



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina
veterinarska medicina

UDK 598.125.2:636.082.45/.47:543.64:577.175.6:57.088.7(043.3)

mag. Mateja Stvarnik, dr. vet. med.

**NEKATERI REPRODUKCIJSKI IN POPULACIJSKI
PARAMETRI PRI GRŠKI KORNJAČI
(*TESTUDO HERMANNI*) V UJETNIŠTVU**

Doktorska disertacija

**SOME REPRODUCTIVE AND POPULATION
PARAMETERS IN THE HERMANN'S TORTOISE
(*TESTUDO HERMANNI*)
IN CAPTIVITY**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2020

Mateja Stvarnik

Nekateri reprodukcijski in populacijski parametri pri grški kornjači (*Testudo hermanni*) v ujetništvu

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete v Ljubljani, na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje Veterinarske fakultete v Ljubljani, na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete v Ljubljani in v laboratoriju Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete v Ljubljani, na farmi želv v Vodicah ter na terenu po različnih krajih Sloveniji (Ljubljana, Seča) in izven nje: Hrvaška, Srbija, Črna gora.

Javni zagovor je bil opravljen: _____

Mentorica: prof. dr. Alenka Dovč

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Joško Račnik (VF)

Članica: izr. prof. dr. Ksenija Šinigoj Gačnik (VF)

Članica: izr. prof. dr. Simona Sušnik Bajec (BF, Oddelek za zootehniko)



Vir: Lana Stvarnik (»Panter«, barvni linorez, 2019)

"Be not afraid of going slowly, be afraid only of standing still."

Kitajski pregovor

IZVLEČEK

Ključne besede:

želve – fiziologija; reprodukcija – genetika, steroidni hormoni spolnih žlez – analize; jajca – kemija; feces – analize; encimsko vezani imunosorbentni test; mitohondrijska DNA – genetika; filogeografija; analiza zaporedja DNA

Skozi triletni monitoring smo v aktivni reprodukcijski sezoni preučevali samice grške kornjače (*Testudo hermanni boettgeri*). Samci so bili prisotni prvo leto, do prvega parjenja. Spremljali smo odstotek izleganja jajc pri samicah v posameznem letu in v posameznem gnezdu. Jajca smo individualno sledili do izvalitve. Po končani inkubaciji smo pregledali valilniški ostanek. Ocenili smo naslednje parametre: oplojenost in vzroke zamiranja kot so inficiranost in dehidriranost. Ugotovili smo, da se ob odsotnosti samcev vsako leto zmanjšuje tako število jajc kot število gnezd na samico.

Proučevali smo kemijsko sestavo jajc grške kornjače. Oleinska kislina je predstavljala več kot polovico maščobno kislinske sestave v rumenjaku. V beljaku smo med 18 različnimi aminokislinami ugotavliali največ glutaminske in asparaginske kisline. Med elementi v sledeh smo v lupini, beljaku in rumenjaku izmerili najvišje koncentracije železa.

Pri grških kornjačah obeh spolov in različne starosti smo v iztrebkih s postopkom ELISA ugotavliali koncentracije progesterona, estradiola in testosterona v iztrebkih (neinvaziven način vzorčenja). Pri spolno aktivnih kornjačah se ta metoda lahko uporablja za dokazovanje aktivnosti reproduktivnih organov pri obeh spolih na podlagi dinamike hormonov. Ugotovili smo, da se le v obdobju izleganja jajc na podlagi nivoja med posameznimi hormoni v iztrebkih odrasle kornjače lahko določi spol.

Z genetsko analizo smo kljub omejenemu obsegu biološkega materiala pokazali, da tako na ravni mitohondrijske, kot tudi jedrne DNK, genetska pestrost omogoča identifikacijo genetske strukturirnosti populacij, ki so bile vključene v našo raziskavo. V analizi 188 vzorcev grške kornjače s petih različnih geografskih lokacij v Sloveniji, Hrvaški, Srbiji, Črni gori in Italiji smo našli tri mitohondrijske haplotipe, ki se med seboj razlikujejo na treh nukleotidnih pozicijah znotraj gena za 12S rRNK. Našli smo tudi osebke s heteroplazmijo mtDNK.

Genotipizacijo jedrne DNK smo izvedli na 10 mikrosatelitnih lokusih: Test56, Test76, Test21, GmuA19, Leo21, GmuD51, Test71, Leo56, Leo71 in GmuB08. Na osnovi rezultatov analize mikrosatelitnih lokusov smo proučevane populacije lahko razdelili v gruče, ki se ujemajo z geografskim izvorom vzorcev. Za odgovor na vprašanje ali je spol pri *Testudo hermanni* determiniran z genetskimi dejavniki, smo sekvensirali celoten genom petih spolno zrelih samcev in petih spolno zrelih samic. Analiza celotnega genomskega nukleotidnega zaporedja ne potrjuje obstoja spolnih kromosomov in ne nakazuje večjih strukturnih sprememb v avtosomalnih genomskeh regijah, ki so bile pri drugih vrstah dvoživk in plazilcev povezane z diferenciacijo spola.

ABSTRACT

Key words:

turtles – physiology; reproduction – genetics; gonadal steroid hormones – analysis, eggs – chemistry; faeces – analysis; enzyme-linked immunosorbent assay; mitochondrial DNA – genetics; phylogeography; sequence analysis, DNA

Throughout three years of monitoring, female Hermann's tortoises (*Testudo hermanni boettgeri*) were observed during the active reproductive season. Males were present in the first year until the first mating. The percentage of females who laid eggs in each year and in each nest was observed. The eggs were individually tracked until hatching. After incubation, the eggshell mortality was analysed. We assessed the following parameters: fertilization and causes of death, such as infection and dehydration. We concluded that due to the absence of males, both the number of eggs and the number of nests per female decrease each year.

The chemical composition of the Hermann's tortoise eggs was studied. Oleic acid presented more than half of the total fatty acid composition in the yolk. In the egg albumen, among the 18 different amino acids that were detected, glutamic acid and aspartic acid were the most common. The highest concentrations of the trace elements measured in the shell, albumen and yolk were iron.

In Hermann's tortoise, ELISA was used to analyse the hormone concentrations of progesterone, oestradiol and testosterone in the faeces (non-invasive sampling) of both genders and of different ages. This method can be used in sexually active tortoises in both genders to determine the activity of gonads based on hormone dynamics. In our research, we concluded that only in the egg laying period, based on the ratio of individual hormone levels in adult tortoise faeces, can gender be determined.

Despite the limited volume of biological material, genetic analysis showed that at the level of mitochondrial as well as nuclear DNA, the detected genetic diversity enabled identification of the genetic structure of the populations included in our study. In the analysis of 188 samples of Hermann's tortoise from five different geographical locations in Slovenia, Croatia, Serbia, Montenegro and Italy, we found three mitochondrial haplotypes that differ from each other at three nucleotide positions within the 12S rRNA gene.

We also found specimens demonstrating mtDNA heteroplasmy. Nuclear DNA genotyping was performed at 10 microsatellite loci: Test56, Test76, Test21, GmuA19, Leo21, GmuD51, Test71, Leo56, Leo71 and GmuB08. Based on the results of microsatellite analysis, the studied populations could be divided into clusters that matched the geographical origin of the samples. To answer the question of genetic determination of sex in *Testudo hermanni*, we sequenced the entire genome of five sexually mature males and five sexually mature females. Analysis of the entire genomic nucleotide sequence did not support the existence of sex chromosomes in this species and did not indicate major structural variation in the autosomal genomic regions that have been associated with gender differentiation in other amphibian and reptile species.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	5
ABSTRACT	7
1 UVOD	21
1.1 NAMEN DELA	23
1.2 HIPOTEZE.....	23
2 PREGLED LITERATURE	25
2.1 MORFOLOŠKE IN FIZIOLOŠKE ZNAČILNOSTI GRŠKE KORNJAČE	25
2.1.1 Podvrste grške kornjače	26
2.1.2 Reprodukcija želv.....	28
2.2 JAJCA ŽELV	34
2.3 HORMONALNA URAVNAVA REPRODUKCIJE PRI ŽELVAH.....	37
2.3.1 Neinvazivne metode merjenja spolnih hormonov.....	37
2.3.2 Metode merjenja spolnih hormonov pri želvah	38
2.4 GENETSKI PRISTOP K PROUČEVANJU POPULACIJ GRŠKE KORNJAČE.....	41
2.4.1 Populacijska genetika.....	41
2.4.2 Uporaba mitohondrijske DNK in mikrosatelitov pri želvah	42
3 MATERIAL IN METODE	46
3.1 REPRODUKCIJA GRŠKIH KORNJAČ V VZREJI	46
3.1.1 Osnovni pogoji reje	46
3.1.2 Delo na farmi.....	46
3.1.3 Merjenje in hramba izvaljenih jajc.....	47
3.1.4 Pregled neizvaljenih jajc (valilniški ostanek)	48
3.2 KEMIJSKA SESTAVA ŽELVJIH JAJC.....	49
3.2.1 Opazovana skupina samic	49
3.2.2 Odvzem jajc in delo v laboratoriju.....	49
3.3 SPOLNI HORMONI IN NJIHOVI METABOLITI V IZTREBKIH ŽELV	52
3.3.1 Vzorčenje iztrebkov	52
3.3.2 Postopek ekstrakcije spolnih hormonov in njihovih metabolitov	52
3.3.3 Izvedba encimsko-imunskega postopka (ELISA).....	53
3.3.4 Merjenje vsebnosti hormonov v iztrebkih.....	54

3.4 GENETSKE ANALIZE	55
3.4.1 Mikrosateliti.....	56
3.4.2 Analiza mitohondrijske DNK	57
3.4.3 Sekvenciranje genoma grške kornjače.....	58
4 REZULTATI	60
4.1 REPRODUKCIJA GRŠKIH KORNJAČ V VZREJI.....	60
4.1.1 Izleganje jajc	60
4.1.2 Meritve jajc	64
4.1.3 Umetna inkubacija in valilniški ostanek – prvo leto	66
4.1.4 Umetna inkubacija in valilniški ostanek – drugo leto	66
4.1.5 Umetna inkubacija in valilniški ostanek – tretje leto.....	66
4.2 KEMIJSKA SESTAVA ŽELVJIH JAJC	70
4.3 SPOLNI HORMONI IN NJIHOVI METABOLITI V IZTREBKIH ŽELV.....	74
4.3.1 Progesteron	74
4.3.2 Estradiol.....	84
4.3.3 Testosteron.....	88
4.4 GENETSKE ANALIZE	93
4.4.1 Mikrosateliti.....	93
4.4.2 Analiza mitohondrijske DNK	98
4.4.3 Sekvenciranje genoma grške kornjače.....	104
5 RAZPRAVA	110
5.1 REPRODUKCIJA GRŠKIH KORNJAČ V VZREJI.....	110
5.1.1 Izleganje jajc	110
5.1.2 Velikost in oblika jajc	113
5.1.3 Inkubacija jajc.....	114
5.2 KEMIJSKA SESTAVA ŽELVJIH JAJC	116
5.3 SPOLNI HORMONI IN NJIHOVI METABOLITI V IZTREBKIH ŽELV.....	121
5.3.1 Progesteron	122
5.3.2 Estradiol.....	123
5.3.3 Testosteron.....	124

5.4 GENETSKA ANALIZA	126
5.4.1 Analiza mitohondrijske DNK	126
5.4.2 Mikrosateliti	129
5.4.3 Sekvenciranje genoma grške kornjače	130
6 ZAKLJUČKI	132
7 POVZETEK.....	134
8 SUMMARY	138
9 ZAHVALE	142
10 LITERATURA	143

KAZALO SLIK

Slika 1:	Kavdalni pogled samca <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	25
Slika 2:	Kavdalni pogled samice <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	25
Slika 3:	Ventalni pogled samca <i>Testudo hermanni hermanni</i>	27
Slika 4:	Ventralni pogled samice <i>Testudo hermanni hermanni</i>	27
Slika 5:	Ventralni pogled samca <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	28
Slika 6:	Ventralni pogled samice <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	28
Slika 7:	Obdobje parjenja.....	29
Slika 8:	Parjenje.	29
Slika 9:	Izleganje jajc.	32
Slika 10:	Poravnavanje lege jajc v gnezdu.....	32
Slika 11:	Diagram zgradbe plazilskega jajca.....	35
Slika 12:	Diagram strukture jajca plazilcev takoj po depoziciji.....	36
Slika 13:	Grška kornjača v naravnem okolju.	38
Slika 14:	Shematski oris dveh tipov spolnega cikla želv osnovan na gametogenezi in parjenju.	39
Slika 15:	Ločitev vrst in podvrst znotraj populacije mediteranskih želv na osnovi 12S rRNK.	43
Slika 16:	Farma želv.....	46
Slika 17:	Terariji.....	46
Slika 18:	Merjenje velikost jajca s kljunastim merilom.	47
Slika 19:	Označena jajca na verzikulitu.....	47
Slika 20:	Jajce grške kornjače.	50
Slika 21:	395 bp dolg fragment 12S rRNK, DQ080046.1.	58
Slika 22:	Primerjava telesne mase želve in števila jajca na gnezdo za obdobje treh let.....	60
Slika 23:	Izkopavanje gnezda.....	62
Slika 24:	Jajca v gnezdu.	62
Slika 25:	Izleganje in urejanje jajc v gnezdu.....	62
Slika 26:	Jajca v inkubatorju.	63
Slika 27:	Izleganje.....	63
Slika 28:	Novo izlegle kornjače.	63
Slika 29:	Preboj lupine.	63
Slika 30:	Primerjava telesne mase želv in povprečja njihove mase jajc v prvem letu.	65
Slika 31:	Neoplojeno in izsušeno jajce.....	67
Slika 32:	Inficirano neoplojeno jajce.....	67
Slika 33:	Inficirano jajce.	67
Slika 34:	Inficirano oplojeno jajce.	67

Slika 35:	Zgodnja stopnja razvoja.....	68
Slika 36:	Zgodnja stopnja razvoja, izsušen.....	68
Slika 37:	Srednja stopnja razvoja, izsušen.	68
Slika 38:	Srednja stopnja razvoja, inficiran.....	68
Slika 39:	Pozna stopnja razvoja, izsušen.	69
Slika 40:	Pozna stopnja razvoja, inficiran.....	69
Slika 41:	Nivo progesterona pri samicah.	75
Slika 42:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri samici številka 1.....	75
Slika 43:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri samici številka 2.....	76
Slika 44:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri samici številka 3.....	76
Slika 45:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri samici številka 4.....	77
Slika 46:	Nivo progesterona pri odraslih samcih.	78
Slika 47:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri odraslem samcu številka 1.	79
Slika 48:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri odraslem samcu številka 2.	79
Slika 49:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri odraslem samcu številka 3.	80
Slika 50:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri odraslem samcu številka 4.	80
Slika 51:	Nivo progesterona pri mladih samcih.	82
Slika 52:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri mlademu samcu številka 1.	82
Slika 53:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri mlademu samcu številka 2.	83
Slika 54:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri mlademu samcu številka 3.	83
Slika 55:	Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri mlademu samcu številka 4.	84
Slika 56:	Nivo estradiola pri samicah.	85
Slika 57:	Nivo estradiola pri odraslih samcih.	87
Slika 58:	Nivo estradiola pri mladih samcih.	88
Slika 59:	Nivo testosterona pri samicah.	89
Slika 60:	Nivo testosterona pri odraslih samcih.	91
Slika 61:	Nivo testosterona pri mladih samcih.	92
Slika 62:	Število alelov za posamezne lokuse v proučevanem materialu.	93
Slika 63:	PCA analiza: genotipi mikrosatelitnih lokusov nakazujejo delitev populacij v dva klastra: THHz-Si, THB-Si, THB-Srb / THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne.....	95
Slika 64:	PCA analiza genotipov mikrosatelitnih lokusov: 3D predstavitev delitve na dve skupini, THHz-Si, THB-Si, THB-Srb in THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne.....	95
Slika 65:	Prikaz najustreznejše vrednosti za K v analizi STRUCTURE za obravnavani set podatkov.	96
Slika 66:	Analiza STRUCTURE: najverjetnejša vrednost za K je 5.	97
Slika 67:	Drevo genotipov mikrosatelitnih lokusov.....	98

Slika 68:	Mreža haplotipov, ki ponazarja zastopanost različnih populacij v posameznih haplotipih.	102
Slika 69:	Odsek poravnave vseh šestih haplotipov in dveh heteroplazmatskih vzorcev	103
Slika 70:	Poravnava kromatogramov	103
Slika 71:	Genomska DNK samic in samcev	104
Slika 72:	Velikost fragmentov za pripravo knjižice. F in M označujeta ženski in moški združeni vzorec	105
Slika 73:	Statistični parametri sekvenciranja skupnega vzorca DNK samic	105
Slika 74:	Statistični parametri sekvenciranja skupnega vzorca samcev	106
Slika 75:	Kakovost poravnave odčitkov združenih ženskih in moških vzorcev na referenčni genom	107
Slika 76:	Primerjava združenega moškega in ženskega vzorca z referenčnim genomom <i>Gopherus evgoodei</i> (rGopEvg1_v1.p) v območju kandidatnih genov DMRT1 in IGF1R	109
Slika 77:	Neighbour-joining drevo mtDNA haplotipov	128

INDEX OF FIGURES

Figure 1:	Caudal view of a male <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	25
Figure 2:	Caudal view of a female <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	25
Figure 3:	Ventral view of a male <i>Testudo hermanni hermanni</i>	27
Figure 4:	Ventral view of a female <i>Testudo hermanni hermanni</i>	27
Figure 5:	Ventral view of a male <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	28
Figure 6:	Dorsal Ventral view of a female <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	28
Figure 7:	Mating period.....	29
Figure 8:	Copulation.....	29
Figure 9:	Egg laying.....	32
Figure 10:	Alignment of egg position in the nest.....	32
Figure 11:	Diagram of a reptile egg structure.....	35
Figure 12:	Diagram of a reptile egg structure immediately after egg deposition.....	36
Figure 13:	Hermann's Tortoise in their natural habitat.....	38
Figure 14:	Schematic description of the two types of gonadal cycle in turtles based on gametogenesis and mating.....	39
Figure 15:	Species and subspecies differentiation within the population of Mediterranean tortoises based on 12S rRNA.....	43
Figure 16:	The tortoise farm.....	46
Figure 17:	Terrariums.	46
Figure 18:	Measurement with a Vernier calliper.....	47
Figure 19:	Marked eggs on vermiculite.	47
Figure 20:	The Hermann's Tortoise egg.	50
Figure 21:	395 bp long fragment of the 12S rRNA, DQ080046.1.....	58
Figure 22:	Comparison of the body weight of a single tortoise and the number of eggs laid per clutch over a three-year period.	60
Figure 23:	Nest digging.....	62
Figure 24:	Egg in nest.	62
Figure 25:	Egg laying and arranging nest.	62
Figure 26:	Eggs in incubator.	63
Figure 27:	Hatching.....	63
Figure 28:	Newly laid tortoises.	63
Figure 29:	Shell breakthrough.....	63
Figure 30:	Comparison of the weight of the tortoise and its average egg weight in the first year....	65
Figure 31:	Unfertilised, dry egg.	67
Figure 32:	Infected unfertilised egg.	67

Figure 33: Infected egg.....	67
Figure 34: Infected fertilised egg.....	67
Figure 35: Early development stage.....	68
Figure 36: Early development stage, dried.....	68
Figure 37: Middle development stage, dried.....	68
Figure 38: Middle development stage, infected.....	68
Figure 39: Late development stage, dried.....	69
Figure 40: Late development stage, infected.....	69
Figure 41: Females progesterone levels.....	75
Figure 42: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of female number 1.....	75
Figure 43: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of female number 2.....	76
Figure 44: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of female number 3.....	76
Figure 45: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of female number 4.....	77
Figure 46: Adult males progesterone levels.....	78
Figure 47: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of adult male number 1.....	79
Figure 48: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of adult male number 2.....	79
Figure 49: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of adult male number 3.....	80
Figure 50: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of adult male number 4.....	80
Figure 51: Young males progesterone levels.....	82
Figure 52: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of young male number 1.....	82
Figure 53: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of young male number 2.....	83
Figure 54: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of young male number 3.....	83
Figure 55: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of young male number 4.....	84
Figure 56: Females oestradiol levels.....	85
Figure 57: Adult males oestradiol levels.....	87
Figure 58: Young males oestradiol levels.....	88
Figure 59: Females testosterone levels.....	89
Figure 60: Adult males testosterone levels.....	91
Figure 61: Young males testosterone levels.....	92
Figure 62: Number of alleles frequency per locus in the experimental material.....	93
Figure 63: PCA analysis: genotypes of microsatellite suggest splitting of populations in two clusters: THHz-Si, THB-Si, THB-Srb / THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne.....	95
Figure 64: PCA analysis of microsatellite genotypes: 3D presentation of division into two groups: THHz-Si, THB-Si, THB-Srb and THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne.....	95
Figure 65: Presentation of the most appropriate K value in the STRUCTURE analysis for our data set.....	96
Figure 66: The STRUCTURE analyses: the highest value for K is 5.....	97

Figure 67: Microsatellite loci tree of genotypes.....	98
Figure 68: Piechart showing representation of different population within identified haplotypes..	102
Figure 69: Alignment of six haplotypes. With IUPAC code are signed the sites indicating heteroplasmy in samples Het1 and Her2.	103
Figure 70: Alignment of chromatograms.	103
Figure 71: Genomic DNA of females and males.	104
Figure 72: Size distribution of fragment for library preparation. F and M designate female and male DNA pool, respectively.	105
Figure 73: Statistical parameters of sequencing of female pool.....	105
Figure 74: Statistical review of sequencing of male pool.	106
Figure 75: Mapping quality of reads of female and male DNA pools with the reference genome..	107
Figure 76: Comparison of sequence alignments of female and male DNA pool aligned to the reference genome of <i>Gopherus evgoodei</i> (rGopEvg1_v1.p) in the region of the candidate genes DMRT1 and IGF1R.....	109
Figure 77: Neighbour-joining tree of mtDNA haplotypes.	128

KAZALO TABEL

Tabela 1:	Seznam vzorcev	55
Tabela 2:	Multipleks reakcije PCR	56
Tabela 3:	Število in odstotki samic, ki so izlegala jajca, ter število in odstotek jajc na gnezdo	61
Tabela 4:	Meritve mase, dolžine in širine jajc za vsako sezono	65
Tabela 5:	Značilnosti in sestava jajc grške kornjače	70
Tabela 6:	Sestava beljaka in rumenjaka jajc grške kornjače	70
Tabela 7:	Maščobno kislinska sestava rumenjaka grške kornjače	71
Tabela 8:	Aminokislinska sestava beljaka grške kornjače	72
Tabela 9:	Koncentracija enajstih elementov v sledovih (mg/kg svežega vzorca) v lupini, beljaku in rumenjaku jajc grške kornjače	73
Tabela 10:	Razpon vsebnosti progesterona v iztrebkih samic grške kornjače	74
Tabela 11:	Razpon vsebnosti progesterona v iztrebkih odraslih samcev grške kornjače	78
Tabela 12:	Razpon vsebnosti progesterona v iztrebkih mladih samcev grške kornjače	81
Tabela 13:	Razpon vsebnosti estradiola v iztrebkih samic grške kornjače	85
Tabela 14:	Razpon vsebnosti estradiola v iztrebkih odraslih samcev grške kornjače	86
Tabela 15:	Razpon vsebnosti estradiola v iztrebkih mladih samcev grške kornjače	87
Tabela 16:	Razpon vsebnosti testosterona v iztrebkih samic grške kornjače	89
Tabela 17:	Razpon vsebnosti testosterona v iztrebkih odraslih samcev grške kornjače	90
Tabela 18:	Razpon vsebnosti testosterona v iztrebkih mladih samcev grške kornjače	91
Tabela 19:	Osnovni populacijski parametri, ocenjeni na osnovi genotipizacije 10 mikrosatelitnih lokusov	94
Tabela 20:	Haplotipi definirani na osnovi poravnave odseka mtDNK, del 12S rRNK	100
Tabela 21:	Razporeditev haplotipov po geografsko opredeljenih skupinah	101
Tabela 22:	Povzetek ocene poravnave odčitkov na referenčni genom	107
Tabela 23:	Seznam kandidatnih genov za diferenciacijo spola	108

INDEX OF TABLES

Table 1:	List of samples.....	55
Table 2:	Multiplex reactions PCR.....	56
Table 3:	The number and percentage of females that laid eggs; and the number and percentage of eggs per clutch.	61
Table 4:	Weight, length and width measurements of the eggs for each season.....	65
Table 5:	Hermann's tortoise eggs characteristics and compositions.	70
Table 6:	Composition of the albumen and yolk of Hermann's tortoise eggs.....	70
Table 7:	Fatty acid composition of the Hermann's tortoise egg yolk.....	71
Table 8:	Amino acid composition of the Hermann's tortoise egg albumen.	72
Table 9:	Eleven trace element concentration (mg/kg wet weight) in the shell, albumen and yolk of Hermann's tortoise eggs.....	73
Table 10:	Range of progesterone values in faeces of Hermann's Tortoise females.	74
Table 11:	Range of progesterone values in faeces of Hermann's Tortoise adult males.	78
Table 12:	Range of progesterone values in faeces of Hermann's Tortoise young males.	81
Table 13:	Range of oestradiol values in faeces of Hermann's Tortoise females.	85
Table 14:	Range of oestradiol values in faeces of Hermann's Tortoise adult males.	86
Table 15:	Range of oestradiol values in faeces of Hermann's Tortoise young males.	87
Table 16:	Range of testosterone values in faeces of Hermann's Tortoise females.	89
Table 17:	Range of testosterone values in faeces of Hermann's Tortoise adult males.	90
Table 18:	Range of progesterone values in faeces of Hermann's Tortoise young males.	91
Table 19:	Basic population parameters, evaluated on genotyping of 10 microsatellite loci.	94
Table 20:	Haplotypes, defined according to alignment of mtDNA coding for a portion of 12S rRNA.	100
Table 21:	Haplotypes arrangement based on geographical distribution.	101
Table 22:	Summary of estimated alignment of reads on reference genome.	107
Table 23:	List of candidate genes for sex differentiation.....	108

SEZNAM OKRAJŠAV

THH	<i>Testudo hermanni hermanni</i>
THB	<i>Testudo hermanni boettgeri</i>
TG	<i>Testudo graeca</i>
TM	<i>Testudo marginata</i>
CITES	Konvencija o mednarodni trgovini z ogroženimi prosto živečimi živalskimi in rastlinskimi vrstami (ang. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)
Am	aritmetična sredina (ang. Arithmetic mean)
SD	standardni odmik (ang. Standard Deviation)
Min	minimalna vrednost (ang. Minimum Value)
Max	maksimalna vrednost (ang. Maximum Value)
MU	merilna negotovost (ang. Measurement Uncertainty)
SE	standardna napaka aritmetične sredine (ang. Standard error of arithmetic mean)
EIA	encimski imunski test (ang. Encime Immuno Assays)
ELISA	Encimsko-imunski postopek (ang. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
TSD	temperaturno odvisna determinacija spola (ang. Temperature-Dependent Sex Determination)
GSD	genetsko odvisna determinacija spola (ang. Gene-Dependent Sex Determination)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
mtDNA	mitohondrijska dezoksiribonukleinska kislina (ang. Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid; mt DNA)
GC-FID	plinska kromatografija s plamensko-ionizacijskim detektorjem (ang. Gas Chromatography with a Flame Ionisation Detector)
HPLC	metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (ang. High-Performance Liquid Chromatography)
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma z masno selektivno detekcijo (ang. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) Masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
PCA	analiza glavnih komponent (ang. Principal Component Analysis)
MCMC	Monte Carlo Markovska veriga (ang. Markov chain Monte Carlo)
mRNK	informacijska RNK (ang. messenger RNA)
bp	bazni par (ang. base pair)
rRNK	ribosomalna ribonukleinska kislina (ang. ribosomal ribonucleic acid)
SNP	ponovitve posameznega nukleotida (ang. single nucleotide polymorphism)

Opomba

V slovenskem jeziku nimamo prevedenih imen vseh živalskih vrst. Za slovensko imenovanje smo se sklicevali na bazo »Register ogroženih in zavarovanih prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst«. V besedilu so navedena splošno uporabljenia slovenska imena tujih vrst, ki niso zajeta v registru. Zaradi lažjega razumevanja, sledenja in uporabnosti smo povsod navajali poleg latinskega imena tudi angleške izraze za posamezne vrste.

