová, PhD.  
Mgr. Táňa Sebechlebská, PhD.  
Mgr. Dagmara Gajanová

Recenzenti: Členovia odborného výboru

Grafická úprava: RNDr. Eva Viglašová

Vydanie: prvé

Náklad: 400ks

Rozsah strán: 1035

ISBN: 978-80-223-5132-4



ISBN 978-80-223-5132-4