1 UVOD

Kopenske želve iz družine *Testudinidae* so od leta 1977 vključene v CITES dodatek I (1). Grška kornjača (*Testudo hermanni* ang. Hermann's Tortoise) je obravnavana v Uredbi Sveta (ES) št. 338/97 o varstvu prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst z zakonsko ureditvijo trgovine z njimi in se nahaja na seznamu priloge A. Zaščiten je z Direktivo Sveta št. 92/43/EGS o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih živalskih in rastlinskih vrst (2). Največje grožnje za grško kornjačo predstavljajo izguba naravnega habitata, onesnaževanje, urbanizacija, turizem, trgovanje z živalmi, smrtnost na cestah ter potencialno možni prenosi različnih kužnih bolezni (3, 4).

Najbolj pogosta kopenska vrsta želve v ujetništvu v Sloveniji je grška kornjača. Znanstveniki večinoma priznavajo dve podvrsti: *Testudo hermanni boettgeri* (THB) (vzhodna populacija) in *Testudo hermanni hermanni* (THH) (zahodna populacija) (1, 5, 6). Mnenja o obstoju tretje podvrste *Testudo hermanni hercegovinensis* so deljena (7).

Za grško kornjačo je značilno, da spolno dozori pri osmih do dvanaestih letih (5). Samice izležejo tri do osem jajc na gnezdo. Običajno imata obe podvrsti eno do dve gnezdi na leto, le izjemoma tri. Grška kornjača ima v povprečju 9 do 14 g težka jajca (8). Jajce mora vsebovati dovolj glavnih hraničnih snovi, ki so potrebne za razvoj embria. Kemijska sestava želvijih jajc je vrstno specifična in pri grški kornjači še ni bila do podrobnosti raziskana, zlasti zato, ker se ta jajca komercialno ne uporabljam za človeško prehrano. Na to temo obstaja le malo objav (9).

Diagnostika ugotavljanja spola pri želvah sloni na njihovih morfoloških, fizioloških in genotipskih značilnostih. Morfološke razlike med spoloma grške kornjače so jasno vidne, vendar jih lahko zanesljivo ločimo šele pri starosti štiri do pet let izjemoma prej (5). Skrite morfološke razlike med spoloma lahko potrdimo tudi z ultrazvokom, endoskopijo ali diagnostično celiotomijo, kjer v celomski votlini potrdimo ženske ali moške spolne organe (10). V literaturi so opisane razlike v koncentraciji spolnih hormonov med samci in samicami pri jemenskem kameleonu (*Chamaeleo calyptratus*, ang. Veiled Chameleons), kjer so s pomočjo neinvazivne tehnike določali spolne steroidne hormone in njihove presnovke v iztrebkih (11).

Za reprodukcijo vretenčarjev sta značilna dva glavna mehanizma, ki odločata determinacijo spola: genotipska spolna determinacija (GSD) in temperaturna spolna determinacija (TSD) (12).

Genotipsko ugotavljanje spola pri želvah je slabo proučeno in potrjeno samo pri nekaterih vrstah želv (npr. kitajska mehkoščitka *Pelodiscus sinensis*; ang. Chinese Softshell Turtle; *Mesoclemmys gibba*, ang. Gibba Turtle; *Apalone mutica*, ang. Smooth softshell turtle; *Emydura macquarii*, ang. Murray River turtle) (13). Znano je, da temperatura v času valjenja (inkubacije) pri večini želv vpliva na spol, kar je potrjeno tudi pri grški kornjači (14).

Raziskovalci skušajo z genetsko karakterizacijo posameznih populacij želv razjasniti strukturiranost populacij vrst in podvrst ter osvetliti njihova medsebojna razmerja. Ocena genetske pestrosti in demografskih trendov pomagata pri ohranjanju genetskih virov in pri razumevanju strukture in pomena genetskega materiala. Pomembno je poznavanje in razumevanje zgodovinskih in antropogenih dejavnikov, ki vplivajo na distribucijo genetske pestrosti pri ogroženih vrstah želv, med katere sodi tudi grška kornjača (15). Zanjo je značilno, da je zaradi urbanizacije njihovega življenjskega prostora in ilegalnega trgovanja s predstavniki vrste, ki so zelo popularni kot družne živali, vse bolj ogrožena. S pomočjo seta genetskih označevalcev lahko relativno zanesljivo določimo geografski izvor posameznih predstavnikov vrste ter podvrst, hkrati je to pomembno orodje pri proučevanju populacij želv (16, 17).

1.1 NAMEN DELA

Namen doktorske disertacije je bil:

- preveriti vpliv odsotnosti samcev skozi daljše obdobje na število izleženih jajc;
- določiti kemijsko sestavo jajca grške kornjače in jo primerjati s sestavo kokošjega jajca;
- ugotoviti uporabnost metode ELISA za merjenja koncentracije spolnih hormonov (progesterona, estradiola, testosterona) v iztrebkih spolno zrelih grških kornjač in na podlagi tega določiti spol;
- na proučevani farmi oz. pri posameznih gojiteljih v Sloveniji s pomočjo molekularnih orodij proučiti strukturo populacije grških kornjač; tako predstavnike priznanih podvrst (*Testudo hermanni hermanni*, *Testudo hermanni boettgeri*) kot tudi znanstveno nepriznane podvrste (*Testudo hermanni hercegovinensis*).

1.2 HIPOTEZE

Z raziskavo smo poskušali potrditi naslednje hipoteze:

Reprodukcia želv

1. Predvidevamo, da bodo želje samice, ki smo jih osamili od samcev, izlegle naslednje leto manjše število oplojenih jajc. Zanima nas, ali prisotnost samcev vpliva tudi na število izleženih jajc.

Kemijska sestava jajca

2. Proučili bomo razlike v kemijski sestavi (maščobe, beljakovine oz. vsebnost dušika, pepel, maščobne kisline, vsebnost elementov) med jajcem želv (*Testudo hermanni*) in standardnimi vrednostmi jajca kokoši (*Gallus gallus domesticus*). Predvidevamo, da so razlike v sestavi velike.

Določanje spolnih hormonov in njihovih metabolitov v iztrebkih

3. Predvidevamo, da bomo lahko določevali koncentracijo spolnih hormonov (progesterona, estradiola, testosterona) v iztrebkih pri spolno zrelih grških kornjačah in na podlagi tega določili spol.

Genetska analiza populacij grške kornjače

4. Predvidevamo, da bomo z uporabo molekulskih orodij (mtDNK in mikrosateliti) lahko pokazali, da je populacija želv na proučevani farmi strukturirana in da v njej lahko zaznamo doprinos različnih podvrst (THH, THB ali *Testudo hermanni hercegovinensis*) in da genetsko strukturiranost lahko povežemo s fenotipskimi značilnostmi. Pričakujemo, da bomo lahko z analizo celotnega genoma in posameznih kandidatnih lokusov osvetlili mehanizme, ki so odgovorni za diferenciacijo spola pri grški kornjači.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 MORFOLOŠKE IN FIZIOLOŠKE ZNAČILNOSTI GRŠKE KORNJAČE

Grška kornjača (*Testudo hermanni*) je srednje velika kopenska želva. V naravi jo najdemo na območju evropskega dela Mediterana; v Španiji (in Balearskih otokih), Monaku, Franciji (in otoku Korzika), Italiji (in otokih Elba, Pianosa, Sardinija, Sicilija), Sloveniji, Hrvaški, Bosni in Hercegovini, Kosovem, Srbiji, Romuniji, Bolgariji, Črni gori, Severni Makedoniji, Albaniji, Grčiji (in Jonskih otočjih), Turčiji, Malti (1, 5, 6). O podvrstah grške kornjače *Testudo hermanni* smo v literaturi naleteli na neenotne podatke. Večinoma priznavajo dve podvrsti: *Testudo hermanni hermanni*, imenovana tudi zahodna populacija, in *Testudo hermanni boettgeri*, imenovana tudi vzhodna populacija. Znanstveniki si nasprotujejo glede obstoja tretje podvrste *Testudo hermanni hercegovinensis*, saj dosedanje genetske raziskave te hipoteze niso podprle (7).

Za grško kornjačo je značilno, da je karapaks visok, kupolast, pri samicah ovalen in pri samcih v obliki trapeza. Samice imajo širši karapaks (6, 8, 18). Zadnje marginalne ploščice so pri samicah manj nazobčane in nabrazdane kot pri samcih. Suprakavdalna ploščica pri samicah je krajsa in ravna, pri samcih rahlo zavihana navznoter (8, 19). Površina je pri obeh spolih zaradi rastnih obročkov nabrazdana, razen pri starejših živalih, kjer je površina lahko zelo gladka (sliki 1 in 2). Samice imajo odprtino kloake bližje bazi repa, ki je kratek in čokat. Samci imajo daljši rep, ki je debelejši na bazi (5, 6, 8, 18).



Slika 1: Kavdalni pogled samca *Testudo hermanni boettgeri*. (vir: Stvarnik 2014)

Slika prikazuje samca THB, ki ima trapezast karapaks, debelejši in dolg rep, suprakavdalna ploščica je zavihana navznoter.

Figure 1: Caudal view of a male *Testudo hermanni boettgeri*. (source: Stvarnik, 2014)

The figure represents a THB male with a trapezoid carapax, a thicker and longer tail, the supracaudal scute is folded inwards.



Slika 2: Kavdalni pogled samice *Testudo hermanni boettgeri*. (vir: Stvarnik, 2014)

Slika prikazuje samico THB, ki ima kupolast in širši karapaks, kratek in čokat rep, suprakavdalna ploščica je krajsa in ravna.

Figure 2: Caudal view of a female *Testudo hermanni boettgeri*. (source: Stvarnik, 2014)

The figure represents a THB female with a cupole-like and wider carapax, a short and stout tail, the supracaudal scute is shorter and flat.

Koža grške kornjače je lahko rumene in črne barve, včasih enovito rumene, rumenkasto oranžna, rjavasta ali zelenkasto rumena, prezeta z vzorci črnega pigmenta. Mladiči so svetlejših odtenkov kot odrasli (5, 6, 8, 18). Grške kornjače imajo negibljiv plastron, raven pri samicah in rahlo konkaven pri samcih. Ima dva širša črna trakova, ki ju ločuje svetlejši medialni predel različnih širin. Včasih sta ta trakova nakazana s posameznimi pikami ali ju skoraj ni. Pri odraslih samcih je plastron konkaven, kar je pomembno pri anatomske prilagoditvi s samico ob parjenju. Sploščena oblika plastrona pri samicah omogoča hrambo in zgodnji intracelomični razvoj jajc pred izleganjem jajc (ovipozicijo) (20).

Življenska doba grških kornjač je lahko 90 let in več (21).

2.1.1 Podvrste grške kornjače

Priznani sta dve podvrsti grške kornjače: *Testudo hermanni hermanni* (ang. Western population Hermann's Tortoise) in *Testudo hermanni boettgeri* (ang. Eastern population Hermann's Tortoise) (1, 5, 6). Nekateri avtorji omenjajo še tretjo podvrsto *Testudo hermanni hercegovinensis*, ki so jo našli v Istri in Dalmaciji (ang. Dalmatian's Tortoise). Slednja se od *Testudo hermanni boettgeri* razlikuje po manjkajoči ingvinalni ploščici (22, 23), vendar ta podvrsta uradno ni priznana (7).

2.1.1.1 *Testudo hermanni hermanni*

Zahodna podvrsta (slika 3 in 4), *Testudo hermanni hermanni* je podvrsta, katere predstavniki so nekoliko manjši. Dolžina karapaksa samic v povprečju meri 150–179 mm, dolžina karapaksa samcev 130–149 mm (5). Samice podvrste *Testudo hermanni hermanni* znesejo v povprečju 3,3 jajca na gnezdo, največ 7 jajc na gnezdo (navajajo tudi povprečje 4 do 5 jajc) (12). Za to podvrsto sta značilna dva izrazita vzporedna, temna trakova vzdolž celotnega plastrona. Oklep je zlato-rumene barve. Na glavi je lahko barva kože temno zelena do rumenkasta s posameznimi temnimi lisami. Največkrat noge ob straneh niso pigmentirane. Pri večini *Testudo hermanni hermanni* je suprakavdalna ploščica deljena, le posamezni primerki imajo nedeljeno. Dolžina pektoralnih ploščic v primerjavi s femoralnimi je krajsa (5, 8, 18).



Slika 3: Ventralni pogled samca *Testudo hermanni hermanni*. (vir: Stvarnik, 2013)



Slika 4: Ventralni pogled samice *Testudo hermanni hermanni*. (vir: Stvarnik, 2013)

Vidna je razlika v obliki oklepa in velikosti repa med spoloma pri THH.

Figure 3: Ventral view of a male *Testudo hermanni hermanni*. (source: Stvarnik, 2013)

Figure 4: Ventral view of a female *Testudo hermanni hermanni*. (source: Stvarnik, 2013)

The obvious gender difference between the shape of the shell and the size of the tail of THH is noticeable.

2.1.1.2 *Testudo hermanni boettgeri*

Vzhodna podvrsta (slika 5 in 6), *Testudo hermanni boettgeri* ima največje predstavnike vrste grške kornjače. Dolžina karapaksa samic v povprečju meri več kot 180 mm, dolžina karapaksa samcev več kot 155 mm (5). Povprečna dolžina karapaksa, ki so jo izmerili na dveh lokacijah v Srbiji, je bila pri samicah od 235,0 do 249,7 mm in pri samcih od 241,5 do 264,6 mm (24). Pri *Testudo hermanni boettgeri* iz severovzhodne Grčije so bile pektoralne ploščice pri samcih daljše. Povprečna dolžina karapaksa, ki so jo izmerili pri samicah, je znašala 191,8 mm in 162,5 mm pri samcih. Največje primerke najdemo na območju Bolgarije (samice so večje od 26 cm, telesna masa je do 3400 g). Samice podvrste *Testudo hermanni boettgeri* v povprečju izležejo 4,3 jajca na gnezdo, največ 9 jajc na gnezdo (12). Najpogosteje imajo eno do dve gnezdi, redko tri gnezda (5). Na področju plastrona največkrat najdemo razpršene temne zaplate, redkeje potekata kot dva temna trakova vzdolž plastrona, podobno kot pri *Testudo hermanni hermanni*. Osnovna barva pri odraslih je olivna do zelenkasto-rumena, ki z leti največkrat zbledi. Dolžina pektoralnih in femoralnih ploščic je približno enaka (8, 18).

Ugotovljeno je, da ima 20 odstotkov populacije *Testudo hermanni boettgeri* deljeno suprakavdalno ploščico (18). Samci imajo izrazitejše robove okoli oklepa, imajo daljše okončine in večjo glavo. Njihov plastron je bolj konkaven, poroženela konica repa je daljša, uporabljajo jo za stimulacijo samice med dvorjenjem. Samice imajo precej bolj izražene abdominalne in analne šive (24, 25).



Slika 5: Ventralni pogled samca *Testudo hermanni boettgeri*. (vir: Stvarnik, 2013)



Slika 6: Ventralni pogled samice *Testudo hermanni boettgeri*. (vir: Stvarnik, 2013)

Vidna je razlika v obliki oklepa in velikosti repa med spoloma pri THB.

Figure 5: Ventral view of a male *Testudo hermanni boettgeri*. (source: Stvarnik, 2013)

Figure 6: Ventral view of a female *Testudo hermanni boettgeri*. (source: Stvarnik, 2013)

The obvious gender difference between the shape of the shell and the size of the tail of THB is noticeable.

2.1.2 Reprodukcija želv

Želve potrebujejo leta ali desetletja, da spolno dozorijo. Razvoj jajc je precej nenavaden upoštevajoč čas od oploditve do izleganja. Odkiven je od različnih okoljskih in gnezditvenih pogojev. Samice lahko izlegajo oplojena jajca tudi štiri leta po parjenju, čeprav se fertilnost signifikantno zmanjša v vsaki naslednji sezoni (26).

V naravi so grške kornjače spolno aktivne od marca do oktobra, z vrhuncem aktivnosti v avgustu in septembru. Gnezdenje poteka od maja do junija in v tem času niso spolno aktivne (27). Kopenske želve ne izbirajo prostora parjenja niti ni dokazov o izbiri partnerja, vezano na velikost samca (28).

Galeotti sodelavci (2007) je odkril, da oba spola razlikujeta vonj lastne vrste od vonja drugih vrst, vendar so le samci sposobni po vonju ločiti spol in spolno zrele partnerke (29). Cutuli sodelavci (2014) ni uspela dokazati, ali samice izberejo večje in vztrajnejše samce (30) (slike 7 in 8).



Slika 7: Obdobje parjenja. (vir: Stvarnik, 2013)

Samci zasledujejo samice. V tem obdobju se odvija zaskok.

Figure 7: Mating period. (source: Stvarnik, 2013)

Males chase females. During this period tortoises interact.



Slika 8: Parjenje. (vir: Stvarnik, 2013)

Slika prikazuje značilen paritveni akt pri THB.

Figure 8: Copulation. (source: Stvarnik, 2013)

The figure represents typical coitus in THB.

Determinacija spola je pri različnih taksonomskih skupinah živali zelo različna. Poleg determinacije spola s spolnimi kromosomi (XY, ZW) poznamo različne sisteme determinacije spola s spolnimi lokusi na avtosomih, determinacijo spola s spolno specifičnim izražanjem genov, ki sodelujejo pri diferenciaciji spola in okoljsko pogojeno determinacijo spola (12, 31). Pri številnih rodovih plazilcev je determinacija spola pogojena z okoljskimi dejavniki (krokodili, številne vrste želv, kuščarji), kjer najpomembnejšo vlogo igra temperatura (*temperature sex determination*, TSD). Vrste, pri katerih je spol determiniran na ta način, nimajo spolnih kromosomov in kariotipskih razlik med moškimi in ženskimi osebki (31).

Pri večini vrst želv je diferenciacija gonad odvisna od inkubacijske temperature jajc v času kritičnega obdobja embrionalnega razvoja, ko se odvija diferenciacija spolnih žlez. V termosenzitivnem obdobju se pri določenih temperaturah razvijejo pretežno samci, pri drugih temperaturah pretežno samice (14, 32). Quinn sodelavci (2011) opisuje tri tipe vpliva temperature na razvoj spola pri plazilcih (33). Prvi tip opazimo pri številnih vrstah želv, tudi pri grški in mavrski kornjači. Zanj je značilno, da se pri nižji temperaturi inkubacije izvali več samcev in pri višji več samic. Za drugi tip je značilno, da se pri nižji temperaturi izvali več samic, pri višji temperaturi več samcev.

Ta tip najdemo le pri nekaterih vrstah v redu krokodilov (npr. misisipijski aligator, *Alligator mississippiensis*, ang. American Alligator), kuščarjev in pri tuatarah (*Sphenodon* sp.). Pri nekaterih vrstah želv (npr. *Melanochelys trijuga*, ang. Indian Black Turtle; *Sternotherus minor*, ang. Loggerhead musk turtles; *Sternotherus odoratus*, ang. Common Musk Turtle), krokodilov (npr. *Crocodylus johnsoni*, ang. Australian Freshwater Crocodile) in kuščarjev (npr. *Chlamydosaurus kingii*, ang. Frilled-necked Lizard) opažamo še tretji tip, kjer se samice razvijejo pri nižjem in višjem temperaturnem območju, samci pa v vmesnem temperaturnem območju (12, 14).

Pieau je s sodelavci (1999) opravil poskuse pri želvah, kuščarjih in krokodilih z aplikacijo estrogena in aromataze (aromataza je encimski kompleks, ki pretvarja androgene hormone v estrogene hormone). Opazovali so vpliv le-teh na diferenciacijo ovariijev med termosenzitivnim obdobjem in pomen pri vzdrževanju zgradbe ovariijev po tem. Ugotovili so, da je imel glavno vlogo encimski kompleks aromataza. Aktivnost aromataze je bila nizka pri temperaturi, ugodni za razvoj samcev, medtem ko je aktivnost aromataze dramatično narastla pri temperaturi, ugodni za razvoj samic (34).

Quinn s sodelavci (2011) je pri bradati agami (*Pogona vitticeps*, ang. Central Bearded Dragon) ugotovil, da je možna sprememba spola v embrionalnem razvoju, ki nastane zaradi interakcije med TSD in GSD. Na nastanek spola pri tej vrsti torej vplivata tako temperatura v času inkubacije kot tudi genetske determinante (33).

Nekatere želve, kuščarji in kače imajo genetsko determiniran spol (*genetic sex determination*, GSD). Nekatere želve in kuščarji imajo heterogametne samce (XY) in homogametne samice (XX), medtem ko imajo druge vrste želv in kuščarjev homogametne samce (ZZ) in heterogametne samice (ZW) (33, 35). Nekatere vrste želv nimajo kromosomskih razlik med moškimi in ženskimi, imajo pa spolno različen režim izražanja spolnih lokusov, ki je pogosto odvisen od okoljskih razmer. V takih primerih gre za kombinacijo genetske in okoljske determinacije spola. Spolni kromosomi pri nekaterih želvah so homologni z deli prvega kromosoma žabe vrste *Xenopus tropicalis* (ang. Western Clawed Frog), ki nosi gen DMRT1, drugi pa s četrtem kromosomom *Xenopus tropicalis*, na katerem se nahaja gen Wt1. Večina spolnih kromosomov pri želvah je nastala z inverzijami regij okrog teh dveh genov (36).

Rhen in Schroeder (2016) sta pri navadni hlastavki (*Chelydra serpentina*, ang. Snapping Turtle) identificirala nov TSD-gen, kar omogoča nov pristop k odkrivanju novih termosenzorjev (37). Pri vrstah, kjer ni razlik v kariogramu med moškimi in ženskimi osebkami, obstaja možnost, da okoljske razmere vplivajo na režim izražanja genov, ki so vključeni v diferenciacijo spola. Primer takega lokusa je gen CIRBP, v katerem je SNP c63A>C povezan z determinacijo spola pri navadni hlastavki (38). Alel A je termosenzitiven in se aktivira pri temperaturah, ki spodbujajo razvoj ženskih osebkov, medtem ko alel C ni občutljiv na okoljsko temperaturo. Tako je večja verjetnost, da se bodo pri homozigotih AA razvili ovariji kot pri heterozigotih AC in homozigotih CC. Druga skupina kandidatnih genov za determinacijo spola ob delovanju okoljskih dejavnikov so homeotski geni (Hox geni), ki igrajo pomembno vlogo pri številnih razvojnih procesih, med katere sodi tudi diferenciacija spola (39).

Poleg teh dveh kandidatnih genov so bili kot kandidatni lokusi za determinacijo spola pri želvah, ki nimajo spolnih kromosomov, predlagani lokusi, ki so s svojim transkripcijskim profilom povezani z determinacijo spola: *Amh*, *Ar*, *Esrl*, *Fog2*, *Gata4*, *Igf1r*, *Insr*, *Lhx9* pri temperaturah, ki stimulirajo razvoj moških osebkov in *β-catenin*, *Foxl2*, *Cyp19a1*, *Fst*, *Nf-kb* in *Crabp2* pri temperaturah, ki stimulirajo razvoj ženskih osebkov (40). S sekvenciranjem delov genoma pri vrsti kitajske mehkoščitke (*Pelodiscus sinensis*, ang. Chinese Softshell Turtle) so osamili dve spolno specifični regiji, znotraj katerih so lahko identificirali spolno specifične označevalce (41).

2.1.2.1 Reprodukcija grške kornjače

Odrasli samci so opazno manjši in lažji od odraslih samic. Spolni dimorfizem je dobro izražen (predstavljeno v poglavju številka 2.1.1, slike od 1 do 6). Predvsem je dobro viden, ko karapaks doseže dolžino 10 centimetrov oz. pri starosti 6 do 7 let. Različni avtorji omenjajo različne dolžine karapaksa, pri samcih do 12 in pri samicah do 36 centimetrov. Samci imajo plastron bolj uleknjen. Med spoloma so opazne razlike tudi pri analni ploščici plastrona glede na velikost in obliko. Samice imajo kratek in čokat rep, odprtina kloake je bližje bazi repa. Rep samcev je daljši in je na bazi širši. Spolno dozorijo pri 8 do 12 letih (5-8, 18, 42, 43).

Samice grške kornjače izležejo od eno do osem jajc na gnezdo (odvisno od podvrste in individualnih razlik). Običajno izlegajo jajca enkrat do dvakrat letno (sliki 9 in 10), izjemoma tudi trikrat (21). Rezultati kažejo, da samica aktivno optimizira uporabo shranjenih semenčic, upoštevajoč njihovo vitalnost. Samica »uporabi« starejše seme (seme iz prejšnjih paritvenih sezoni), ker je le-to manj vitalno kot novo seme. Cutuli s sodelavci (2013) je pri *Testudo hermanni hermanni* v ujetništvu v 46 % gnezd ugotovila oplodnjo jajc s spermo različnih samcev (26), medtem ko je Farke s sodelavci (2015) pri *Testudo hermanni boettgeri* v ujetništvu s pomočjo specifičnih polimorfnih mikrosatelitnih markerjev potrdil oplodnjo jajc s spermo različnih samcev v 52,9 % gnezd. DNK so izolirali iz amnijske tekočine (43).



Slika 9: Izleganje jajc. (vir: Stvarnik, 2013)



Slika 10: Poravnavanje lege jajc v gnezdu.
(vir: Stvarnik, 2013)

Slike prikazujeta kako samica ob izleganju sproti ureja lego jajc v gnezdu, ki lahko traja več minut za posamezno jajce.

Figure 9: Egg laying. (source: Stvarnik, 2013)

Figure 10: Alignment of egg position in the nest.
(source: Stvarnik, 2013)

Figures represent alignment of egg positioning in the nest by the female right after laying each egg. This can take several minutes for an individual egg.

V naravnem okolju traja inkubacija jajc povprečno 63 dni (5, 21). V vzreji jajca inkubirajo v valilnikih od 58 do 73 dni pri temperaturi 28 do 30 °C (21). Köhler s sodelavci (2005) navaja za grško kornjačo inkubacijsko temperaturo, pri kateri se razvijejo pretežno samci, 25 do 30 °C, za razvoj samic navajajo inkubacijsko temperaturo 33 do 34 °C.

Izven teh temperaturnih območij število uspešnih izvalitev upada. Valilni čas pri inkubacijski temperaturi 28 do 31 °C je 60 do 66 dni pri podvrsti *Testudo hermanni hermanni* oz. 54 do 79 dni pri podvrsti *Testudo hermanni boettgeri* (12).

Čas embrionalnega razvoja, ki poteka med obdobjem, ko je temperatura nad pragom, odločilno vpliva na determinacijo spola. Temperatura zemlje oz. inkubatorja determinira spol želvijih mladičev. Za uspešen razvoj in izleganje jajc grške kornjače je potrebna temperatura v razponu 24 do 34 °C, s tem da je večja smrtnost na začetku oz. koncu tega razpona. V temperaturnem območju 31,5 do 33,5 °C, se izleže več samic kot samcev. Pri grški kornjači je razmerje med spoloma približno 50 : 50 pri temperaturi 31,5 °C (21, 44).

2.2 JAJCA ŽELV

Samice plazilcev (Reptilia) so večinoma oviparne živali, pri kuščarjih in kačah so nekatere vrste ovoviviparne (jajca ostanejo v telesu samice, mladiči se izležejo v času depozicije že v materinem telesu). Vse vrste želv in vsi krokodili so oviparni, samice izlegajo jajca. Jajca plazilcev so sferična ali elipsoidna, zanje je značilna simetričnost, jajce ni koničasto na enem koncu in topo na drugem, kot je to značilno za ptičja jajca. Večina oviparnih samic ovulira in izleže posamezna ali več jajc naenkrat v eno gnezdo (45, 46).

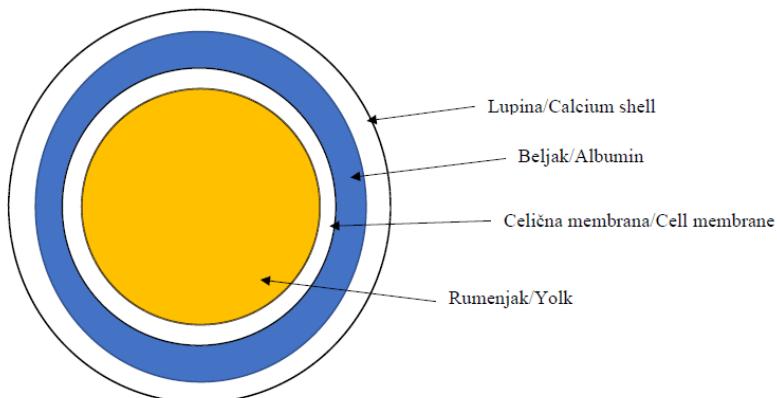
Velikost in oblika želvijih jajc variira tako med vrstami kot tudi znotraj posamičnega gnezda. Število jajc v gnezdu je od eno do dve jajci pri vrsti *Siebenrockiella crassicollis* (ang. Black Marsh Turtle) ali pri palačinkasti želvi (*Malacochersus tornieri*, ang. Pancake Tortoise) ter več kot sto jajc na gnezdo pri morskih vrstah želv (47).

Pri plazilcih najdemo večje razlike v tipu jajčne lupine kot pri ptičih (46). Jajca grške kornjače imajo trdo lupino bele barve in so skoraj eliptične oblike. *Testudo hermanni* izležejo največ do sedem jajc na gnezdo; povprečna velikost gnezda je 3,3 in 4,3 jajc. Najpogosteje izležejo grške kornjače eno do dve gnezdi na leto, redkeje tri (5). Masa jajca želv je od 2,2 grama pri vrsti navadna moškatnica (*Sternotherus odoratus*, ang. Eastern Musk Turtle) do 110 gramov pri orjaški galapaški želvi (*Geochelone elephantopus*, ang. Galápagos Giant Tortoises) (47). Pri grški kornjači je v naravnem okolju povprečna masa jajca 9 do 10 gramov (podvrsta *Testudo hermanni hermanni*) oz. 12 do 14 gramov (podvrsta *Testudo hermanni boettgeri*) (8). Za primerjavo: povprečna masa kokošjega jajca znaša 58 g (48).

Nepravilna oblika jajc se pogosto pojavi pri želvah iz rodu *Platemys* (ang. Flat-headed Turtle), rodu *Rhinoclemmys* (ang. Neotropical Wood Turtle), sladkovodnih terapinih rod *Heosemys* in rod *Melanochelys*. Jajca oblike blazine (npr. eliptični prečni prerez) vedno najdemo pri vrsti *Kinixys* sp. (ang. Hinged Tortoise). Večina *Testudinidae* proizvaja jajca eliptične oblike, pri nekaterih večjih vrstah npr. pri afriški ostrogasti želvi (*Geochelone sulcata*, ang. African Spurred Tortoise) najdemo sferična jajca. Ne glede na dejansko velikost, obliko jajca ali glede na tip jajčne lupine ostajajo razmerja jajčnih komponent relativno enaka med vrstami (46).

Kot vsa jajca plazilcev imajo (slika 11) tudi želvja jajca zunanjo lupino, ki je lahko mehka (npr. vodne vrste želv) ali trdna (kopenske vrste želv) (47). Jajčna lupina je sestavljena iz fibroznega notranjega sloja (jajčna membrana), ki vsebuje beljakovine, in iz zunanjega sloja, ki je primarno zgrajen iz kalcijevega karbonata.

Glavna naloga jajčne lupine je zaščita jajčne vsebine pred mehanskimi in mikrobnimi vplivi ter kot skladišče mineralov za rastoči embrio (47). Jajčna lupina ima pore, preko katerih, zlasti pri trdi lupini, poteka izmenjava vlage in plinov (47). Zgradba jajčne lupine variira od upogljive do krhke na začetku in v celoti lomljive na koncu (49). Plazilska jajca imajo debelo fibrozno membrano med notranjo površino lupine in beljakom. Kmalu po izleženju povzroči krčenje rumenjaka in drugih vsebin nastanek zračne komore, ki je najpogosteje na enem koncu jajca. To lahko vidimo, če presvetljujemo jajce z močnim virom svetlobe (8). Enak pojav je viden pri kokošjem jajcu (50).



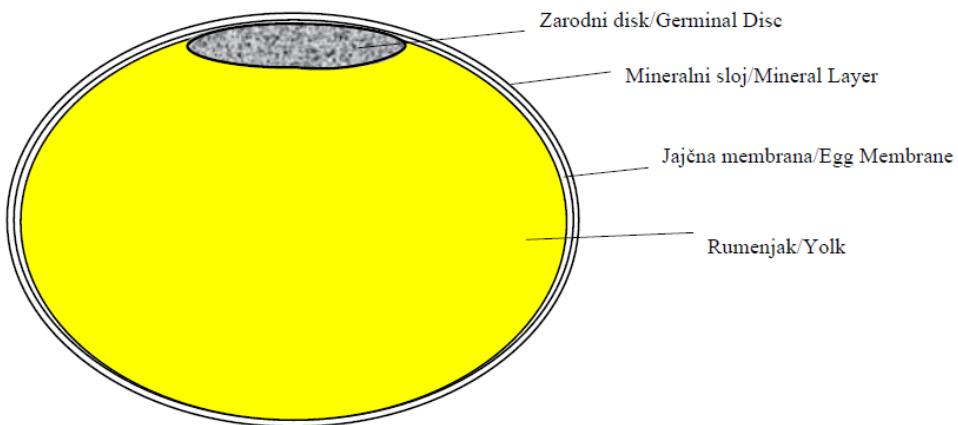
Slika 11: Diagram zgradbe plazilskega jajca (povzeto po Köhlerju, 2005) (47).

Sestavni del jajca plazilskega jajca so lupina, beljak, celična membrana in rumenjak.

Figure 11: Diagram of a reptile egg structure (adopted from Köhler, 2005) (47).

The components of a reptile egg are shell, albumen, cell membrane and yolk.

Pri želvah se količina rumenjaka giblje med 32 in 55 %, pri kuščarjih in kačah celo 72 do 99 % (47). Pri kokošjem jajcu predstavlja rumenjak 30 % celotnega volumna (51). Rumenjak je od beljaka ločen z vitelinsko membrano. Obdaja ga jajčni beljak, ki je sestavljen iz vodene zunanje in notranje plasti ter viskozne srednje plasti. Plazilska jajca ne vsebujejo halaz, ki bi držala rumenjak v centralnem položaju. Razvijajoči se zarodek lebdi na površini rumenjaka, na katerega se nekako opira oz. pritrdi (slika12). To je tudi eden od razlogov, zakaj so plazilska jajca občutljiva na premikanje okoli njihove horizontalne osi v času razvoja. V primeru nepravilnega premikanja ali obračanja jajca lahko pride do prekinitve embrionalnih žil in posledičnega zamiranja oz. odmrtva embria (47). Zanimivo je, da Aubert s sodelavci (2015) navaja dvome o obstoju halaz v plazilskih jajcih (52).



Slika 12: Diagram strukture jajca plazilcev takoj po depoziciji (povzelo po Köhlerju, 2005) (47).

Ob izleganju se na svodu plazilskega jajca nad zarodnim diskom ustvari zračna komora, ki se s starostjo veča.

Figure 12: Diagram of a reptile egg structure immediately after egg deposition (adopted from Köhler, 2005) (47).

After eggs are laid an air chamber is created at the vault of the reptile egg above the germinal disc, which increases with age.

Beljak pri jajcu želv predstavlja približno 58 % celotne mase jajca in od tega vsebuje 10 do 12 % beljakovin: pretežno ovalbumin, ovotransferin, ovomucoid, globuline in lizocime (53). Albuminska frakcija je pomembno skladišče vode (49). Za primerjavo: kokošji beljak vsebuje okoli 90 % vode, v kateri je raztopljenih 10 % beljakovin (albumini, mukoproteini in globulini). V nasprotju z rumenjakom, ki je bogat z maščobami, beljak skoraj ne vsebuje maščob, ogljikovih hidratov je manj kot 1 % (54).

Jajce vsebuje 50 do 70 % več rumenjaka, kot ga embrio potrebuje za svoj razvoj. Višek rumenjaka služi kot energijska rezerva in je pomembno skladišče vitaminov, mineralov in elementov v sledeh za novo izležene živali v prvih tednih življenja (47). Rumenjakova membrana, imenovana tudi vitelinska membrana, obdaja beli in rumeni rumenjak, na katerem je usidran zarodni (embrionalni) disk (slika 12) (46).

2.3 HORMONALNA URAVNAVA REPRODUKCIJE PRI ŽELVAH

2.3.1 Neinvazivne metode merjenja spolnih hormonov

Ovrednotenje reprodukcijskega cikla na osnovi merjenja hormonov je učinkovito in uporabno orodje za upravljanje/nadzorovanje razmnoževanja pri različnih vrstah in se je izkazalo za uporabno tako pri živalih v ujetništvu kot pri prosto živečih živalih. Natančna ocena spolnega cikla oz. hormonalnega statusa živali je pomembna v razvoju strategij razmnoževanja tako v naravi kot v živalskih vrtovih. Ocenitev spolne zrelosti, plodnosti in spolni status nam zagotavljajo natančna navodila za izločevanje, parjenje ali ločevanje živali ter je pomembno za predvidevanja uspeha ali neuspeha v vzrejni skupini živali. Zavedati se je treba, da je za dober spolni potencial pomembno tudi splošno zdravje živali v skupini in stabilnost le-te. Neinvazivni reprodukcijski monitoring pri prosto živečih vrstah so sprva razvili s pomočjo določanja estrogena v vzorcih urina (55-57).

Natančna določitev reprodukcijskega ciklusa in določitev reprodukcijskega statusa sta najpomembnejša dejavnika za uspešno upravljanje reprodukcije in pomoč pri asistiranih tehnikah v reprodukciji (umetno osemenjevanje, in vitro osemenjevanje in/ali embrio transfer) (56).

Za uspešno spremeljanje reproduktivno-endokrinih povezav je potrebno ponavljanje vzorčenje. Pri večini prosto živečih živali (slika 13) je ponavljanje vzorčenje krvi nemogoče, zato se tu uporablja neinvazivno vzorčenje urina in iztrebkov za vrednotenje steroidnih metabolitov. Vzorce urina in iztrebkov za oceno reproduktivnega statusa se brez težav jemlje pri živalih v ujetništvu, veliko težje jih je zbirati pri prosto živečih živalih. V te namene uporabnejša metoda zbiranja vzorcev iztrebkov (56).

V neinvazivnih endokrinih raziskavah raziskovalci že nekaj časa uspešno uporabljajo urin, v katerem določajo količino hormonov, za določanje spolnega cikla in stresa pri številnih vrstah prosto živečih in živali v ujetništvu (56-59).

Schwarzenberger s sodelavci (1993) je s preiskavami iztrebkov potrdil prisotnost več imuno reaktivnih progestagenov v iztrebkih črnega nosoroga. Z uporabo EIA-metode so opravili neinvazivni monitoring estrusnega cikla in brejosti pri tej vrsti (55).

Pri nekaterih plazilcih, npr. pri jemenskem kameleonu (*Chamaeleo calyptratus*, ang. Veiled Chameleons), so določali spolne steroidne hormone in njihove presnovke v iztrebkih s pomočjo tehnike EIA. Rezultate so uporabili za oceno spolne aktivnosti. Metoda se je izkazala za primerno, kajti v omenjeni raziskavi so uspešno validirali vzorce iztrebkov samic kameleonov za merjenje estrogena, testosterona in progesterona ter njihove presnovke (11).



Slika 13: Grška kornjača v naravnem okolju. (vir: Stvarnik, 2014)

Grška kornjača se v naravnem okolju giba po travnikih, med kamenjem in skalami. Uživa hrano, ki raste v neposrednem okolju.

Figure 13: Hermann's Tortoise in their natural habitat. (source: Stvarnik, 2014)

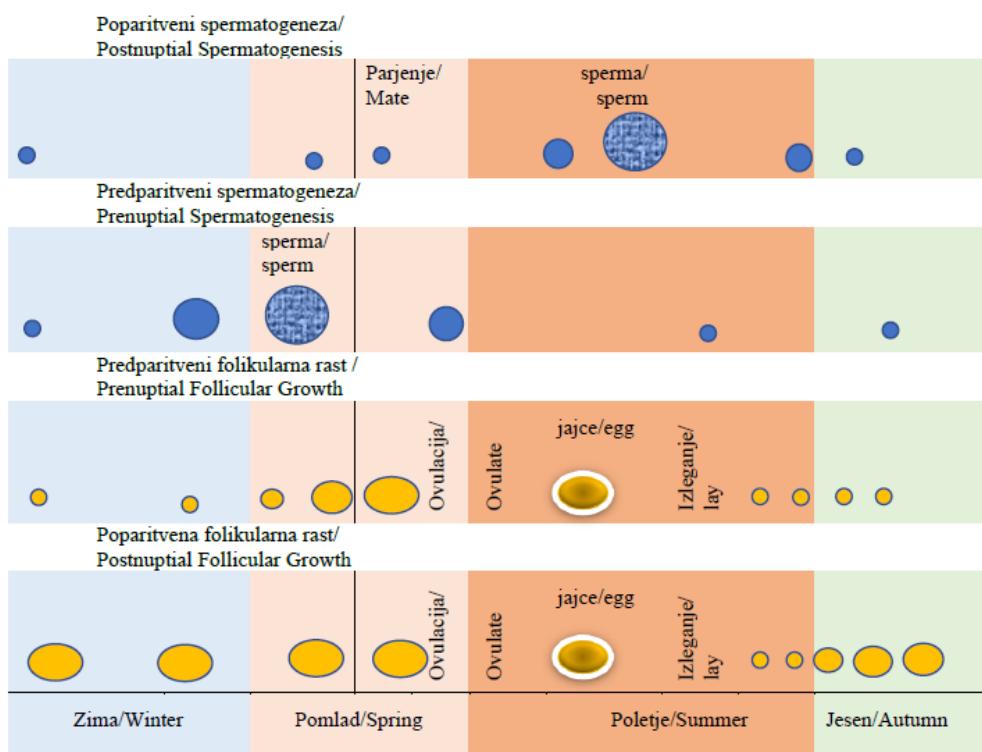
Hermann's Tortoise moves in natural habitat on pastures, between stones and rocks. They eat food that grows in the near environment.

2.3.2 Metode merjenja spolnih hormonov pri želvah

Znanstveniki že nekaj časa proučujejo hormonalno uravnavanje reprodukcije želv. Licht (1982) je ugotovil, da meritve serumskih gonadotropinov spolnih steroidov v letnem ciklu pri želvah kaže drugačno dinamiko od standardnih histoloških in gravimetričnih študij. Pri samcih nivo testosteronasov pada z rastjo testisov in spermatogenezo, med spomladanskim parjenjem pa se nivo ne dvigne. Dinamika izločanja progesterona, estradiola, in testosterona pri samicah je izredno variabilna med vrstami in ne kaže povezave z ovarialnim ciklom (60).

Pri želvah obstajata dva vzorca spolnega cikla, ki sta osnovana glede na potek spermatogeneze in ovulacije v povezavi s sezono parjenja (slika 14). Prvi način spolnega cikla je predparitveni tip (ang. prenuptial ali associated). Značilen je za tropске in subtropske vrste želv. Zanj je značilen počasen in nekako sinhroniziran razvoj ovarijs in testisov, ki neprekinjeno poteka skozi zimske mesece (ali sušno sezono). Višek cikla, z največjo proizvodnjo sperme, nastopi tik pred spomladanskim obdobjem parjenja. Sočasno se pri samici sprožijo posamezne ali multiple ovulacije ter nadaljnje gnezdenje (10).

Drugi način spolnega cikla je poparitveni tip (ang. postnuptial ali dissociated). Značilen je za želve, ki naseljujejo področja zmerno toplega pasu. Rast testisov in ovariijev doseže največjo stopnjo pozno poleti ali v pozni deževni sezoni in se zaključi pozno jeseni. V tem času hladno vreme ali drugi ekstremni klimatski pogoji pripeljejo do popolne prekinitev tako spermatogeneze kot oogeneze na tej stopnji. Namesto nadaljnjega parjenja te vrste začno s hibernacijo ali estivacijo, ki traja tudi več mesecev. Spomladi, ob otoplitvi oz. spremenjenih klimatskih razmerah, ko nastopi več vlage, se posamezne želve izkopljajo in kmalu prično z dvorjenjem in parjenjem. Tako že zgodaj spomladi prično z gnezdenjem. Po zaključeni reproduktivni fazi se prične intenzivno obdobje hrانjenja, s katerim pripravijo zaloge za polno rast gonad v pozni jeseni pred obdobjem hibernacije. Kritična točka pri teh vrstah je, da morajo biti sposobni ohraniti spermo in jajčeca med hibernacijo ali estivacijo. Ponovna rast gonad se prične takoj po začetku parjenja na podoben način pri obeh načinih spolnega cikla (10).



Slika 14: Shematski oris dveh tipov spolnega cikla želv osnovan na gametogenezi in parjenju (povzeto po Lichtu, 1984) (10).

Na sliki 14 sta prikazana oba tipa spolnih ciklov. Orisani sta spermatogeneza (modre celice) in folikularna rast (rumene celice).

Figure 14: Schematic description of the two types of gonadal cycle in turtles based on gametogenesis and mating (adopted from Licht, 1984) (10).

On Figure 14 both types of reproductive cycles are presented. Spermatogenesis (blue cells) and follicular growth (yellow cells) are outlined.

Kuchling (1982) je v svoji raziskavi v Črni gori opisal, da grška kornjača kaže poparitveni cikel. Spermatogeneza se začne po hibernaciji in med obdobjem parjenja od aprila do maja. Vrhunec doseže julija in avgusta. Spomladi endogeni faktorji kot tudi naraščajoča temperatura sprožijo začetek spermatogeneze. Temperaturni prag za pričetek spermatogeneze se nahaja na področju okoljske temperature med 21 in 26 °C. Gonadna regresija v jeseni je posledica nizkih temperatur in kratke fotoperiode, ki vplivajo na fiziološko stanje samcev (61).

V obdobju parjenja grške kornjače (april in maj pri *Testudo hermanni hermanni* ter maj in junij pri *Testudo hermanni boettgeri*) je nadmodek najtežji, v juniju upade, nato ponovno narašča. Spermatogeneza se nadaljuje celo poletje, vrh doseže konec julija (*Testudo hermanni hermanni*) oz. avgusta (*Testudo hermanni boettgeri*). Jeseni sledi padec proizvodnje. V tem času semenčice preidejo iz mod v nadmodek, kjer se hranijo do pomlad. Pri *Testudo hermanni boettgeri* so ugotavljali rahel dvig testosterona v aprilu (primerjalno z oktobrom/novembrom), z manjšimi vrednostmi v maju in juniju pred strmim dvigom poleti. Pri *Testudo hermanni hermanni* je bil rahel dvig testosterona v marcu (primerjalno z oktobrom), z manjšimi vrednostmi v aprilu vse do junija, pred strmim dvigom poleti. Ugotovili so, da po hibernaciji naraste testosteron pri obeh podvrstah na približno isti nivo kot septembra. Razlike nastanejo zaradi podnebnih razlik bivalnih področij (61, 62).

V Franciji so pri *Testudo hermanni hermanni* ugotovili nihanje koncentracije spolnih steroidov v plazmi pri osebkih iz divjine in v ujetništvu. Ugotovili so nihanje vrednosti hormonov v povezavi s spolnim ciklom. Vrednosti so bile pri samcih kot samicah višje pri prosto živečih živalih v primerjavi z živalmi v ujetništvu (62).

Moll (1989) je na podlagi sprememb spolnih organov pri samicah, ki naseljujejo zmerno topli pas, opisal štiri faze spolnega cikla: 1) večanje foliklov, 2) ovulacija in preovipozicija, t. i. intrauterino obdobje, 3) izleganje jajc oz. obdobje gnezdenja in 4) regresija foliklov in mirovanje (med reprodukcijsko sezono) t. i. latentno obdobje. Grška kornjača sledi temu letnemu ciklu. Cikel se začne z vitelogenezo pozno poleti, ki se konča naslednjo pomlad, kot pri večini vrstah zmerno toprega pasu. Vitelogenezi sledi ovulacija in intrauterino obdobje spomladi. Pretežno maja in junija poteka gnezdenje (63).

Pri na novo ujetih želvah vrste navadna hlastavka (*Chelydra serpentina*, ang. Common Snapping Turtle) so proučevali sezonski spolni cikel ter vpliv ujetništva kot stresnega faktorja. Ovarialni in testikularni cikel je bil krajiš kot pri drugih sladkovodnih želvah; cikel se je začel v sredini maja in končal v začetku septembra, takoj po zaključeni rasti gonad in dozorevanja.

Pri samicah so progesteron, estradiol in testosteron visoko korelirani z rastjo foliklov in vitelogenezo. Ovulacija v ujetništvu in pod naravnimi pogoji je potekala v drugi polovici maja. V ujetništvu je ovulacija potekala zelo hitro, 24 do 48 ur. Ko so se folikli spustili v rogova maternice, je signifikantno narasel estradiol in progesteron. Jajca so ostala v materničnih rogovih približno dva tedna pred izleganjem jajc. Pri samcih je bil testosteron v signifikantni korelaciji z rastjo mod in spermiacijo. Dvorjenje in parjenje je potekalo spomladti, poleti in jeseni. Želve v ujetništvu so kazale drugačne vzorce in odgovore na stres, verjetno v povezavi s hormonalnimi vrednostmi in stanjem gonad (64).

2.4 GENETSKI PRISTOP K PROUČEVANJU POPULACIJ GRŠKE KORNJAČE

2.4.1 Populacijska genetika

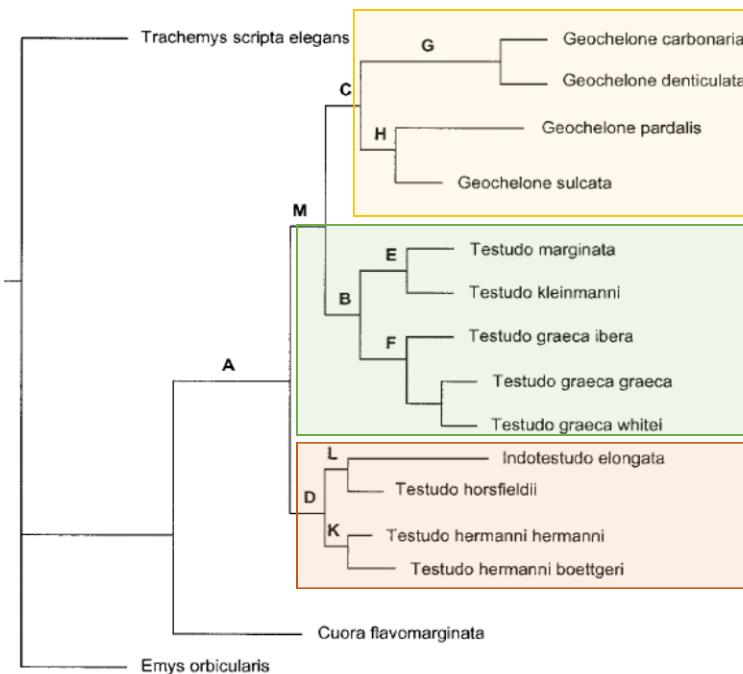
Presoja genetske variabilnosti in strukture populacij je pomemben dejavnik za ustrezno načrtovanje upravljavskih ukrepov v ogroženih populacijah. Ker fenotipska variabilnost pogosto ne daje dovolj objektivne in natančne slike stanja populacij in njihovih medsebojnih odnosov, je v zadnjih dveh desetletjih uporaba molekulskih označevalcev za opis in presojo stanja biotske pestrosti postala nepogrešljivo orodje za oblikovanje argumentiranih in čim bolj nepristranskih odločitev pri upravljanju s populacijami. Pri tem predvsem pri vrstah, na katerih še ni bilo obsežnejših genetskih raziskav, uporabljamo genetske označevalce, ki jih lahko kljub skromnemu vedenju o genomu vrste, ki jo proučujemo, sorazmerno hitro razvijemo in prilagodimo raziskovalnemu objektu. V tem kontekstu zavzemata mitohondrijska DNK in mikrosatelitni označevalci pomembno mesto. Za mitohondrijsko DNK (mtDNK) velja za večino živalskih vrst maternalni način dedovanja, kar pomeni, da imajo vsi potomci ene samice isti, materin mitohondrijski haplotip. Z izbiro začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje odsekov mtDNK v bolj konzerviranih delih mitohondrijskega genoma lahko hitro zagotovimo zanesljivo podvajanje odsekov mtDNK s polimerazno verižno reakcijo (PCR), kar nam omogoča pridobivanje materiala za sekvenčno analizo. S proučevanjem nukleotidnega zaporedja mtDNK lahko sledimo maternalnim linijam skozi generacije in ocenimo število in genetsko sorodnost ženskih osebkov, ki so imeli največjo vlogo pri formiraju populacije. Zaradi relativno visoke stopnje mutacij v mtDNK lahko v večini populacij opazujemo zadostno raznolikost haplotipov mtDNK, ki nam omogoča oceno genetske pestrosti v proučevanih populacijah (65).

Ker mtDNK dokumentira samo maternalno dedovanje, za popolnejšo sliko dogajanja v populaciji uporabljamo tudi označevalce, ki so prisotni na jedrni DNK in so podvrženi kromosomskim rekombinacijam tekom gametogeneze pri obeh spolih. Tu igrajo pomembno vlogo mikrosatelitni označevalci (66), ki predstavljajo nize z različnim številom ponovitev kratkih nukleotidnih motivov, ki se dedujejo po Mendlovih pravilih in omogočajo objektivno oceno genetskih distanc med pripadniki znotraj populacij in med populacijami. Priprava ciljanih genomskeh knjižnic, ki vsebujejo lokuse, na katerih se nahajajo kratki, ponavljajoči se motivi, ne zahteva dostopa do genomskeh informacij vrste, ki jo proučujemo, in zato ponuja dobro možnost za vzpostavitev sistema genetskih označevalcev tudi za vrste, za katere še nimamo sekvenciranega genoma ali njegovih odsekov. Kombinacija obeh tipov genetskih označevalcev nam omogoča oceno osnovnih populacijskih parametrov in odnosov med populacijami.

2.4.2 Uporaba mitohondrijske DNK in mikrosatelitov pri želvah

Za razjasnitev medpopulacijskih odnosov med geografsko definiranimi populacijami rodu *Testudo* so pogosto uporabljali sekvene delov mitohondrijske DNK (mtDNK), najpogosteje približno 400 baznih parov (bp) dolg odsek gena za 12S rRNK (67). Na osnovi teh podatkov so lahko ločili dve skupini (slika 15) znotraj populacije mediteranskih želv rodu *Testudo* (67):

- skupina 1: *Testudo graeca*, *Testudo marginata* in *Testudo kleinmanni*
- skupina 2: *Testudo hermanni* (*Testudo hermanni hermanni* in *Testudo hermanni boettgeri*), *Testudo horsfieldii* in *Indotestudo elongata*.



Slika 15: Ločitev vrst in podvrst znotraj populacije mediteranskih želv na osnovi 12S rRNK (povzeto po van der Kuyl, 2002) (67).

Na sliki so v rumenem okvirčku označene nemediteranske želve vrste *Geochelone*, v zelenem okvirčku podvrsti *Testudo marginata* in *Testudo graeca*, v oranžnem okvirčku pa podvrsti *Testudo hermanni hermanni* in *Testudo hermanni boettgeri*.

Figure 15: Species and subspecies differentiation within the population of Mediterranean tortoises based on 12S rRNA (adopted from van der Kuyl, 2002) (67).

On the figure non-Mediterranean tortoises *Geochelone* species are marked by yellow frame, subspecies *Testudo marginata* and *Testudo graeca* by green frame and subspecies *Testudo hermanni hermanni* and *Testudo hermanni boettgeri* by orange frame.

Znotrajvrstno variabilnost so proučevali pri mavrski kornjači (*Testudo graeca*) in grški kornjači (*Testudo hermanni*), pri čemer so opazili znatno višjo stopnjo variabilnosti znotraj *Testudo graeca*, kar je verjetno posledica zmanjšanja genetske pestrosti v populaciji *Testudo hermanni*, ki jo je verjetno povzročila zadnja ledena doba v severni in srednji Evropi. Isti odsek mtDNK so uporabili tudi za analizo populacij *Testudo hermanni* v Italiji, na Siciliji in v Španiji (68), kjer so našli sedem različnih haplotipov, ki so jasno ločili variabilno populacijo kornjač iz severne Italije od bolj homogenih populacij na Siciliji in v Španiji. Zanimivo je, da so nukleotidna zaporedja, ki so jih našli pri severnoitalijanskih populacijah grške kornjače, kazala visoko stopnjo podobnosti s sekvencami osebkov z Balkana in iz Grčije, ki so bili fenotipsko klasificirani kot *Testudo hermanni boettgeri*. Jasno ločitev vrst znotraj rodu *Testudo* so lahko pokazali s sekvenciranjem evolucijsko manj ohranjenega fragmenta mtDNK, ki kodira citokrom b (69).

Na osnovi teh podatkov so predlagali, da predstavlja širokoroba kornjača (*Testudo marginata*) in egiptovska kornjača (*Testudo kleinmanni*) sestrsko skupino vrste *Testudo graeca*, vse tri vrste skupaj pa predstavljajo sestrsko skupino *Testudo hermanni*. Filogenijo mediteranskih želv so rekonstruirali z mtDNK analizo muzejskih vzorcev (70), pri čemer so ugotovili, da je razlikovanje nekaterih vrst znotraj rodu *Testudo* še vedno problematično. Veliko pestrost mtDNK haplotipov znotraj grške kornjače (*Testudo hermanni*) je pokazalo sekvenciranje regije, ki kodira citokrom C oksidazo, in so jo uporabili za primerjavo zahodno evropske in balkanske populacije grške kornjače (7). Potrdili so lahko monofletski izvor zahodno mediteranskih populacij, ki so imele sedem zelo podobnih haplotipov, in vsaj tri skupine balkanskih populacij, v katerih so našli 15 dokaj različnih haplotipov. Genetske distance med balkanskimi skupinami so bile podobne distanci med zahodno mediteransko in balkansko skupino (7).

Analiza zahodno mediteranskih populacij je pokazala obstoj štirih afriških linij, ki skupaj tvorijo dobro podprto klado, ki predstavlja eno od šestih glavnih klad znotraj vrste *Testudo graeca*, odnosi med severno afriškimi populacijami so slabše podprtji (71).

Podobno so zastopanost mtDNK haplotipov, ki se večinoma ujema z razmejitvijo fenotipskih podvrst, lahko uporabili za ločevanje populacij v Severni Afriki z izjemo podvrst *Testudo graeca graeca*, *Testudo graeca whitei*, *Testudo graeca lamberti* in *Testudo graeca marokkensis*, ki jih ni mogoče zanesljivo razlikovati. Zanimiva je tudi primerjava različnih genetskih markerjev pri rekonstrukciji genetskega toka med populacijami *Testudo graeca*, v kateri so ugotovili, da na osnovi mtDNK lahko razlikujemo tri jasno ločene veje znotraj *Testudo graeca*, na osnovi analize AFLP označevalcev je možna ločitev le dveh skupin, mikrosatelitni markerji pa nakazujejo le šibko diferenciacijo in intenziven pretok genov med skupinami (72). Podobno kot pri sesalcih (73, 74), se tudi pri nekaterih vrstah želv pojavlja prisotnost več kot enega mtDNK haplotipa pri posameznem osebku, tako imenovana heteroplazmija (75).

Za spremljanje dedovanja jedrne DNK pogosto uporabljamo mikrosatelitne markerje, ki zaradi svojega kodominantnega načina dedovanja, relativno velikega števila alelov in seleksijske nevtralnosti predstavljajo nepogrešljivo orodje za oceno genetskih distanc med populacijami in za odkrivanje genetske strukturiranosti populacij. Uporaba mikrosatelitnih markerjev je tudi omogočila uspešno ločevanje podvrst *Testudo hermanni hermanni* in *Testudo hermanni boettgeri* (76).

Obsežnejša analiza mediteranskih populacij grške kornjače na 22 lokacijah z devetimi mikrosatelitnimi označevalci je pokazala veliko genetsko diferenciranost geografsko ločenih populacij, ki pripadajo zahodni (*Testudo hermanni hermanni*) in vzhodni (*Testudo hermanni boettgeri*) podvrsti (77). Kontaktno cono med obema podvrstama so v tej študiji zaznali zahodneje, kot je bila predhodno predlagana na osnovi morfoloških markerjev in jo verjetno determinira delta reke Pad. Presenetljivo podobnost med populacijami v Španiji, na Siciliji in na Korziki je verjetno povzročilo izumrtje nekaterih populacij zaradi klimatskih sprememb v paleolitiku in kasnejših migracij, ki so bile posledica človekovega posredovanja s preseljevanjem osebkov v neolitiku (77). Mikrosatelitni markerji so tudi dobro orodje za rekonstrukcijo rodovnikov in genetsko identifikacijo posameznih osebkov, kar so uporabili v forenzični študiji, kjer so proučevali tatvino šestih osebkov mavrske kornjače (*Testudo graeca*) (78). Relevantnost genetskih podatkov za oceno genetske pestrosti in demografskih trendov v osmih zahodnih populacijah *Testudo hermanni hermanni* so preverili v študiji, kjer so za genotipizacijo španskih, francoskih in italijanskih populacij uporabili set 17 mikrosatelitnih markerjev (15).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 REPRODUKCIJA GRŠKIH KORNJAČ V VZREJI

3.1.1 Osnovni pogoji reje

Raziskava, kjer smo poučevali prvo hipotezo, je potekala na veliki farmi želv v Sloveniji. Proučevali smo grške kornjače, podvrsto *Testudo hermanni boettgeri*. Odrasle grške kornjače prebivajo v zunanjih ogradah, ki so velike 60 do 500 m² (slika 16). Glede na velikost posameznih obor prebiva v posamezni obori 70 do 750 želv. Od izvalitve jajc do starosti treh let so mladiči nastanjeni v zaprti stavbi (slika 17). Obore so ograjene z žičnato ograjo. Ograja sega 20 cm v globino pod zemljo z dodatno zaščito s 30 cm valovitkami, ki segajo 10 cm nad površino tal in preprečujejo pobeg mladičev. Skupna ograja dodatno varuje celotno farmo.



Slika 16: Farma želv. (vir: Stvarnik, 2013)

Zunanje obore na farmi so obdane z zaščitno mrežo. Vidijo se lesene hiške, ki omogočajo zavetje kornjačam.

Figure 16: The tortoise farm. (source: Stvarnik, 2013)

The outdoor enclosures on the farm are surrounded by a safety net. Wooden barracks that provide shelter are seen.



Slika 17: Terariji. (vir: Stvarnik, 2013)

V notranjih prostorih farme se nahajajo terariji, kjer gojijo mlade kornjače. Terarij osvetljujejo in ogrevajo s pomočjo UV žarnic.

Figure 17: Terrariums. (source: Stvarnik, 2013)

Inside the farm are terrariums where young tortoises are breed. The terrarium is illuminated and heated by UV lights.

3.1.2 Delo na farmi

Petdeset samic in dvanajst samcev, starih od 10 do 22 let, je predstavljalo našo preiskovano skupino *Testudo hermanni boettgeri*. Živali so prebivale v skupni obori že pred začetkom naše preiskave. Ves čas raziskave, ki je trajala tri leta (od 2013 do 2015), so kornjače prebivale v obori velikosti 3 x 20 metrov. V prvem letu raziskave so vse odrasle želve prebivale skupaj v isti obori, dokler so kazale znake parjenja. Znotraj sezone parjenja prvo leto so se tako lahko prosto parile in gibale znotraj obore. Ob koncu paritvenega obdobja, to je konec meseca maja, smo vse samce preselili v sosednjo oboro. Naslednji dve sezoni smo samce in samice fizično ločili. Ločeni so bili z mrežo in vmesnim prehodom.

Želve so se pred in v času raziskave hranile s svežo rastlinsko hrano, kot je trava, zelenjava, sezonsko sadje. Hibernacija je potekala v isti obori od konca oktobra do sredine aprila. Vse želve so bile leta 2012 označene z mikročipom, tako smo lahko individualno spremljali vseh petdeset samic (79). Pred začetkom raziskave smo vse samice stehtali. Najtežja želva je tehtala 1281 g in najlažja 678 g.

3.1.3 Merjenje in hramba izvaljenih jajc

Za hitrejše prepoznavanje samic ob izleganju jajc smo jih na karapaksu dodatno oštevilčili s permanentno bravo. Želve so bile večkrat na dan opazovane in pregledane. Mesto, kjer je želva izkopala luknjo in izlegla jajca, smo označili s palico in številko želve. Po končanem zakopavanju jajc smo le te previdno odkopali, oštevilčili, stehtali (na 0,1 g natančno), izmerili dolžino ter širino jajca s kljunastim merilom (na 0,05 mm natančno) (slika 18). Po opravljenih meritvah smo jih premestili v inkubator znotraj šestih ur po končanem izleganju. Z vsemi jajci smo rokovali na enak način. Čas izleganja jajc je potekal od začetka junija do začetka julija.

Tudi pogoji umetne inkubacije so bili za vsa jajca enaki. Temperatura v inkubatorju se je gibala med 31 in 32 °C. Temperaturo smo merili s pomočjo termometra v inkubatorju. Jajca smo položili na substrat (vermikulit), ki smo ga občasno navlažili (slika 19). Relativna vlaga v inkubatorju je znašala 80 %. Vlago v inkubatorju smo merili s pomočjo meritca vlage.



Slika 18: Merjenje velikosti jajca s kljunastim merilom. (vir: Stvarnik, 2013)



3.1.4 Pregled neizvaljenih jajc (valilniški ostanek)

V raziskavi smo v času inkubacije spremljali čas izvalitve. Vsa preostala jajca (t. i. valilniški ostanek), iz katerih se želve niso izvalile, smo na koncu valilne sezone pregledali. Opazovali smo ali so bila jajca oplojena in ali lahko ugotovimo vzrok zamrtja plodu. Vsa jajca smo v secirnici ponovno izmerili in stehtali. Na podlagi vsebine smo ocenili, ali je jajce oplojeno ali ne. Če je bilo oplojeno, smo zarodek razdelili v tri razvojne skupine: zgodnja stopnja razvoja, srednja stopnja razvoja in pozna stopnja razvoja. Med pregledom valilniškega ostanka smo spremenjeno vsebino jajca vzorčili s pomočjo vatiranke (Invasive sterile EUROTUBO® Collection swab, Deltalab, Španija). Vzorce smo poslali na nadaljnje bakteriološke in mikološke preiskave.

Vzorce so v bakteriološkem laboratoriju inokulirali na krvnem agarju (Blood agar base No. 2 Oxoid, Hampshire, UK, obogaten s 5-% ovčjo krvjo), Uri Select agarju (Biorad) in Sabouraud dekstroznem agar (Oxoid, Basingstoke, UK) s kloramfenikolom (100 mg/L). Inkubacija je trajala med 24 in 96 ur na 30 °C. Bakteriološke značilnosti so bile podane na osnovi morfoloških značilnosti kolonij, barvanju po Gramu in na biokemičnih reakcijah: oksidativna-fermentacija (O-F), indol, oksidaza in katalaza.

Za obdelavo podatkov smo uporabili Microsoft Excel software. Za statistične analize smo uporabili Spearmanove korelacije med maso posamezne želve in številom njenih izleženih jajc ter med maso želve in povprečno maso njenih jajc.

3.2 KEMIJSKA SESTAVA ŽELVJIH JAJC

3.2.1 Opazovana skupina samic

Raziskava je potekala na isti farmi želv v Sloveniji kot raziskava o reprodukciji grških kornjač v ujetništvu v poglavju številka 3.1. Tudi tokrat smo proučevali jajca grške kornjače (podvrsta *Testudo hermanni boettgeri*) vendar v drugi skupini želv oz. v drugi obori. Ta skupina samic, ki smo jo proučevali, je živela v isti zunanjem obori vse leto. Povprečna starost samic te skupine je bila v času poskusa 30 let (od 28 do 32 let), njihova povprečna telesna masa je presegala 2000 g (od 2013 g do 2454 g). Prehrana skupine je bila enaka, torej osnovana na rastoči travi v sami obori in dodajanju sezonske zelenjave in sadja.

3.2.2 Odvzem jajc in delo v laboratoriju

Meseca junija 2014 smo zbrali 15 jajc iz treh gnezd *Testudo hermanni boettgeri* (slika 20), ki so bila izležena znotraj 24 ur. Naslednji dan smo v laboratoriju posamezno jajce stehtali na 0,01 g natančno ter izmerili njegovo dolžino in širino s kljunastim merilom na 0,05 mm natančno. Ločili smo rumenjak od beljaka ter stehtali beljak, rumenjak in lupino posameznega jajca posebej. Ker vsebina enega jajca ne bi zadostovala za vse načrtovane analize, smo po končanem tehtanju združili beljake vseh 15 jajc in jih pred analizo homogenizirali s pomočjo laboratorijskega mlina. Enako smo naredili tudi z lupinami in rumenjaki. Tako po pripravi skupnih vzorcev smo izmerili lomni količnik beljaka in rumenjaka z Abbejevim refraktometerom (Abbe Refraktometer Carl Zeiss Jena – Type G 08, Nemčija) ter vrednost pH beljaka s pH metrom (PHM210 Radiometer, Meter Lab, Danska). Nato smo vzorce shranili v zamrzovalnik (-20°C) za nadaljnje analize.



Slika 20: Jajce grške kornjače. (vir: Stvarnik, 2013)

Slika predstavlja celo jajce grške kornjače in vsebino neoplojenega jajca.

Figure 20: The Hermann's Tortoise egg. (source: Stvarnik, 2013)

The figure represents the whole Hermann's Tortoise egg and the contents of the unfertilised egg.

Za določitev kemijske sestave in maščobno-kislinske sestave ter za vsebnost aminokislin in elementov v sledovih v vzorcih smo uporabili validirane analizne metode. Analize smo izvedli v dveh ponovitvah. Vsebnost vode v vzorcih smo določili s sušenjem pri 102 °C do konstantne teže (sušilnik, Kambič SP-45C; Slovenija) ter celokupni pepel s sežigom vzorca v žarilni peči (G8-1206/A, Zlatarna Celje, Slovenija) pri 550 °C. Vsebnost celokupnih beljakovin smo določili posredno z ugotavljanjem količine dušika v vzorcu z metodo po Kjeldahlu. V ta namen smo vzorce razklopili s koncentrirano žveplovo(VI) kislino ob dodatku katalizatorja (Digest Automat K-438, Büchi, Švica). Sledila je destilacija z vodno paro ob dodatku močnega hidroksida (KjelFleks K-360, Büchi, Švica). Sproščen amonijak smo uvajali v raztopino borove kisline in nato titrirali s standardno raztopino žveplove(VI) kisline (titrator Metrohm 877 Titrino plus, Švica). Za izračun beljakovin smo ugotovljeno vsebnost dušika pomnožili s faktorjem 6,25. Celokupna maščoba je bila določena z Weibull-Stoldtovo metodo. Vzorec smo razgradili z vročo klorovodikovo kislino, da smo razkrojili beljakovine in sprostili vezano oz. ujeto maščobo. Izločeno maščobo smo odfiltrirali in ekstrahirali z organskim topilom v Soxhletovem ekstraktorju (Büchi B-811, Švica). Za določitev maščobno-kislinske sestave rumenjaka je bila uporabljena plinska kromatografija s plamensko-ionizacijskim detektorjem (GC-FID). Za to analizo je bilo treba predhodno pripraviti metilne estre maščobnih kislin.

Maščobo smo raztopili v heksanu, dodali 2 M kalijev hidroksid v metanolu, premešali in pogreli na 70 °C. Tako je potekla hidroliza maščob, ki ji je sledila tvorba metilnih estrov maščobnih kislin. Delež metilnih estrov maščobnih kislin v vzorcu smo določili s plinsko kromatografijo z uporabo plinskega kromatografa Agilent Technologies 5890 series II plus s FID detektorjem in kapilarno kolono HP-88 (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm; Agilent Technologies, ZDA). Triptofan v beljaku je bil določen z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC), ostale aminokisline v beljaku so bile določene s pomočjo GC-FID. V lupini, beljaku in rumenjaku je bila koncentracija elementov v sledovih določena po razklopu vzorcev v zaprtem mikrovalovnem sistemu z dušikovo(V) kislino in vodikovim peroksidom (Milestone, Start D, Italija) s pomočjo induktivno sklopljene plazme z masno selektivno detekcijo (ICP-MS) (Varian 820-MS, Avstralija).

Za obdelavo podatkov smo uporabili Microsoft Excel software.

3.3 SPOLNI HORMONI IN NJIHOVI METABOLITI V IZTREBKIH ŽELV

Raziskava je potekala pri gojitelju, ki ima v svoji rejti manjše število grških kornjač (podvrsta *Testudo hermanni boettgeri*). Tokrat smo vključili štiri odrasle samice, štiri odrasle samce in štiri mlade samce *Testudo hermanni boettgeri*. Odrasle samice in samci so bili iz narave odvzeti pred več kot 24 leti; njihova starost v času poskusa je bila več kot 26 let. Mladi samci so bili izvaljeni 2007 in 2008 in so bili v času poskusa stari šest oz. sedem let. Področje izvora odraslih živali je bila severovzhodna obala Jadranskega morja z zaledjem (med Zadrom in Splitom, Hrvaška). Posamezne želve so bile označene z mikročipom leta 2012.

Želve so bile nastanjene v skupni obori. Velikost obore je bila 2 x 4,5 metra. Skozi celotno aktivno sezono so živali poleg trave, ki je rastla znotraj obore, dnevno prejemale dodatno sezonsko raznovrstno hrano, kot so radič, rukola, vrtna kreša, solata, regrat, marjetice, detelja, hibiskus in listi vinske trte.

3.3.1 Vzorčenje iztrebkov

Odvzem vzorcev je potekal od sredine maja do začetka oktobra 2014. Vzorce smo shranili v plastične posodice z navojem, takoj zamrznili in hrани na -22 ± 2 °C do nadalnjih analiz. Analizo metabolitov hormonov v tako shranjenih vzorcih smo opravili znotraj šest mesecev po odvzemu.

3.3.2 Postopek ekstrakcije spolnih hormonov in njihovih metabolitov

Pred postopkom ekstrakcije, ki je bil enak za vse izmerjene hormone, smo vzorce iztrebkov odtalili na sobni temperaturi. Z elektronsko tehtnico (Exacta 1200 EB, Tehnica Železniki, Slovenija) smo odtehtali po 0,5 g iztrebka v 15-ml plastične epruvete (REF 62.554.009, Sarstedt, Nemčija). V epruveto smo nato dodali po 3 ml metanola (Methanol, gradient grade for liquid chromatology, Merck, Nemčija) in 2,5 ml redestilirane vode. Zaprte epruvete smo 30 minut stresali pri 500 obratih na minuto na električnem stresalniku (Vibromix 313 EVT, Tehnica Železniki, Slovenija). Nato smo epruvete centrifugirali na 4 °C pri 2500 obratih na minuto (centrifuga ROTINA 420R, Hettich, Nemčija). Po končanem centrifugiranju smo z vrha tekočine v epruveti s precizno pipeto prenesli po 0,5 ml ekstrakta v 1,2-ml plastične epruvete (REF.781520, BRAND, Nemčija).

Ekstrakte smo do analiz shranili na -22 ± 2 °C. Pred analizo smo po 50 µl ekstrakta razredčili v razmerju 1:10 s fosfatnim pufom (pH = 7,4). Tako pripravljene ekstrakte iztrebkov smo uporabili za določanje koncentracij metabolitov vseh proučevanih hormonov (progesterona, estradiola in testosterona) z encimsko-imunske metodo (Enzyme Linked Immunosorbent Assay; ELISA).

3.3.3 Izvedba encimsko-imunskega postopka (ELISA)

Kvantitativno vsebnost hormonov v iztrebkih 131 vzorcev smo določali s tovarniško izdelanimi kompleti v skladu z navodili proizvajalca, ki so bila podana s posameznimi kompleti. Encimsko-imunske metode določanja hormonov v krvnem serumu temeljijo na kompetitivni vezavi naravnega hormona in z encimom alkalna fosfataza označenega hormona (ki predstavlja antigen) na omejeno število specifičnih protiteles proti temu hormonu, vezanih na stene jamic mikrotiterske plošče. Vse komponente testa, razen vezanih na stene jamic, se po inkubaciji izperejo. Količina označenega hormona, ki ostane v jamicah, je obratno sorazmerna z vsebnostjo v preiskovanem vzorcu. Količina označenega vezanega hormona se izmeri spektrofotometrično (s filtrom 405 nm) po reakciji alkalne fosfataze z njenim substratom v drugi inkubaciji. Iz standardne krivulje, pripravljene s kalibratorji znanih koncentracij, se vrednost hormona določi na osnovi absorbanc testnih vzorcev. Intenzivnost obarvanja vzorcev je obratno sorazmerna s količino hormona v vzorcu (ob odsotnosti hormona je obarvanje intenzivno modro, ob prisotnosti hormona pa svetlo modro ali celo brezbarvno).

Za določanje koncentracije progesterona smo uporabili komplet OVUCHECK® PLASMA ELISA kit (Biovet inc., Kanada). Za pripravo standardne krivulje smo uporabili kalibratorje s koncentracijami progesterona 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL in 30 ng/mL. Koeficient variacije za meritve je bil 7,9 % za nizke vrednosti ($\bar{x} = 1,5 \pm 0,12$ ng/mL) in 9,65 % za visoke ($\bar{x} = 27,16 \pm 2,93$ ng/mL).

Za določanje koncentracije estradiola smo uporabili komplet 17 beta-Estradiol ELISA (DE52041, Demeditec Diagnostics GmbH, Nemčija). Za pripravo standardne krivulje smo uporabili kalibratorje s koncentracijami 25 pg/mL, 100 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL in 2000 pg/mL. Koeficient variacije za meritve je bil za nizke vrednosti 6,81 % ($\bar{x} = 91,09$ pg/mL) in 4,13 % za visoke ($\bar{x} = 307,71$ pg/mL).

Za določanje koncentracije testosterona smo uporabili komplet Testosterone ELISA (DE1559, Demeditec Diagnostics GmbH, Nemčija). Za pripravo standardne krivulje smo uporabili kalibratorje s koncentracijami 0,2 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 6 ng/mL in 16 ng/mL. Koeficient variacije za meritve je bil 4,16 % za nizke vrednosti ($\bar{x} = 0,73$ ng/mL) in 3,34 % za visoke ($\bar{x} = 11,26$ ng/mL).

3.3.4 Merjenje vsebnosti hormonov v iztrebkih

Pri encimsko-imunskih postopkih smo absorbanco kalibratorjev in testnih vzorcev merili s spektrofotometrom MULTISCAN FC (Thermo Scientific, ZDA) s pripadajočim računalniškim programom za pripravo standardne krivulje in izračun koncentracij preiskovanih vzorcev.

Pri odčitavanju rezultatov smo dobili vsebnosti metabolitov hormonov (progesterona, testosterona in estradiola) v enem mililitru razredčenega ekstrakta. Za izračun vsebnosti hormona v gramu iztrebkov smo izmerjeni rezultat pomnožili s faktorjem 11.

Za obdelavo podatkov smo uporabili Microsoft Excel software.

3.4 GENETSKE ANALIZE

V letih 2014 in 2015 smo s pomočjo bukalnega brisa (FLOQSwabs® 502CS01 in 4N6FLOQSwabs™ tube z eNAT – 2 ml zaščitnim medijem za nukleinske kisline (REF 606C); COPAN, Brescia, Italija) vzorčili 288 kornjač: od tega 188 grških kornjač *Testudo hermanni* (123 *Testudo hermanni boettgeri*, 46 *Testudo hermanni hercegovinensis* in 19 *Testudo hermanni hermanni*), 58 mavrskih kornjač *Testudo graeca* in 42 širokorobih kornjač *Testudo marginata*. Vrsto in spol smo določili na podlagi fenotipskih znakov. Izbrane predstavnike posameznih vrst smo navedli v tabeli 1.

Ujeti kornjači smo fiksirali vrat in vzeli bris iz področja ustne votline. Bris smo shranili v pripadajočo epruveto, ki je vsebovala medij za ohranitev DNK. Do nadaljnje obdelave vzorcev v laboratoriju smo brise hranili v skrinji na –80 °C.

DNK smo izolirali s komercialnim kitom (DNeasy Blood & Tissue Reagent Kit, Qiagen, Hilden, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca. Število pridobljenih in analiziranih vzorcev (ločeno za analizo mtDNK in analizo mikrosatelitnih lokusov) posameznih vrst, podvrst in geografskih lokacij je podano v tabeli 1.

Tabela 1: Seznam vzorcev.

Table 1: List of samples.

Oznaka/ Mark	Vrsta in lokacija/ Species and location	Št. vseh vzorcev/No. of all samples	Št. analiziranih vzorcev/No. of analysed samples (mtDNA/mtDNA)	Št. analiziranih vzorcev/No. of analysed samples (mikrosateliti/ microsatellites)
THB-Cro	<i>Testudo hermanni boettgeri</i> / prosto živeče, Hrvaška	18	16	7
THB-Si	<i>Testudo hermanni boettgeri</i> / ujetništvo, Slovenija	42	30	21
THB-Srb	<i>Testudo hermanni boettgeri</i> / ujetništvo, Srbija	42	35	9
THB-Mne	<i>Testudo hermanni boettgeri</i> / prosto živeče, Črna gora	21	10	6
THH-Si	<i>Testudo hermanni hermanni</i> / ujetništvo, Slovenija	9	5	9
THH-It	<i>Testudo hermanni hermanni</i> / ujetništvo, Italija	10	7	9
THHz-Si	<i>Testudo hermanni hercegovinensis</i> / ujetništvo, Slovenija	46	22	26
TG-Si	<i>Testudo graeca</i> / ujetništvo, Slovenija	58	33	0
TM-Si	<i>Testudo marginata</i> / ujetništvo, Slovenija	42	30	0
Skupaj/ Total		288	188	87

3.4.1 Mikrosateliti

3.4.1.1 Vzorci in genotipizacija

Analizirali smo 87 izbranih vzorcev iz sedmih populacij *Testudo hermanni* (tabela 1). Genotipizacijo smo izvedli na 10 mikrosatelitnih lokusih: Test56, Test76, Test21, GmuA19, Leo21, GmuD51, Test71, Leo56, Leo71 in GmuB08 (16). Test mikrosatelitnih lokusov je potekal v štirih multipleks reakcijah, kjer smo lokusa Test56 in Test76 združili v prvi, lokuse GmuD51, Leo21 in Test21 v drugi, lokusa Leo71 in GmuB08 v tretji ter lokuse GmuA19, Test71 in Leo56 v četrti verižni reakciji s polimerazo (tabela 2).

Tabela 2: Multipleks reakcije PCR.

Table 2: Multiplex reactions PCR.

Multipleks reakcija/ Multiplex reaction	Mikrosatelitni lokusi/ Microsatellite loci	Denaturacija/ Denaturation	Prileganja začetnih nukleotidov/ Annealing	Sinteza*/ Synthesis*
multipleks/multiplex I	Test56, Test76	94 °C / 1 min	55 °C / 1 min	72 °C / 1 min
multipleks/multiplex II	GmuD51, Leo21, Test21	94 °C / 1 min	55 °C / 1 min	72 °C / 1 min
multipleks/multiplex III	Leo71, GmuB08	94 °C / 1 min	56 °C / 1 min	72 °C / 1 min
multipleks/multiplex IV	GmuA19, Test71, Leo56	94 °C / 1 min	57 °C / 1 min	72 °C / 1 min

* Zadnji korak sinteze je bil podaljšan za 4 minute na 72 °C, pomnoževanje je teklo 34 ciklov. Po uspešno zaključenem pomnoževanju smo reakcijo ohladili na 4 °C. / Last step of synthesis was prolonged for 4 min at 72 °C, amplification was run for 34 cycles. After PCR, the reactions were cooled down to 4 °C.

Pridelke verižne reakcije s polimerazo smo analizirali s kapilarno elektroforezo na genetskem analizatorju ABI Prism 3100. Genotipizacijo smo izvedli s pomočjo programske opreme ABI PRISM® DNA GeneScan™ Analysis Software, v.3.7 (orodje GeneMapper), kjer smo za vsak lokus definirali dolžinske intervale za posamezne alele.

3.4.1.2 Analiza populacijskih parametrov

Za izračun populacijskih parametrov (število alelov, efektivno število alelov, informativnost, opazovana heterozigotnost, pričakovana heterozigotnost, nepristranska pričakovana heterozigotnost, fiksacijski indeks, aritmetična sredina in standardna napaka aritmetične sredine) smo uporabili orodje GenALex (80). Analizo glavnih komponent (Principal Component Analysis, PCA) smo izvedli s pomočjo knjižnice Ade4 za R (81) in tako pridobili osnovno sliko o medsebojnih odnosih med populacijami in osebki.

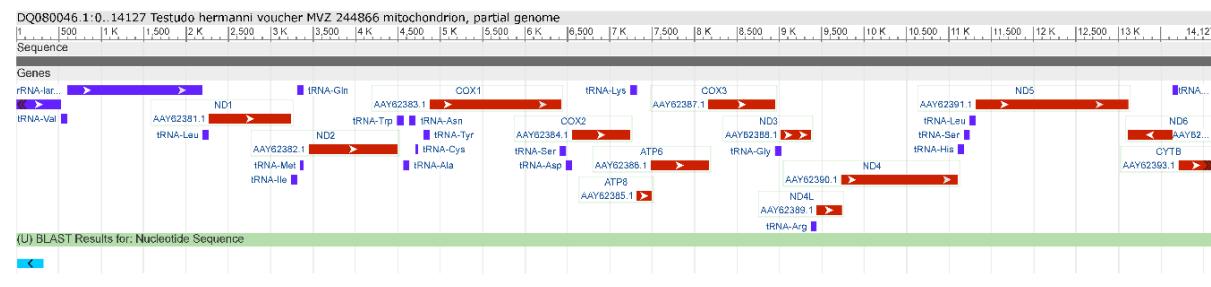
Izvedli smo tudi hierarhično analizo populacijske strukture s programom STRUCTURE (82), da bi razjasnili strukturo populacij/podvrst in morebitne povezave med njimi. MCMC veriga je tekla 100 000 generacij, potem ko smo začetnih 100 000 generacij zavrgli. Najbolj informativno število skupin K smo iskali med 1 in 8, za vsako vrednost K smo naredili deset ponovitev. Najverjetnejše število skupin smo določili s programom CLUMPAK po metodi delta K po Evannu (83). Za vizualizacijo rezultata smo uporabili program CLUMPAK. Za analizo smo uporabili model mešanja (ang. admixture model) in povezane alelne frekvence med populacijami (ang. correlated allele frequencies). Lokacij vzorčenja nismo vključili kot parameter analize.

Distance Bruvo med vzorci, ki omogočajo medvrstno primerjavo genetskih distanc ocenjenih na osnovi mikrosatelitnih lokusov, upoštevajo mutacije in niso občutljive na razlike v ploidnosti, smo izračunali s pomočjo knjižnice Poppr za R (84) in na osnovi izračunanih distanc s programom SplitsTree5 (85) narisali filogenetsko drevo.

3.4.2 Analiza mitohondrijske DNK

3.4.2.1 Vzorci in sekvenciranje

Za analizo mitohondrijske DNK smo uporabili izolate iz 188 brisov ustne sluznice grških kornjač s petih lokacij v Sloveniji, Hrvaški, Srbiji, Črni gori in Italiji ter vzorce dveh sorodnih vrst, *Testudo graeca* in *Testudo marginata* iz ujetništva v Sloveniji (tabela 1). Začetne oligonukleotide 12S-L1091 (5'-AAA AAG CTT CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT-3') in 12S-H1478 (5'-TGA CTG CAG AGG GTG ACG GGC GGT GTG T-3') smo uporabili za pomnoževanje 395 bp dolgega fragmenta gena za 12S rRNK pod pogoji, ki so navedeni v literaturi (86). Sekvenčno reakcijo smo izvedli s kompletom Applied Biosystems™ BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Fischer Scientific, ZDA) in nukleotidno zaporedje določili na ABI Prism 3100 genetskem analizatorju. Na sliki 21 je prikazana lokacija 395 bp dolgega fragmenta 12S rRNK na delni sekvenci mtDNK *Testudo hermanni*, DQ080046.1 (spodaj označen s turkizno modro barvo).



Slika 21: 395 bp dolg fragment 12S rRNK, DQ080046.1.

Figure 21: 395 bp long fragment of the 12S rRNA, DQ080046.1.

3.4.2.2 Analiza sekvenc in poravnava

Kontrolo kakovosti kromatogramov smo izvedli z orodjem DNK Baser. Sekvence slabe kakovosti smo odstranili, začetke in konci sekvenc smo odrezali. Poravnavo kromatogramov smo ročno pregledali s programom Geneious Prime 2019.2.1. Pregledane kromatograme smo izvozili kot sekvence v formatu fasta, ki smo jih skupaj z delnim zaporedjem mtDNK grške kornjače iz zbirke NCBI (DQ080046.1), ki smo ga uporabili kot referenčno zaporedje za *Testudo hermanni*, poravnali z orodjem CLC Sequence Viewer 8.0. Poravnavo smo izvozili v formatu phyphil. Sekvenčna zaporedja genov za 12S rRNK, ki smo jih pridobili v naši študiji, smo primerjali z nukleotidnimi zaporedji istega odseka mtDNK pri različnih vrstah in podvrstah *Testudo* dostopnimi v literaturi (67, 77).

3.4.2.3 Analiza haplotipov

Za identifikacijo polimorfnih mest v poravnavi in analizo haplotipov smo uporabili program DnaSP 6 (87). Mrežo haplotipov smo vizualizirali z uporabo funkcije haploNet iz knjižnice Pegas za R (88).

3.4.3 Sekvenciranje genoma grške kornjače

3.4.3.1 Izolacija DNK in priprava knjižnice

Pripravili smo dve ločeni knjižnici za sekvenciranje genoma, in sicer za samice in samce. Za vsako knjižnico (F – samice in M – samci) smo pripravili ekvimolarno mešanico genomske DNK petih samic in petih samcev, ki smo jih izolirali iz vzorcev krvi živali, ki smo jih pridobili v okviru letnega pregleda želv pri slovenskem gojitelju.

Izolacijo DNK iz krvi smo izvedli s fenolno-kloroformsko ekstrakcijo. DNK posameznih samcev in samic smo združili v skupen vzorec za vsak fenotipsko določen spol v približno ekvimolarnih razmerjih.

Genomski knjižnici smo pripravili z Agilent DNA 1000 kompletom reagentov za pripravo genomske knjižnice po navodilih proizvajalca. Kakovost knjižnice smo preverili z genetskim analizatorjem Agilent. Sekvenčno reakcijo smo izvedli s kompletom Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit po navodilih proizvajalca. Sekvenciranje obeh združenih vzorcev genomske DNA smo izvedli na Ion PGM™ sekvenatorju.

Z orodjem Golden Helix GenomeBrowse 3.0.0. smo vizualizirali poravnava odčitkov na referenčni genom. Uporabili smo zaporedje v formatu fasta in anotacije referenčnega genoma v formatu gtf. Za poravnava odčitkov na referenčni genom smo uporabili program BWA-MEM (89). Uporabljali smo orodje Galaxy (90). Za preverjanje pokritosti poravnave smo uporabili orodje Qualimap2 (91).

Kandidatne gene (tabela 23) smo poiskali z iskalnikom orodja GenomeBrowse in preverili prisotnost SNP-jev ter strukturnih sprememb v naštetih genih in njihovi okolici.

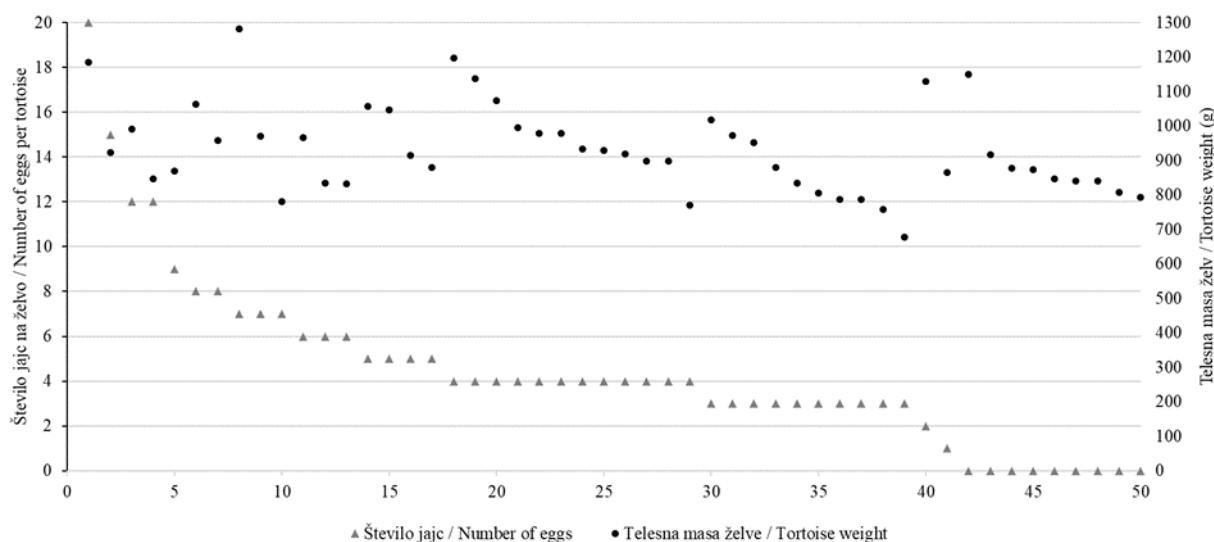
4 REZULTATI

4.1 REPRODUKCIJA GRŠKIH KORNJAČ V VZREJI

4.1.1 Izleganje jajc

Izmed 50 samic jih je prvo leto jajca izlegalo 38 (76,0 %), drugo leto 12 (24,0 %) ter tretje leto le 4 (8,0 %). Število jajc in število drugih izleganj v posameznem letu je bilo vsako leto manjše. Podatki so predstavljeni v tabeli 3.

Na sliki 22 je prikazana primerjava telesne mase želve in števila jajc na gnezdo za tri leta skupaj.



Slika 22: Primerjava telesne mase posamezne želve in števila jajca na gnezdo za obdobje treh let.

Ugotovljena je bila majhna statistično signifikantna korelacija med maso želve in številom izleženih jajc ($r = 0,312$, $p = 0,027$).

Figure 22: Comparison of the body weight of a single tortoise and the number of eggs laid per clutch over a three-year period.

There was a small but statistically significant correlation between the weight of the tortoises and the number of eggs laid ($r = 0.312$, $p = 0.027$).

V tabeli 3 je predstavljen triletni monitoring. Prikazano je število in odstotek samic, ki so izlegala jajca, ter število in odstotek jajc na gnezdo za posamezno leto znotraj triletnega opazovanja.

Tabela 3: Število in odstotek samic, ki so izlegala jajca, ter število in odstotek jajc na gnezdo.

Table 3: The number and percentage of females that laid eggs; and the number and percentage of eggs per clutch.

Prvo leto/First year							
Prvo gnezdo/ First clutch			Drugo gnezdo/ Second clutch			Gnezdi skupaj/ Both clutches od/from 7.6. do/ to 7.7.	
Št. izlegajočih samic/ No. of females laying eggs	Št. jajc/ No. of eggs (%)	Povp. št. jajc/ Avg. no. of eggs (min-max)	Št. samic/ No. of females (%)	Št. jajc/ No. of eggs (%)	Povp. št. jajc/ Avg. no. of eggs (min-max)	Št. jajc/ No. of eggs (%)	Povp. št. jajc/ Avg. no. of eggs (min-max)
38	135 (81,3)	3,6 (1–7)	10 (26,3)	31 (18,7)	3,1 (1–6)	166 (100,0)	3,5 (1–7)
Drugo leto/Second year							
Prvo gnezdo/ First clutch			Drugo gnezdo/ Second clutch			Gnezdi skupaj/ Both clutches od/from 6.6. do/to 28.6.	
Št. izlegajočih samic/ No. of females laying eggs	Št. jajc/ No. of eggs (%)	Povp. št. jajc/ Avg. no. of eggs (min-max)	Št. samic/ No. of females (%)	Št. jajc/ No. of eggs (%)	Povprečno št. jajc/ Avg. no. of eggs (min-max)	Št. jajc v primerjavi s prvim letom/ No. of eggs according to the first year (%)	Povp. št. jajc/ Avg. no. of eggs (min-max)
12	39 (95,1)	3,3 (2–4)	1 (8,3)	2 (4,9)	2,0 (2)	41 (24,7)	3,2 (2–4)
Tretje leto/Third year							
Prvo gnezdo/ First clutch			Drugo gnezdo/ Second clutch			Gnezdi skupaj/ Both clutches od/from 7.6. do/ to 3.7.	
Št. izlegajočih samic/ No. of females laying eggs	Št. jajc/ No. of eggs (%)	Povp. št. jajc/ Avg. no. of eggs (min-max)	Št. samic/ No. of females (%)	Št. jajc/ No. of eggs (%)	Povp. št. jajc/ Avg. no. of eggs (min-max)	Št. jajc v primerjavi s prvim letom/ No. of eggs according to the first year (%)	Povp. št. jajc/ Avg. no. of eggs (min-max)
4	14 (82,4)	3,5 (2–5)	1 (25,0)	3 (17,6)	3,0 (3)	17 (10,2)	3,4 (2–5)

Na slikah 23 do 29 je prikazan potek od izkopavanja gnezda, izleganja in urejanja jajc v gnezdu, namestitev v inkubator ter izleganja mladih kornjač.



Slika 23: Izkopavanje gnezda. (vir: Stvarnik, 2013)

Na sliki sta dve samice, ki odlagata jajca v izkopano luknjo v prsti.

Figure 23: Nest digging. (source: Stvarnik, 2013)

On the figure two females are laying eggs into a dug hole in the soil.



Slika 24: Jajca v gnezdu. (vir: Stvarnik, 2013)

Gnezdo od blizu preden samica jajca prekrije s prstjo.

Figure 24: Egg in nest. (source: Stvarnik, 2013)

Nest up close just before the female covers the eggs with soil.



Slika 25: Izleganje in urejanje jajc v gnezdu. (vir: Stvarnik, 2013)

Slika prikazuje izleganje jajc THB. Kornjača izleže posamezno jajce in ga nato s kremplji prerazporedi na točno določeno mesto v gnezdu.

Figure 25: Egg laying and arranging nest. (source: Stvarnik, 2013)

The figure presents the egg-laying of THB. The tortoise lay each individual egg and align it with claws to exact spot in the nest.



Slika 26: Jajca v inkubatorju. (vir: Ž. Dular, 2013)

Slika prikazuje vstavljanje novoizleženih jajc, ki smo jih zložili na vermiculit, dali v inkubator, kjer sta zagotovljeni ustrezna vlaga in temperatura.

Figure 26: Eggs in incubator. (source: Ž. Dular, 2013)

The figure presents the insertion of newly laid eggs, which were arranged on the vermiculate, put to the incubator, where sufficient humidity and temperature are provided.



Slika 27: Izleganje. (vir: Stvarnik, 2013)

Slika prikazuje mladiča kornjače, ki se začenja prebijati lupino jajca.

Figure 27: Hatching. (source: Stvarnik, 2013)

The figure presents a hatching tortoise beaking out of the eggshell.



Slika 28: Novo izlegle kornjače. (vir: Stvarnik, 2013)

Izleganje lahko traja tudi več ur ali celo dni.

Figure 28: Newly laid tortoises. (source: Stvarnik, 2013)

Hatching can take several hours or even days.



Slika 29: Preboj lupine. (vir: Stvarnik, 2013)

Slika prikazuje novoizleglo kornjačo, ki je uspešno prebila jajčno lupino.

Figure 29: Shell breakthrough. (source: Stvarnik, 2013)

The figure presents a newly hatched tortoise that successfully beaked through the eggshell.

Prvo leto se je v opazovani skupini želv izleganje jajc začelo 7. junija. Zadnje gnezdo je bilo izleženo 7. julija. V tej skupini je 10 od 38 želv izleglo tudi drugo gnezdo (26,3 %). Celotna skupina je skupaj izlegla 166 jajc, in sicer 135 ob prvem gnezdenju in 31 jajc ob drugem gnezdenju. Velikost gnezda je nihala od 1 do 7 jajc. Povprečna velikost gnezda je bila 3,5 jajca. Prvo leto smo našli na površju dve jajci (nezakopani), t. i. najdenčka, ki ju nismo vključili v skupno analizo.

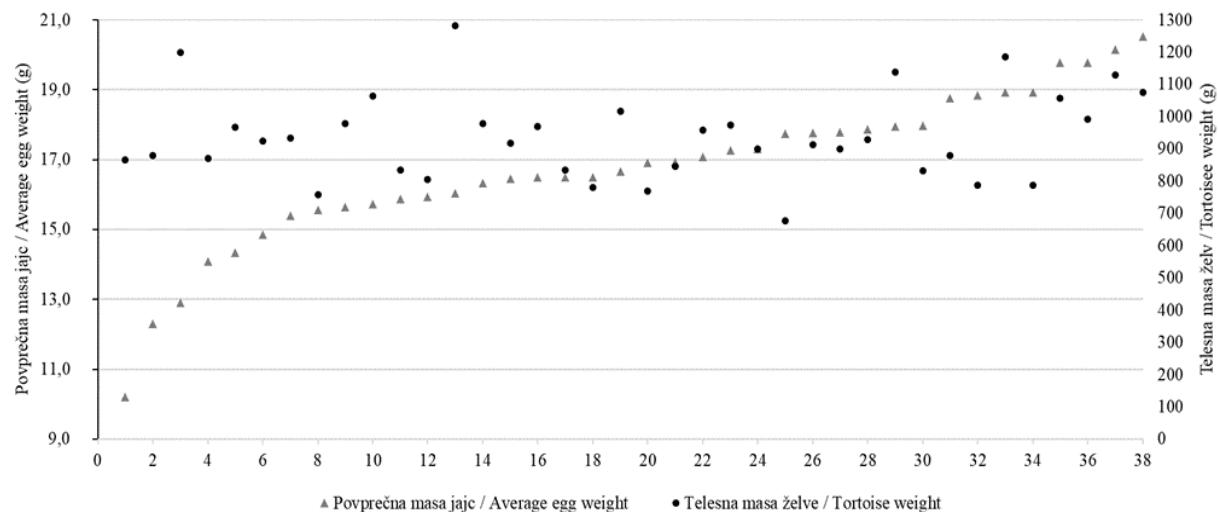
Drugo leto se je izleganje jajc začelo 6. junija in končalo 28. junija. Le ena samica od 12 je imela drugo gnezdo. Celotna skupina je izlegla 41 jajc, 39 ob prvem gnezdenju in 2 jajci ob drugem gnezdenju. Velikost gnezd je nihala med 2 in 4 jajci. Povprečno gnezdo je imelo 3,2 jajca.

Tretje leto je izleganje jajc začelo 7. junija in končalo 3. julija. Le ena samica od štirih je gnezdila dvakrat. Celotna skupina je izlegla 17 jajc, 14 ob prvem gnezdenju in 3 ob drugem gnezdenju. Velikost gnezda je nihala med 2 in 5 jajci. Povprečno gnezdo je imelo 3,4 jajca.

Razpon med dvema zaporednima gnezdoma je bil 11 do 26 dni. Prvo leto so samice prvič izlegale (prvo gnezdo) v obdobju od 7. junija do 4. julija 2013. To leto so drugič izlegale/gnezdile (drugo gnezdo) v obdobju od 12. junija do 7. julija 2013. Drugo leto so prvič izlegale/gnezdile med 6. junijem in 23. junijem 2014 in drugič (drugo gnezdo) 28. junija. Tretje leto so prvič izlegale/gnezdile od 7. junija do 16. junija 2015 in drugič (drugo gnezdo) 3. julija 2015.

4.1.2 Meritve jajc

Prvo leto je bila povprečna masa jajca 16,8 g, povprečna dolžina 36,1 mm in povprečna širina 28,0 mm. Drugo leto je bila povprečna masa jajca 15,1 g, povprečna dolžina 33,9 mm in povprečna širina 27,5 mm. Tretje leto je bila povprečna masa jajca 15,9 g. V povprečju so bila jajca dolga 34,6 mm in široka 28,0 mm. Rezultati meritev jajc za vsako posamezno leto in za vsa tri leta skupaj so prikazani v tabeli 4. Na sliki 30 je prikazana primerjava telesne mase želv in povprečja njihove mase jajc v prvem letu. Med maso želv in povprečjem mase njihovih jajc ni bilo signifikantne korelacije.



Slika 30: Primerjava telesne mase želv in povprečja njihove mase jajc v prvem letu.

Ni bilo statistično značilne korelacije med maso želv in povprečjem mase njihovih jajc ($r = 0,124$, $p = 0,459$).

Figure 30: Comparison of the weight of the tortoise and its average egg weight in the first year.

There was no statistically significant correlation between the weight of the tortoises and the average weight of the eggs laid ($r = 0.124$, $p = 0.459$).

Tabela 4: Meritve mase, dolžine in širine jajc za vsako sezono.

Table 4: Weight, length and width measurements of the eggs for each season.

Prvo leto/First year						
Št. jajc/ No. of eggs	Masa jajc/ Weight of eggs [g] (min–max)	Povp. masa/ Avg. weight [g]	Dolžina jajc/ Length of eggs [mm] (min–max)	Povp. dolžine/ Avg. length [mm]	Širina jajc/ Width of eggs [mm] (min–max)	Povp. širine/ Avg. width [mm]
166	10,2–21,0	16,8	30,0–40,8	36,1	23,3–31,0	28,0
Drugo leto/Second year						
41	12,7–19,3	15,1	31,6–37,3	33,9	25,5–29,6	27,5
Tretje leto/Third year						
17	12,3–17,4	15,9	29,8–37,2	34,6	25,5–29,8	28,0
Tri leta skupaj/All three years together						
224	10,2–21,0	16,5	29,8–40,8	35,6	23,3–31,0	27,9

4.1.3 Umetna inkubacija in valilniški ostanek – prvo leto

Povprečna dolžina inkubacije je bila 60,3 dneva; dolžina je variirala od 55 do 98 dni.

Stopnja preživetja inkubiranih jajc je bila 80,7 % (134 jajc od skupaj 166 jajc). Valilniški ostanek je predstavljal 19,3 % (32 jajc). Od vseh neizleženih jajc je bilo neoplojenih 20 (62,5 %), inficiranih 17 (53,1 %), izsušenih 9 (28,1 %) – na različnih stopnjah embrionalnega razvoja je bilo 7 jajc (21,9 %); en želvji mladič je bil živ.

Najpogostejši izolirani mikrobi iz okuženih jajc so bili: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp., *Purpureocillium lilacinum*. Vsi vzorci so bili negativni na *Aspergillus* spp.

Oplojena jajca valilniškega ostanka smo razdelili v tri skupine glede na embrionalni razvoj. Embrii na zgodnji stopnji razvoja so bili najdeni v 9,38 % (trije embrii), v srednji stopnji razvoja in pozni stopnji razvoja v 6,25 % (po dva embria na vsaki stopnji). V pozni stopnji razvoja je bil en živ želvji mladič, ki mu ni uspelo prebiti lupine. Spačkov in dvojčkov nismo našli. Oba najdenčka sta bila neoplojena.

4.1.4 Umetna inkubacija in valilniški ostanek – drugo leto

Povprečna dolžina inkubacije je bila 54,2 dneva; dolžina je variirala od 52 do 57 dni.

Stopnja preživetja inkubiranih jajc je bila 80,5 % (33 jajc od skupaj 41 jajc). Valilniški ostanek je predstavljal 19,5 % (8 jajc). Od osmih neizleglih jajc sta bili dve neoplojeni in štiri oplojena. V teh štirih jajcih se je razvoj prekinil v zgodnji stopnji embrionalnega razvoja. V dveh primerih je bila vsebina jajca tako spremenjena, da je bilo nemogoče prepoznati ali je bilo jajce oplojeno.

4.1.5 Umetna inkubacija in valilniški ostanek – tretje leto

Povprečna dolžina inkubacije je bila 53,8 dni; dolžina je variirala od 53 do 57 dni.

Stopnja preživetja inkubiranih jajc je bila 47,8 % (8 jajc od skupaj 17 jajc). Valilniški ostanek je predstavljal 52,2 % primerov (9 jajc). Od devetih neizleglih jajc, je bilo sedem neoplojenih (tri jajca od teh so bila tudi inficirana, štiri jajca so bila posušena) in v dveh se je razvoj prekinil v zgodnji stopnji embrionalnega razvoja. Na slikah od 31 do 40 so prikazane vsebine posameznih neizleženih jajc.



Slika 31: Neoplojeno in izsušeno jajce.
(vir: Stvarnik, 2015)



Slika 32: Inficirano neoplojeno jajce.
(vir: Stvarnik, 2015)

Na slikah se nahajata neoplojeni jajci. Na prvi je vsebina jajca suha. Pri obeh ni vidnega embrionalnega diska.

Figure 31: Unfertilised, dry egg.
(source: Stvarnik, 2015)

Figure 32: Infected unfertilised egg.
(source: Stvarnik, 2015)

Figures show an unfertilized egg. On the first figure the content of the egg is dry. In both cases the embryonal disc is not visible.



Slika 33: Inficirano jajce.
(vir: Dovč, 2013)

Na sliki se nahaja inficirano jajce za katerega težko trdimo ali je bilo oplojeno.

Figure 33: Infected egg.
(source: Dovč, 2013)

An infected egg is presented on the figure. It was impossible to determine if the egg was fertilized.



Slika 34: Inficirano oplojeno jajce.
(vir: Stvarnik, 2015)

Vsebina tega jajca je močno spremenjena, vendar smo glede na vsebino, potrdili, da je bilo glede na izgled notranjosti jajce oplojeno.

Figure 34: Infected fertilised egg.
(source: Stvarnik, 2015)

The content of this egg is greatly changed, but we were able to determine that it is fertilized according to the appearance of the interior.



Slika 35: Zgodnja stopnja razvoja.
(vir: Dovč, 2013)



Slika 36: Zgodnja stopnja razvoja, izsušen.
(vir: Dovč, 2013)

Na slikah vidimo zarodka v zgodnji stopnji razvoja. Na sliki 35 je svež odmrl zarodek. Na sliki 36 je prikazan izsušen plod, kar kaže najverjetneje na napako pri valjenju.

Figure 35: Early development stage.
(source: Dovč, 2013)

Figure 36: Early development stage, dried.
(source: Dovč, 2013)

Figures present embryos at an early stage of development. Figure 35 shows fresh dead embryo. Figure 36 shows dried embryo, that most likely indicates a problem during the incubation period.



Slika 37: Srednja stopnja razvoja, izsušen.
(vir: Dovč, 2013)



Slika 38: Srednja stopnja razvoja, inficiran.
(vir: Dovč, 2013)

Na slikah vidimo zarodka na srednji stopnji razvoja. Na sliki 37 je odmrl in izsušen zarodek. Na sliki 38 je prikazan odmrl, inficiran plod na srednji stopnji razvoja.

Figure 37: Middle development stage, dried.
(source: Dovč, 2013)

Figure 38: Middle development stage, infected.
(source: Dovč, 2013)

Figures present embryos in the middle stage of development. Figure 37 shows the dead and dehydrated embryo. Figure 38 shows a dead, infected embryo at a medium stage of development.



Slika 39: Pozna stopnja razvoja, izsušen.
(vir: Dovč, 2013)

Na sliki je zarodek v pozni stopnji razvoja. Plod je izsušen, kar kaže najverjetneje na napako pri valjenju.

Figure 39: Late development stage, dried.
(source: Dovč, 2013)

The figure shows the foetus is in a late stage of development. The foetus is dried out, which probably indicates the problem during the incubation period.



Slika 40: Pozna stopnja razvoja, inficiran.
(vir: Dovč, 2013)

Pri plodu na sliki je viden edem vratu in glave. Rumenjakova vreča še vsebuje zalogu hrane.

Figure 40: Late development stage, infected.
(source: Dovč, 2013)

The figure shows the neck and head oedema in the foetus. A yolk sac still contains a food reserve.

4.2 KEMIJSKA SESTAVA ŽELVJIH JAJC

V tabeli 5 so prikazani podatki o velikosti in masi jajc. Prikazani so aritmetična sredina (am), standardni odmik (SD), minimalna vrednost (min) in maksimalna vrednost (max) za dolžino jajca, širino in debelino lupine, ter za maso lupine, beljaka in rumenjaka. Podatki o vsebnosti vode, pepela, beljakovin in maščob v beljaku in rumenjaku so prikazani v tabeli 6. Beljak je imel pH-vrednost 8,8 ter lomni količnik 1,3341. Lomni količnik rumenjaka je znašal 1,5120.

Tabela 5: Značilnosti in sestava jajc grške kornjače (N=15).

Table 5: Hermann's tortoise eggs characteristics and compositions (N=15).

Značilnosti jajc/Egg's characteristics	am (mm)	SD (mm)	min–max (mm)
Dolžina jajc/Egg length	39,5	±1,3	37,3–42,7
Širina/Egg width	29,9	±1,0	26,8–30,9
Debelina lupine/Shell thickness	0,5	±0,07	0,4–0,6
Zgradba jajca/Egg's compositions	am (g)	SD (g)	min–max (g)
Lupina/Shell	2,6	±0,15	2,3–2,9
Beljak/Albumen	9,7	±1,4	7,1–11,0
Rumenjak/Yolk	8,4	±0,6	7,7–9,1
Celo jajce/Whole egg	20,7	±1,4	17,2–22,4

Tabela 6: Sestava beljaka in rumenjaka jajc grške kornjače.

Table 6: Composition of the albumen and yolk of Hermann's tortoise eggs.

Sestava/Constituent	Beljak/Albumen (%)	Rumenjak/Yolk (%)	Beljak in rumenjak skupaj/Albumen and Yolk together (%)*)
Voda/Moisture	98,2	60,6	80,7
Pepel/Ash	0,7	4,0	2,3
Beljakovine/Protein	0,9	21,0	10,2
Maščobe/Fat	<0,5	14,2	<6,8

* vrednosti so izračunane na osnovi podatkov: lupina 12,5 %, beljak 46,9 % in rumenjak 40,6 % celotne jajčne vsebine / the calculated value based on the data: the shell 12.5%, the albumen 46.9% and the yolk 40.6% of the total content of eggs.

V tabeli 7 je predstavljena maščobno kislinska sestava rumenjaka. Rezultati so podani kot delež (ut. %) posamezne maščobne kisline glede na vse analizirane maščobne kisline v rumenjaku. Izmed vseh določenih maščobnih kislin predstavlja več kot polovični delež oleinska kislina (53,26 %). V rumenjaku so prevladovale enkrat nenasičene maščobne kisline (76,96 %), nasičene maščobne kisline pa so predstavljale 18,64 %.

Tabela 7: Maščobno kislinska sestava rumenjaka grške kornjače.

Table 7: Fatty acid composition of the Hermann's tortoise egg yolk.

Maščobne kisline/Fatty acids	Odstotki/Percentage (MU)
Kaprinska kislina/Caprylic acid (C 10:0)	< 0,05
Lavrinska kislina/Lauric acid (C 12:0)	0,09 ($\pm 0,04$)
Miristinska kislina/Myristic acid (C 14:0)	0,92 ($\pm 0,17$)
Miristoleinska kislina/Myristoleic acid (C 14:1 n-5)	0,13 ($\pm 0,04$)
Pentadekanojska kislina/Pentadecylic acid (C15:0)	0,06 ($\pm 0,03$)
Palmitinska kislina/Palmitic acid (C 16:0)	13,84 ($\pm 2,04$)
Palmitoleinska kislina/Palmitoleic acid (C 16:1 n-7)	12,58 ($\pm 1,97$)
Heptadekanojska kislina/Heptadecanoic acid (C 17:0)	< 0,05
Heptadecenojska kislina/Heptadecenoic acid (C 17:1 n-7)	0,20 ($\pm 0,05$)
Stearinska kislina/Stearic acid (C 18:0)	3,63 ($\pm 0,67$)
Oleinska kislina/Oleic acid (C 18:1 n-9)	53,26 ($\pm 5,14$)
Vakcenska kislina/Vaccenic acid (C 18:1 n-7)	9,33 ($\pm 1,72$)
Linolna kislina/Linoleic acid (C 18:2 n-6)	1,78 ($\pm 0,33$)
α -linolenska kislina/ α -linolenic acid (C 18:3 n-3)	0,67 ($\pm 0,13$)
γ -linolenska kislina/ γ -linolenic acid (C 18:3 n-6)	< 0,05
Oktadekatetraenojska/Octadecatetraenoic acid (C 18:4 n-3)	< 0,05
Arahidinska kislina/Arachidic acid (C 20:0)	0,06 ($\pm 0,04$)
Eikozanojska kislina/Eicosenoic acid (C 20:1 n-9)	1,40 ($\pm 0,26$)
Eikozadienojska kislina/Eicosadienoic acid (C 20:2 n-6)	0,06 ($\pm 0,04$)
Eikozatrienojska kislina/Eicosatrienoic acid (C 20:3 n-6)	0,13 ($\pm 0,04$)
Arahidonska kislina/Arachidonic acid (C 20:4 n-6)	0,84 ($\pm 0,16$)
Eikozatetraenojska kislina/Eicosatetraenoic acid (C 20:4 n-3)	< 0,05
Eikozapentaenojska kislina/Eicosapentaenoic acid (C 20:5 n-3)	0,18 ($\pm 0,05$)
Eruka kislina/Erucic acid (C 22:1 n-9)	0,06 ($\pm 0,04$)
Dokozaheksanojska kislina/Docosapentaenoic acid (C 22:5 n-3)	0,29 ($\pm 0,06$)
Dokozaheksanojska kislina/Docosahexaenoic acid (C 22:6 n-3)	< 0,01
Tetrakozanojska kislina/Lignoceric acid (C 24:0)	< 0,01
Tetrakozenojska kislina/Tetracosenoic acid (C 24:1 n-9)	< 0,05

Maščobne kisline/Fatty acids	Odstotki/Percentage (MU)
Konjugirana linolna kislina/Conjugated linoleic acid	0,33 ($\pm 0,07$)
Nasičene maščobne kisline/Saturated fatty acids	18,60 ($\pm 2,16$)
Enkrat nenasičene maščobne kisline/Mono-unsaturated fatty acids	76,96 ($\pm 5,76$)
Večkrat nenasičene maščobne kisline/Poly-unsaturated fatty acids	4,28 ($\pm 0,41$)
Vsota omega 3/Total omega 3	1,14 ($\pm 0,15$)
Vsota omega 6/Total omega 6	2,81 ($\pm 0,37$)
Vsota Omega 3 in Omega 6/Total omega 3 and Total omega 6	0,41 ($\pm 0,08$)

MU – merilna negotovost / measurement uncertainty, SD – standard deviation / – not done

Rezultati aminokislinske sestave beljaka so prikazani v tabeli 8. Med neesencialnimi aminokisinami sta prevladovali glutaminska in asparaginska kislina. Največji delež esencialnih aminokisin predstavljajo levcin, fenilalanin in lizin.

Tabela 8: Aminokislinska sestava beljaka grške kornjače.

Table 8: Amino acid composition of the Hermann's tortoise egg albumen.

Aminokislina/Amino acid	g/100 g (MU)
Triptofan/Tryptophan	< 0,01
Asparaginska kislina/Aspartic acid	0,101 ($\pm 0,014$)
Treonin/Threonine	0,052 ($\pm 0,009$)
Serin/Serine	0,064 ($\pm 0,011$)
Glutaminska kislina/Glutamic acid	0,115 ($\pm 0,015$)
Prolin/Proline	< 0,01
Glicin/Glycine	0,072 ($\pm 0,011$)
Alanin/Alanine	0,042 ($\pm 0,008$)
Valin/Valine	< 0,01
Izolevcin/Isoleucine	< 0,01
Levcin/Leucine	0,095 ($\pm 0,013$)
Tirozin/Tyrosine	< 0,01
Fenilalanin/Phenylalanine	0,083 ($\pm 0,012$)
Lizin/Lysine	0,081 ($\pm 0,012$)
Histidin/Histidine	< 0,01
Arginin/Arginine	< 0,01
Cistein/Cysteine	0,0607 ($\pm 0,0074$)
Metionin/Methionine	< 0,001

Koncentracija elementov v sledovih Pb, Cd, As, Se, Zn, Ni, Cu, Cr, Mn, Fe, in Co v lupini, beljaku in rumenjaku je prikazana v tabeli 9. Koncentracije elementov v rumenjaku so precej višje v primerjavi z vrednostmi v beljaku. Izjema je Cr, katerega koncentracija je primerljiva s koncentracijo v rumenjaku. Rezultati kažejo znatno razliko med koncentracijo As, Ni, Cr, Mn, Fe in Co v lupini in koncentracijo omenjenih elementov v rumenjaku ali beljaku. Najvišja vsebnost Se in Zn je bila v rumenjaku. Kar se tiče vsebnosti toksičnih elementov, smo Pb našli le v rumenjaku, medtem ko je bil As najden le v lupini. V nobeni frakciji jajca nismo našli Cd.

Tabela 9: Koncentracija enajstih elementov v sledovih (mg/kg svežega vzorca) v lupini, beljaku in rumenjaku jajc grške kornjače.

Table 9: Eleven trace element concentration (mg/kg wet weight) in the shell, albumen and yolk of Hermann's tortoise eggs.

Element	Lupina/Shell (mg/kg)	Beljak/Albumen (mg/kg)	Rumenjak/Yolk (mg/kg)
Pb	< 0,01	< 0,01	0,03
Cd	<0,005	< 0,005	< 0,005
As	0,068	< 0,01	< 0,01
Se	0,017	0,005	0,188
Zn	0,5	< 0,4	26
Ni	9,7	< 0,005	0,031
Cu	1,0	0,23	1,0
Cr	0,251	0,076	0,077
Mn	0,922	< 0,020	0,369
Fe	> 40	4,1	31
Co	0,873	< 0,002	0,005

4.3 SPOLNI HORMONI IN NJIHOVI METABOLITI V IZTREBKIH ŽELV

4.3.1 Progesteron

4.3.1.1 Samice

Vse štiri samice so jajca izlegale tako prvič (24. oz. 25. maj) kot drugič (13. oz. 14. junij) v obdobju dveh dni. Pri samicah je bil nivo progesterona v iztrebkih največji tik pred izleganjem jajc konec maja in v sredini junija. Temu vrhu je sledil padec vsebnosti tik pred prvim izleganjem jajc, ki se je nadaljeval do začetka junija. Ponovni dvig količine progesterona smo ponovno ugotavljali pred drugim izleganjem jajc. Temu je sledil ponovni padec. Konec junija in sredi julija je sledil hiter dvojni dvig. Najmanjše vsebnosti smo ugotavljali v avgustu brez zaznavnih vrhov. V začetku meseca septembra je bil ponovno opažen rahel dvig vsebnosti, kateremu je sledil padec, ko je nastopilo obdobje hibernacije (tabela 10, slika 41).

Pri samici z oznako 4 je bila ugotovljena največja vrednost progesterona 137,01 ng/g iztrebkov v drugi polovici maja. Najmanjšo vsebnost smo izmerili konec julija 32,23 ng/g iztrebkov pri samici z oznako 2 (tabela 10, slika 41).

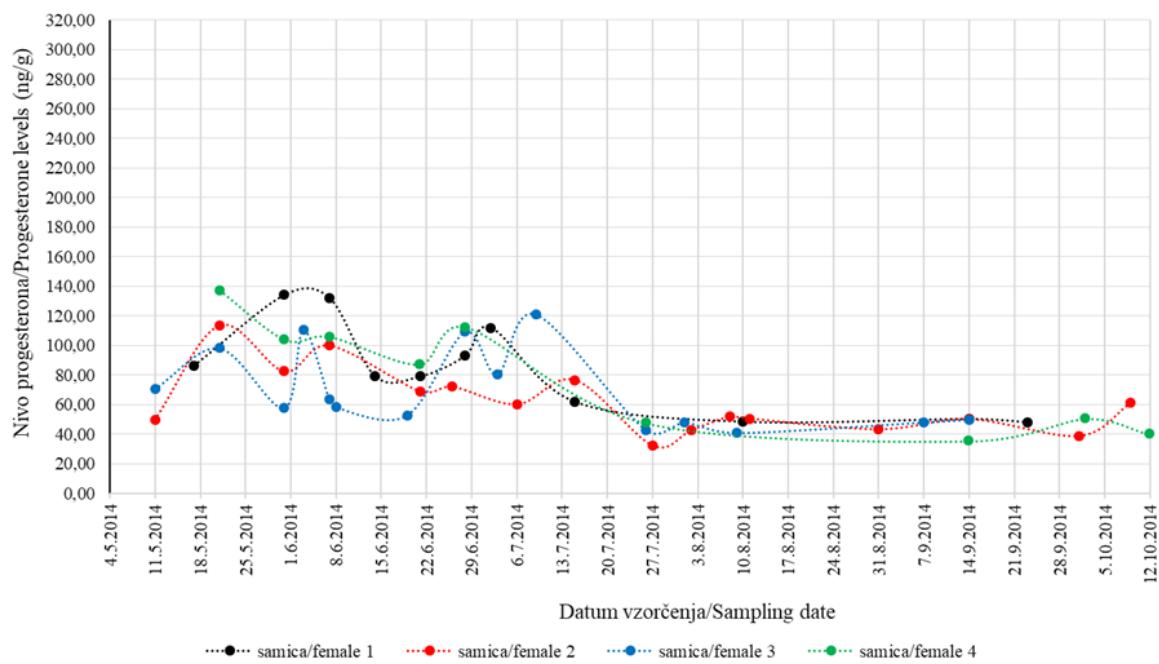
Tabela 10: Razpon vsebnosti progesterona v iztrebkih samic grške kornjače ($N = 4$).

Table 10: Range of progesterone values in faeces of Hermann's Tortoise females ($N = 4$).

Samice/Females	Progesteron/Progesterone (ng/g iztrebkov/faeces)	
Mesec/Month	Min	Max
Maj/May	49,72	137,01
Junij/June	52,69	131,84
Julij/July	32,23	121,04
Avgust/August	41,03	51,92
September/September	35,37	50,27
Okttober/October	38,75	61,17

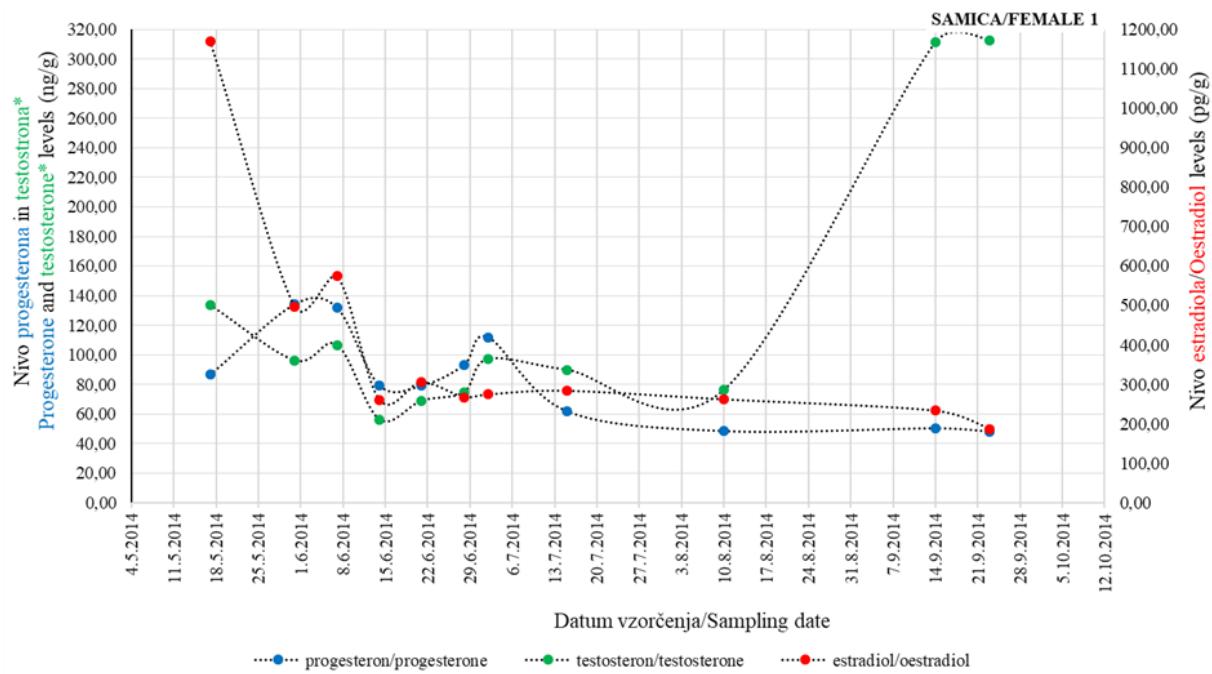
Na sliki 41 je prikazana dinamika progesterona pri vseh samicah.

Na slikah od 42 do 45 so prikazani vsebnosti progesterona, estrogena in testosterona v iztrebkih pri posamezni samici. Vsebnosti testosterona so na grafih od 42 do 45 prikazane v desetkratni povečavi zaradi lažje primerjave s progesteronom in estradiolom.



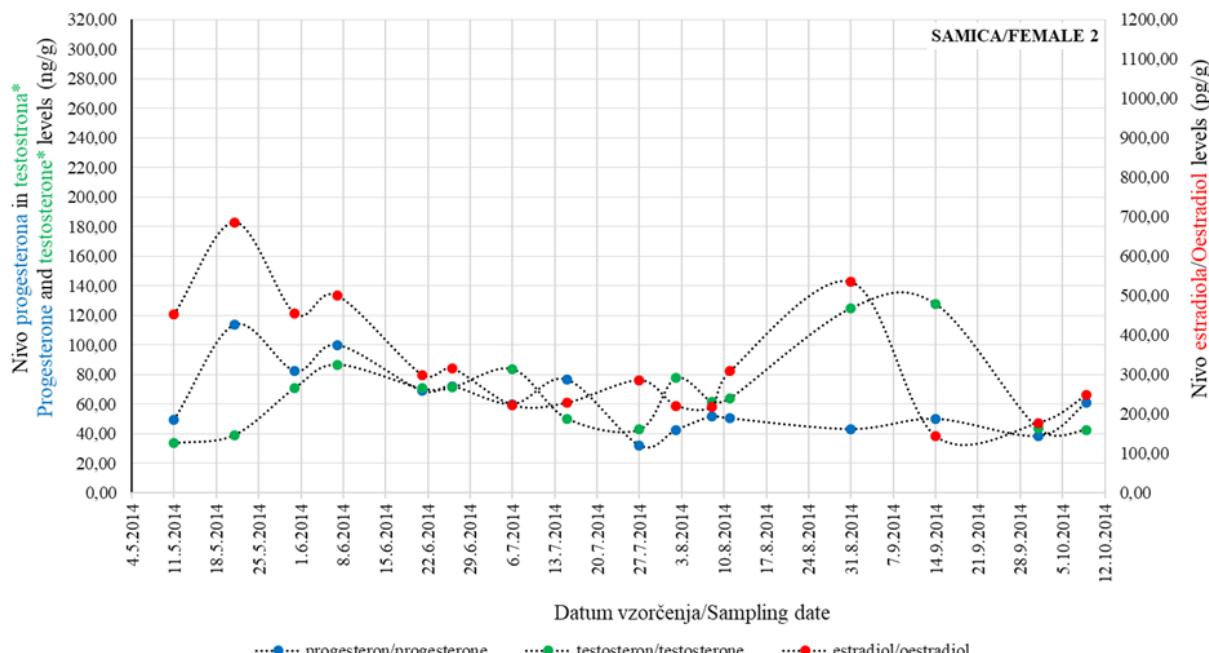
Slika 41: Nivo progesterona pri samicah.

Figure 41: Females progesterone levels.



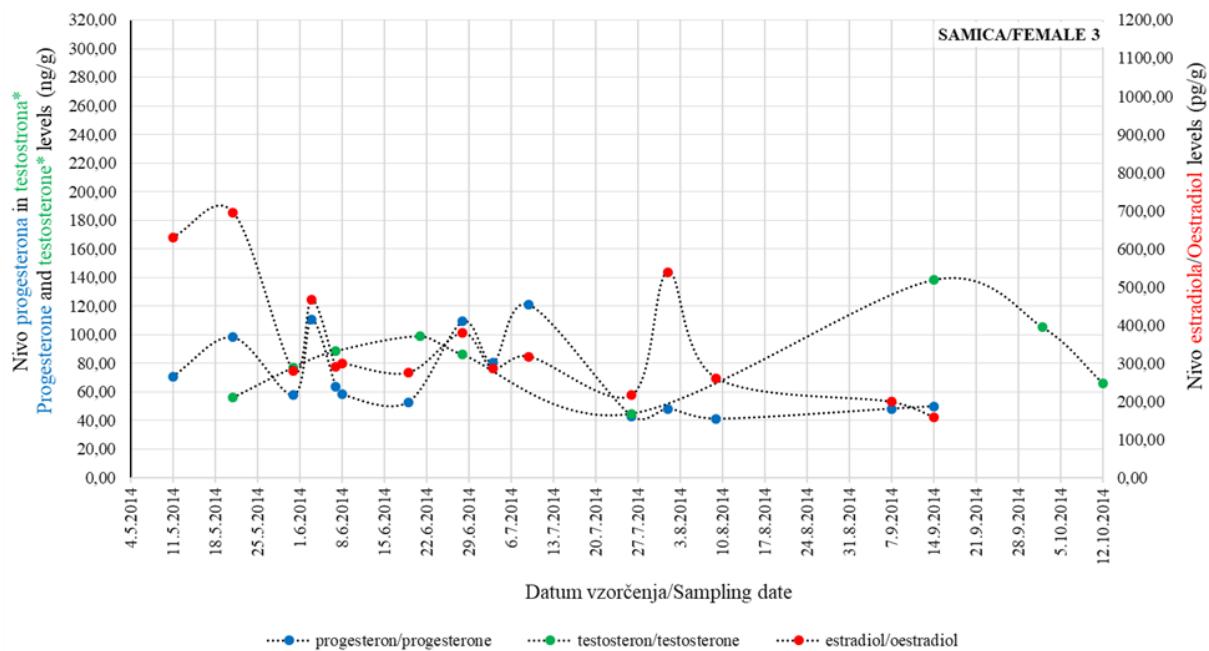
Slika 42: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri samici številka 1.

Figure 42: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of female number 1.



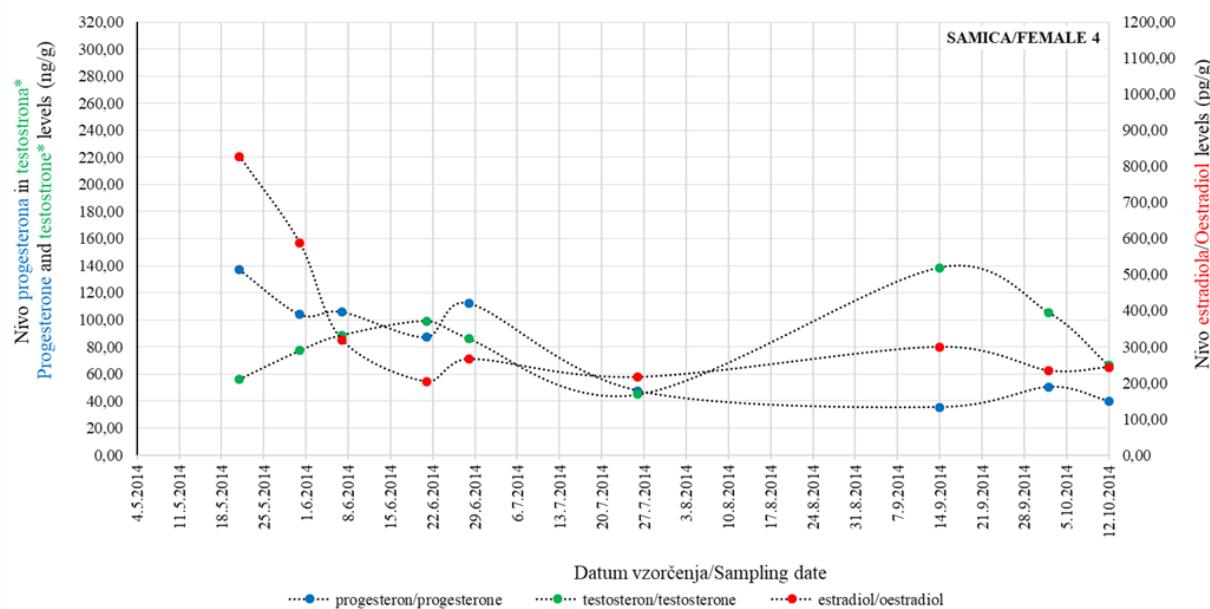
Slika 43: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri samici številka 2.

Figure 43: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of female number 2.



Slika 44: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri samici številka 3.

Figure 44: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of female number 3.



Slika 45: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri samici številka 4.

Figure 45: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of female number 4.

4.3.1.2 Odrasli samci

Pri odraslih samcih so vsebnosti progesterona postopoma naraščale v mesecu maju in juniju. Opazili smo dva vrhova, prvi se je pojavil takoj po prvem izleganju jajc konec maja, drugi vrh je bil viden takoj po drugem izleganju jajc v drugi polovici junija (izjema je bil samec z oznako 2, kjer smo opazili le vrh v drugi polovici junija). Po drugem izleganju je sledilo nižanje progesterona. Zaznali smo rahel dvig vsebnosti v septembru pred pričetkom obdobja hibernacije (tabela 11, slika 46).

Največje vsebnosti progesterona 190,73 ng/g iztrebkov je dosegel samec z oznako 1 v začetku junija. Najmanjšo vsebnost 33,93 ng/g iztrebkov smo izmerili pri samcu z oznako 3 konec avgusta (tabela 11, slika 46).

Tabela 11: Razpon vsebnosti progesterona v iztrebkih odraslih samcev grške kornjače ($N = 4$).

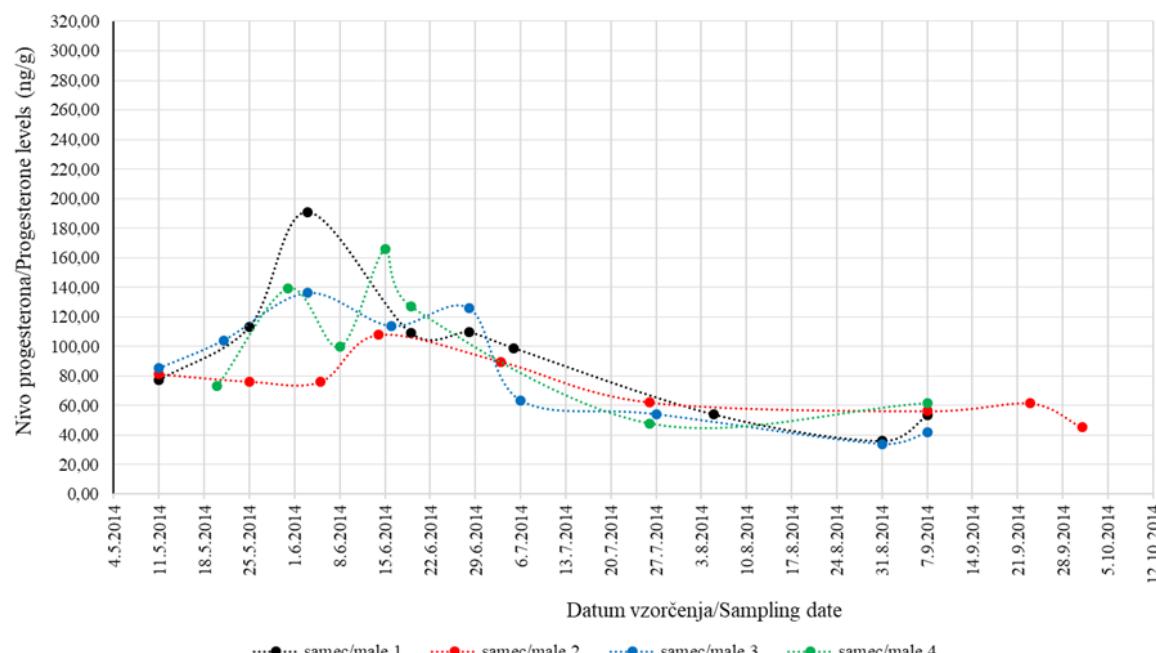
Table 11: Range of progesterone values in faeces of Hermann's Tortoise adult males ($N=4$).

Odrasli samci/Adult males	Progesteron/Progesterone (ng/g iztrebkov/faeces)	
Mesec/Month	Min	Max
Maj/May	73,07	139,43
Junij/June	76,05	190,73
Julij/July	47,73	127,13
Avgust/August	33,93	53,96
September/September	41,90	61,61
Oktober/October	45,32*	45,32*

* en sam vzorec/single sample

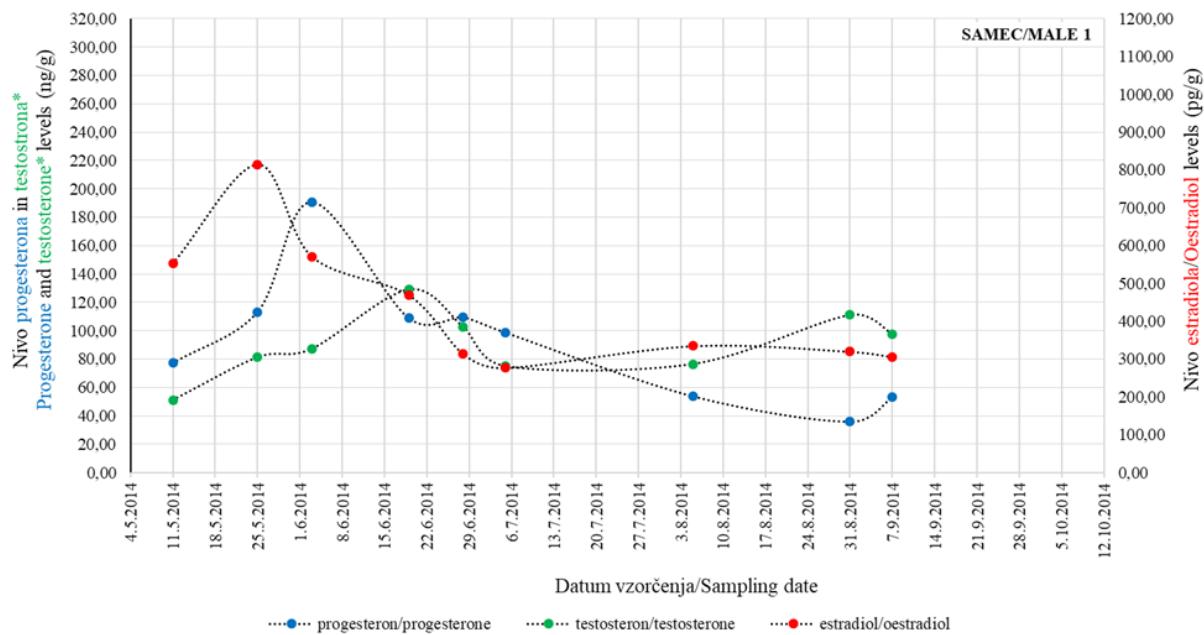
Na sliki 46 je prikazana dinamika progesterona pri vseh odraslih samcih.

Na slikah od 47 do 50 so prikazane vsebnosti progesterona, estrogena in testosterona v iztrebkih pri posameznem odraslem samcu. Vsebnosti testosterona so na grafih od 47 do 50 prikazane v desetkratni povečavi zaradi lažje primerjave s progesteronom in estradiolom.



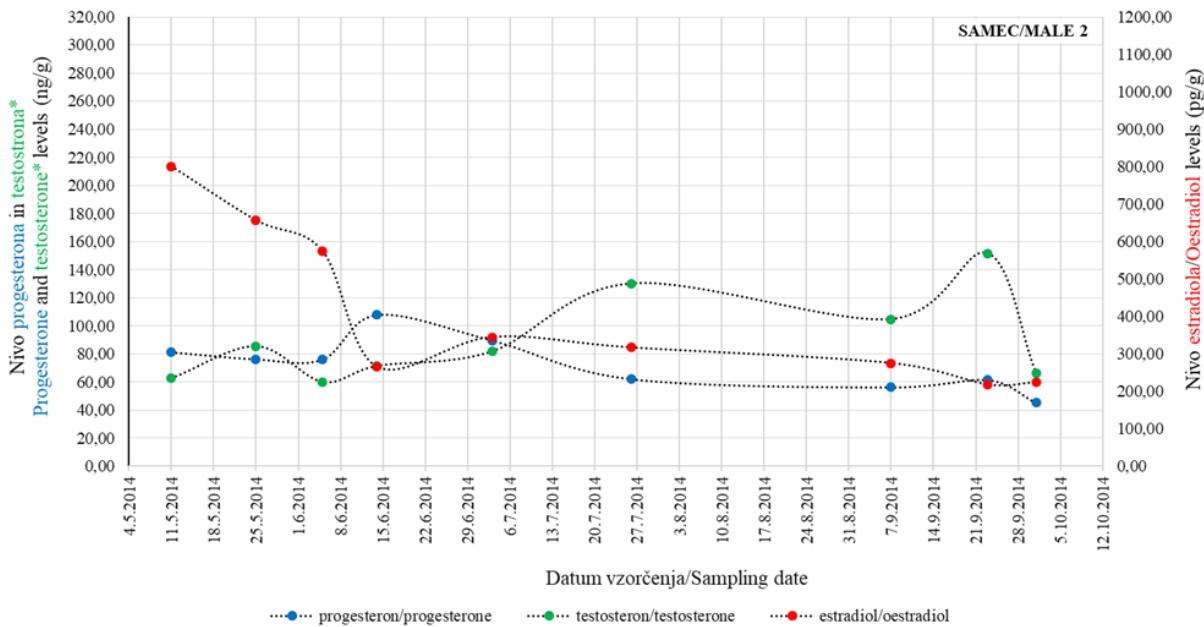
Slika 46: Nivo progesterona pri odraslih samcih.

Figure 46: Adult males progesterone levels.



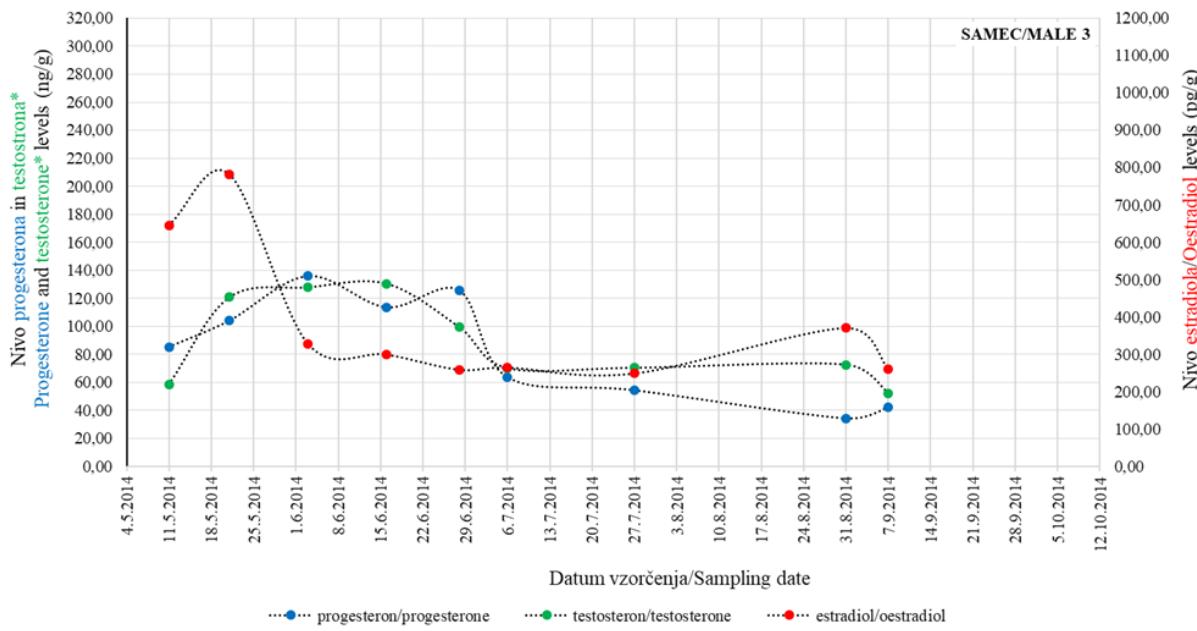
Slika 47: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri odraslem samcu številka 1.

Figure 47: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of adult male number 1.



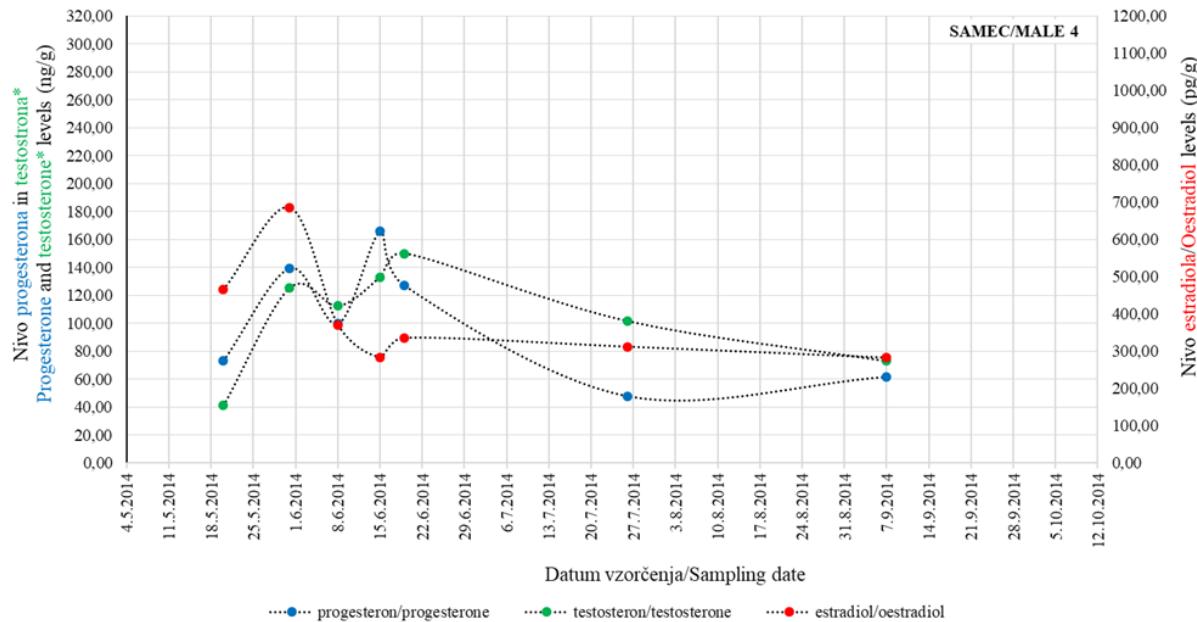
Slika 48: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri odraslem samcu številka 2.

Figure 48: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of adult male number 2.



Slika 49: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri odraslem samcu številka 3.

Figure 49: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of adult male number 3.



Slika 50: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri odraslem samcu številka 4.

Figure 50: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of adult male number 4.

4.3.1.3 Mladi samci

V skupini mladih samcev smo opazili največje vsebnosti progesterona v mesecu maju. Pri samcu z oznako 3 je bil prvi dvig progesterona viden šele v začetku junija. Takrat je dosegel največjo vsebnost progesterona, to je 181,54 ng/g iztrebkov. Vsebnosti so se nato zmanjšale in ponovno dosegle prvo zvišanje v drugi polovici junija ter drugo zvišanje v sredini julija. Sledil je padec konec meseca julija, ko smo izmerili najmanjšo vsebnost pri samcu z oznako 3, to je 37,12 ng/g iztrebkov. Ponovni rahel dvig smo zaznali v sredini avgusta in nato še v prvi polovici septembra (tabela 12, slika 51).

Tabela 12: Razpon vsebnosti progesterona v iztrebkih mladih samcev grške kornjače (N = 4).

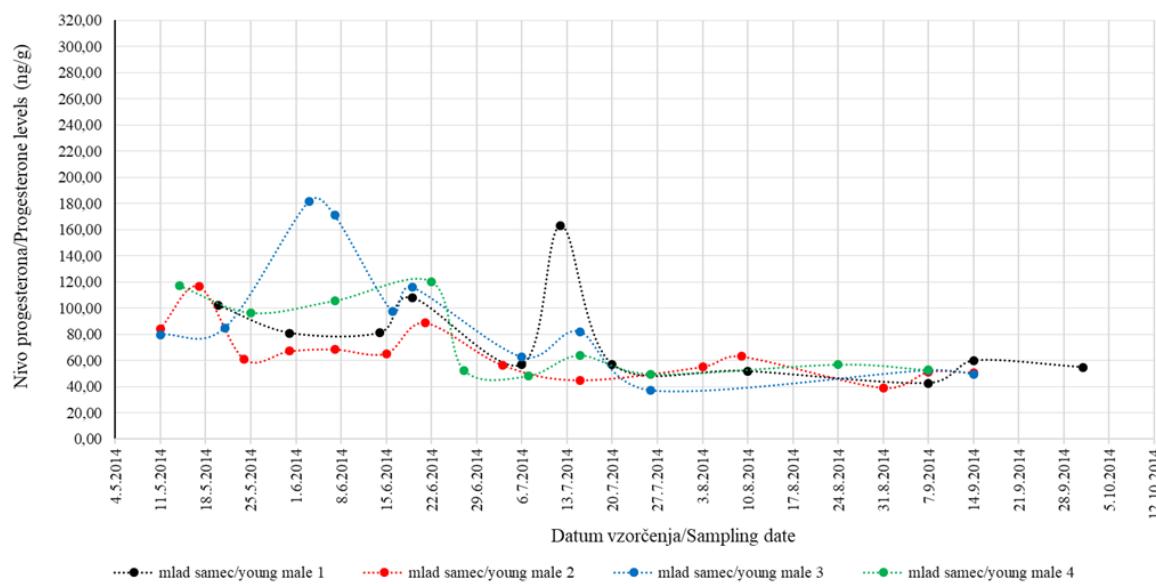
Table 12: Range of progesterone values in faeces of Hermann's Tortoise young males (N=4).

Mladi samci/Young males	Progesteron/Progesterone (ng/g iztrebkov/faeces)	
Mesec/Month	Min	Max
Maj/May	61,17	117,00
Junij/June	52,65	181,45
Julij/July	37,12	163,13
Avgust/August	39,27	63,15
September/September	42,77	59,99
Oktober/October	54,89*	54,89*

* en sam vzorec/single sample

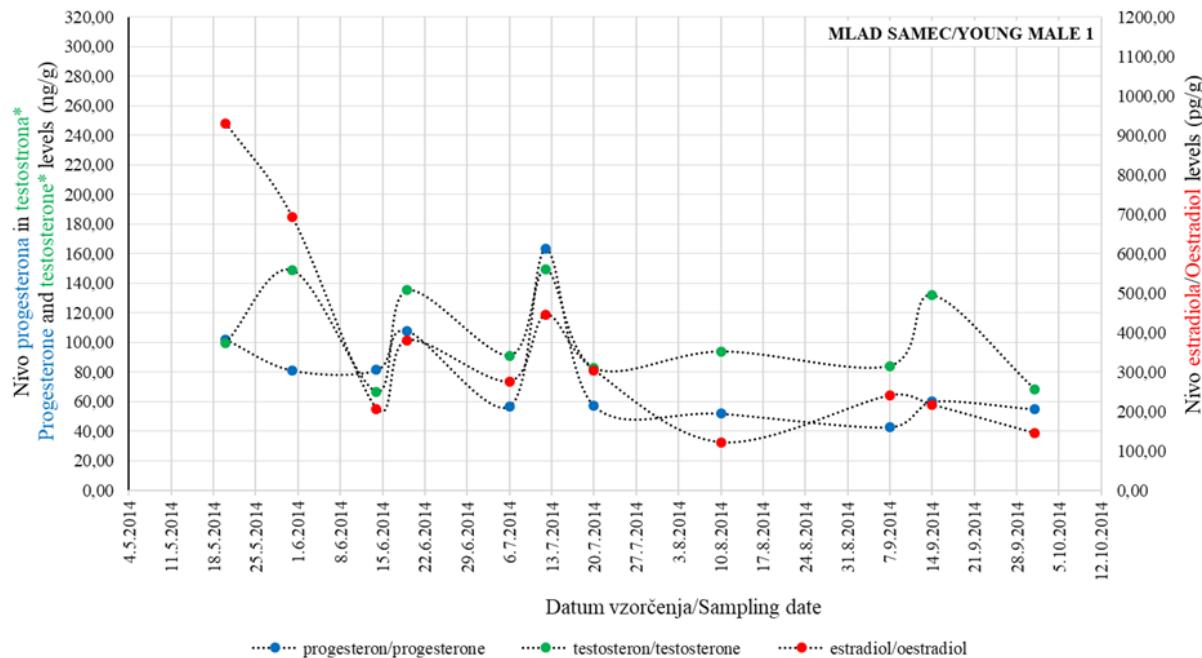
Na sliki 51 je prikazana dinamika progesterona pri vseh mladih samcih.

Na slikah od 52 do 55 so prikazane vsebnosti progesterona, estrogena in testosterona v iztrebkih pri posameznem mlademu samcu. Vsebnosti testosterona so na grafih od 52 do 55 prikazane v desetkratni povečavi zaradi lažje primerjave s progesteronom in estradiolom.



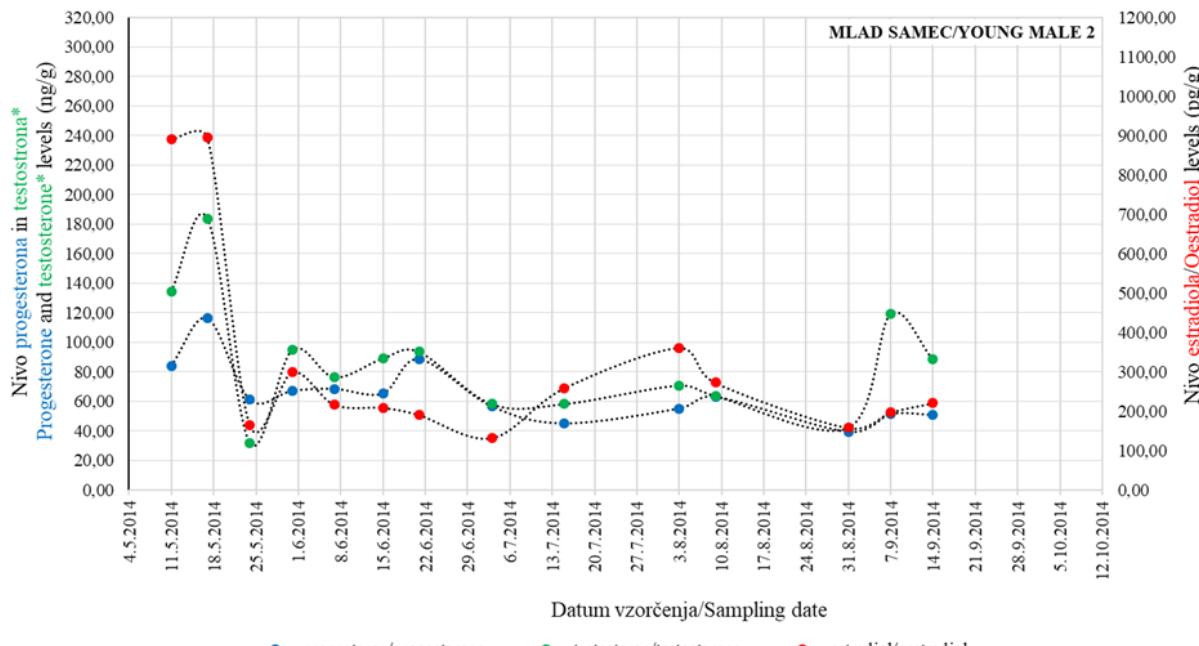
Slika 51: Nivo progesterona pri mladih samcih.

Figure 51: Young males progesterone levels.



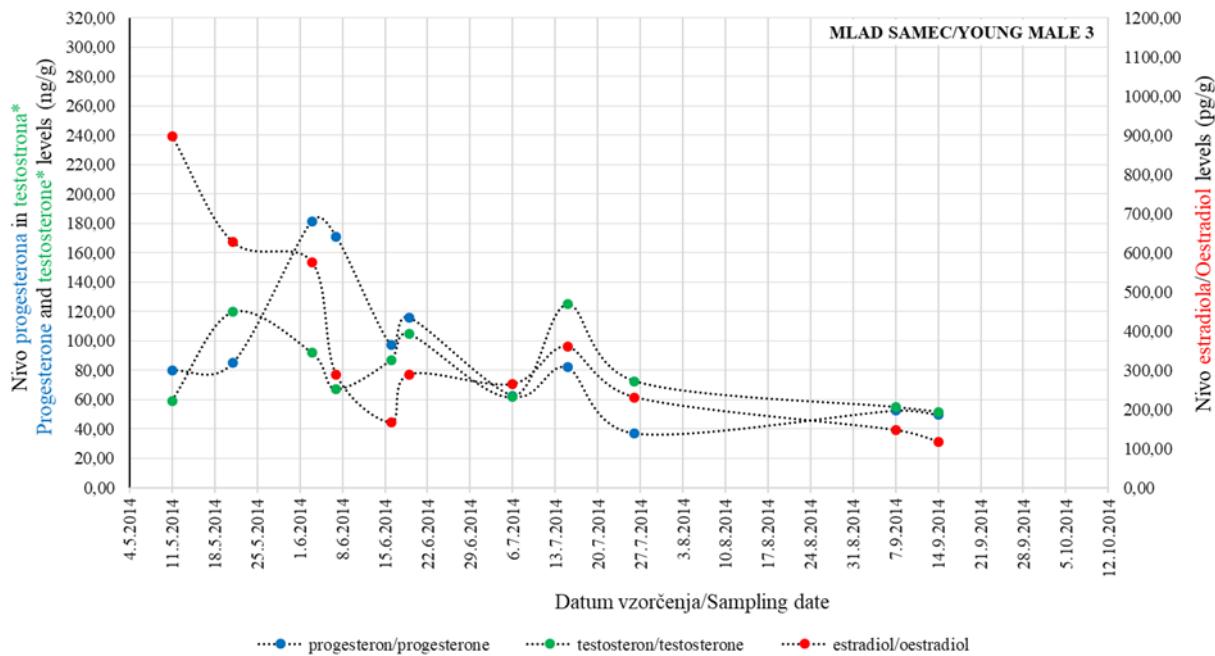
Slika 52: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri mladem samcu številka 1.

Figure 52: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of young male number 1.



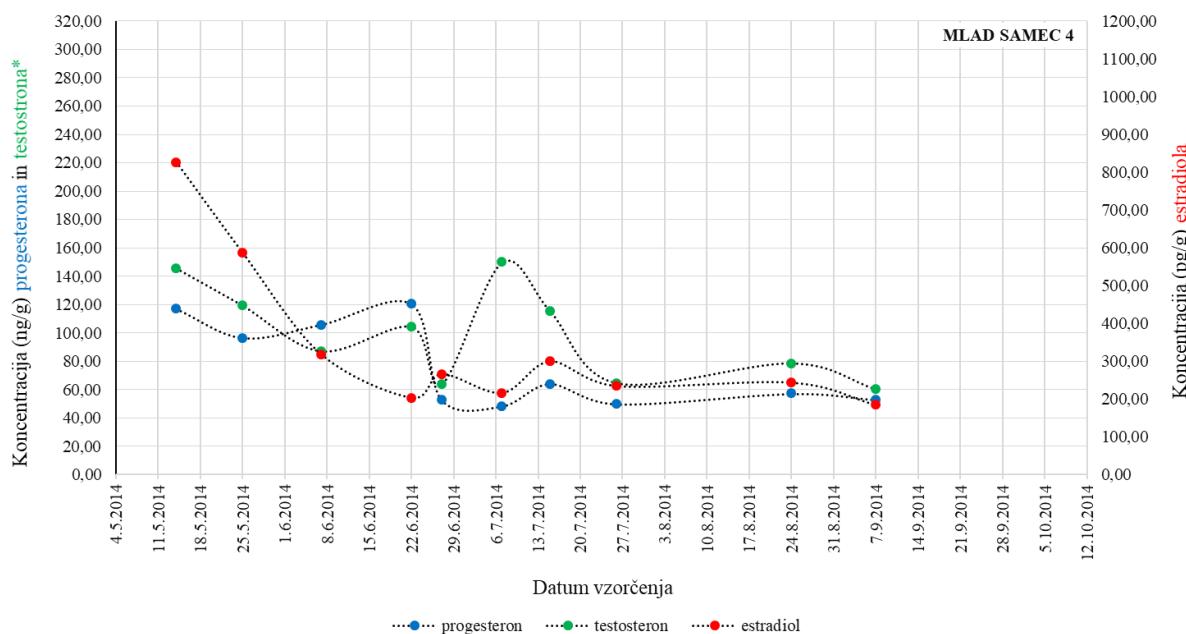
Slika 53: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri mlademu samcu številka 2.

Figure 53: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of young male number 2.



Slika 54: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri mlademu samcu številka 3.

Figure 54: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of young male number 3.



Slika 55: Nivo progesterona, estradiola in testosterona pri mlademu samcu številka 4.

Figure 55: Progesterone, oestradiol and testosterone levels of young male number 4.

4.3.2 Estradiol

4.3.2.1 Samice

Vsebnosti estradiola v iztrebkih samic so se razlikovale v obdobju pred in med izleganjem jajc. Višje vsebnosti so se najprej pokazale v sredini maja tik pred prvim izleganjem jajc in pred drugim izleganjem jajc v začetku junija. V tem obdobju so bile koncentracije estradiola med posameznimi samicami zelo različne. Gibale so se od 290,62 (samica z oznako 3) do 1711,50 pg/g iztrebkov (samica z oznako 1). V začetku in še konec avgusta smo opazili rahla dviga vsebnosti, tema je sledil padec v začetku septembra. V oktobru so se vrednosti estradiola ohranjale na istem nivoju (tabela 13, slika 56).

Dvema izrazitima dvigoma vsebnosti estradiola je takoj sledil dvig progesterona v drugi polovici maja in sredini junija. Pri želvi z oznako 3 je bil dvig viden v začetku avgusta (538,94 pg/g iztrebkov), pri želvi z oznako 2 je bil viden dodatni dvig vsebnosti estradiola konec avgusta (534,81 pg/g iztrebkov) (tabela 13, slika 56).

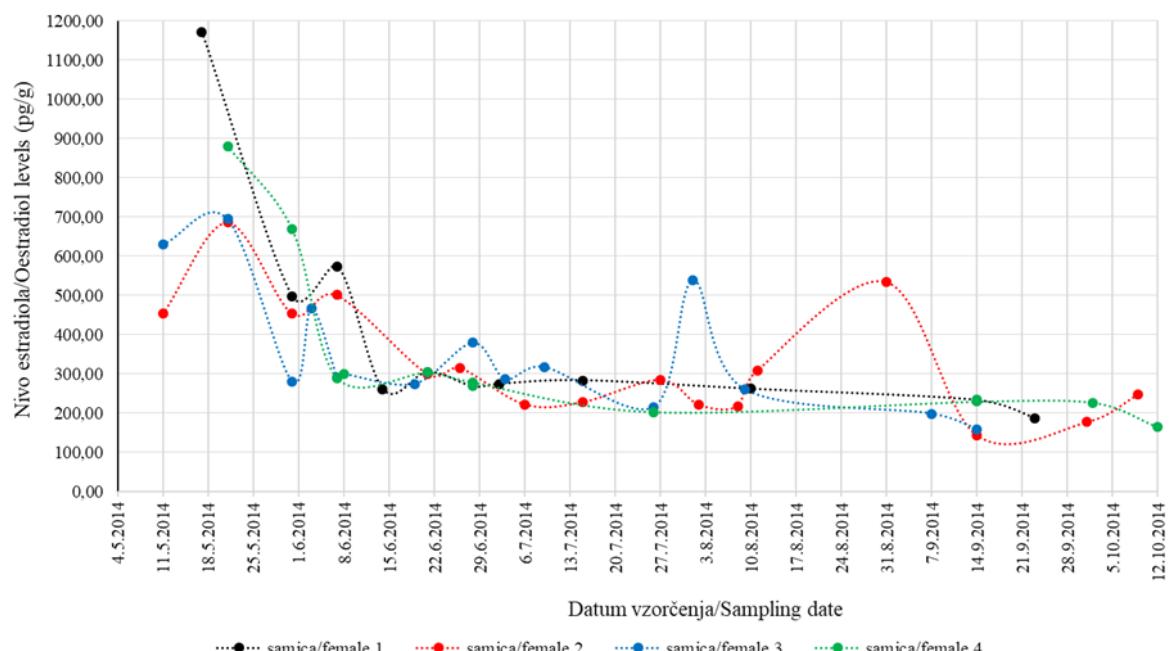
Tabela 13: Razpon vsebnosti estradiola v iztrebkih samic grške kornjače ($N = 4$).

Table 13: Range of oestradiol values in faeces of Hermann's Tortoise females ($N=4$).

Samice/Females	Estradiol/Oestradiol (pg/g iztrebkov/faeces)	
Mesec/Month	Min	Max
Maj/May	280,17	1171,50
Junij/June	260,98	574,43
Julij/July	202,05	317,63
Avgust/August	217,80	538,94
September/September	143,25	233,04
Oktober/October	163,62	247,93

Na sliki 56 je prikazana dinamika estradiola pri vseh samicah.

Vsebnosti estradiola v iztrebkih pri posamezni samici so prikazani na slikah od 42 do 45 (str. 75–77).



Slika 56: Nivo estradiola pri samicah.

Figure 56: Females oestradiol levels.

4.3.2.2 Odrasli samci

Pri odraslih samcih je bil nivo estradiola največji v drugi polovici maja. Takrat smo pri samcu z oznako 1 izmerili 814,00 pg/g iztrebkov. Sledil je padec vsebnosti, ki je nekje od sredine junija rahlo porastel in se ohranjal na enakem nivoju. V septembru se je nivo estrogena v iztrebkih še zmanjšal, preden je nastopilo obdobje hibernacije. Najmanjša dosežena vsebnost v septembru je bila 218,00 pg/g iztrebkov ugotovljena pri samcu z oznako 2 (tabela 14, slika 57).

Tabela 14: Razpon vsebnosti estradiola v iztrebkih odraslih samcev grške kornjače ($N = 4$).

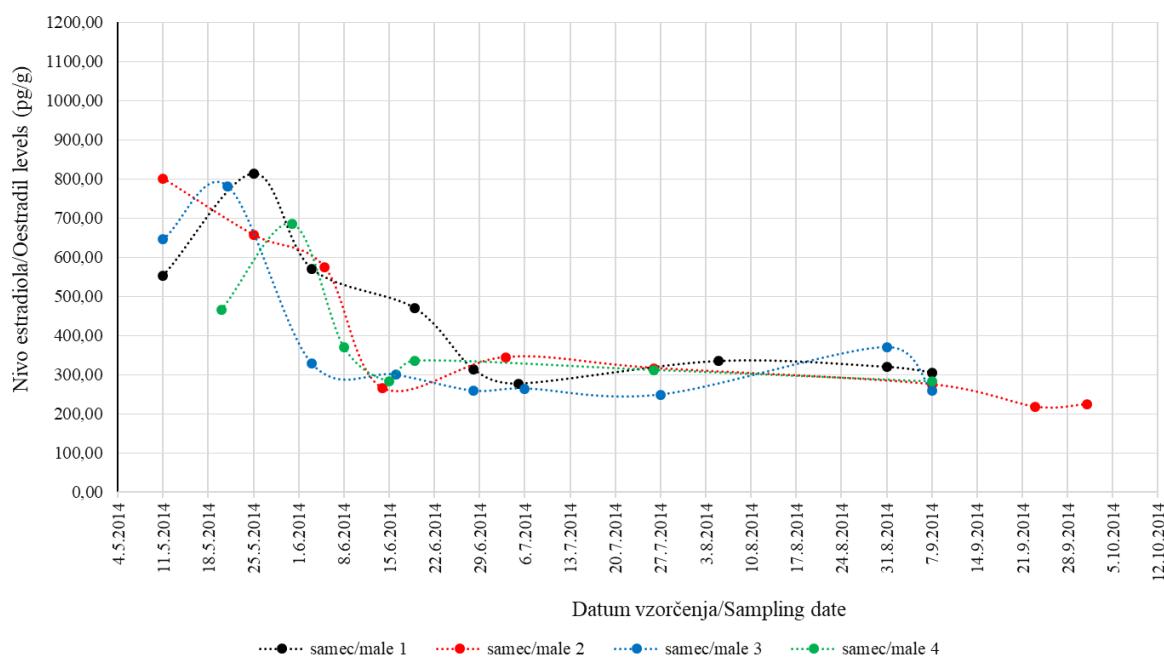
Table 14: Range of oestradiol values in faeces of Hermann's Tortoise adult males ($N=4$).

Odrasli samci/Adult males	Estradiol/Oestradiol (pg/g iztrebkov/faeces)	
Mesec/Month	Min	Max
Maj/May	465,30	814,00
Junij/June	258,94	574,21
Julij/July	249,09	344,95
Avgust/August	319,81	370,41
September/September	218,00	305,90
Oktober/October	224,01*	224,01*

* en sam vzorec/single sample

Na sliki 57 je prikazana dinamika estradiola pri vseh odraslih samcih skupaj.

Vsebnosti estradiola v iztrebkih pri posameznem odraslem samcu so prikazani na slikah od 47 do 50 (str. 79–80).



Slika 57: Nivo estradiola pri odraslih samcih.

Figure 57: Adult males oestradiol levels.

4.3.2.3 Mladi samci

V skupini mladih samcev smo opazili največje vsebnosti estradiola v mesecu maju. In sicer 930,60 pg/g iztrebkov pri želvi z oznako 1. Temu vrhu je sledil padec vsebnosti in nato v treh primerih dvojni dvig v drugi polovici junija in prvi polovici julija. Želva številka 2 kaže na vrh v začetku avgusta, 361,47 pg/g iztrebkov, temu sledi padec. V začetku septembra se je pojavil rahel dvig, ki mu je sledil padec na bazalne vrednosti. Najmanjšo vsebnost smo izmerili v sredini meseca septembra 117,51 pg/g iztrebkov pri želvi z oznako 3 (tabela 15, slika 58).

Tabela 15: Razpon vsebnosti estradiola v iztrebkih mladih samcev grške kornjače (N = 4).

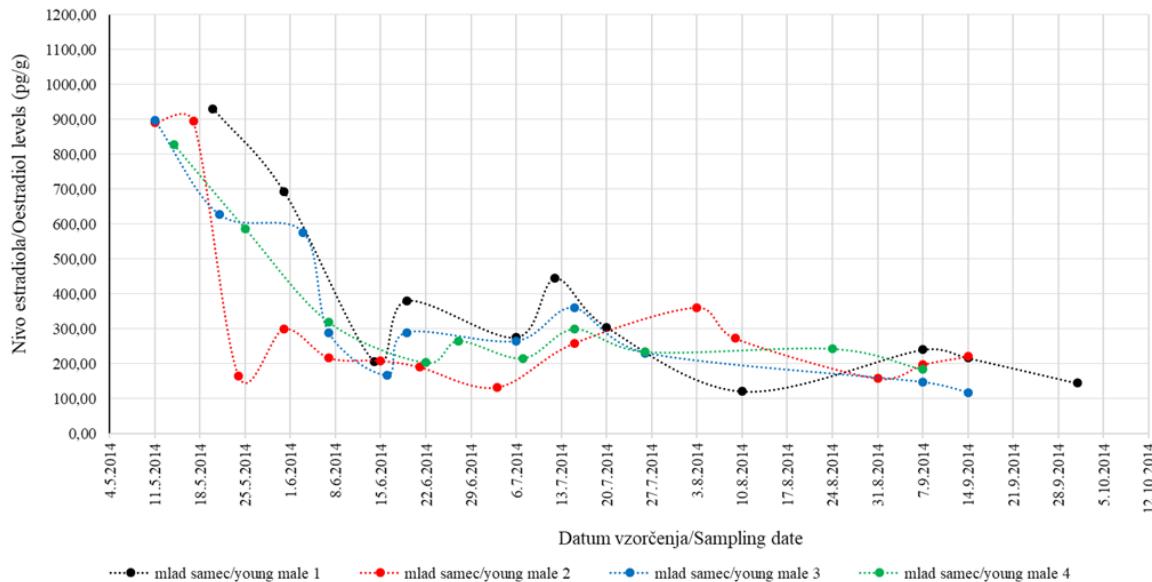
Table 15: Range of oestradiol values in faeces of Hermann's Tortoise young males (N=4).

Mladi samci/Young males	Estradiol/Oestradiol (pg/g iztrebkov/faeces)		
	Mesec/Month	Min	Max
Maj/May		165,54	930,60
Junij/June		166,71	576,70
Julij/July		132,63	444,44
Avgust/August		121,32	361,47
September/September		117,51	240,60
Oktober/October		144,43*	144,43*

* en sam vzorec/single sample

Na sliki 58 je prikazana dinamika estradiola pri vseh mladih samcih.

Vsebnosti estradiola v iztrebkih pri posameznem mladem samcu so prikazani na slikah od 52 do 55 (str. 82–84).



Slika 58: Nivo estradiola pri mladih samcih.

Figure 58: Young males oestradiol levels.

4.3.3 Testosteron

4.3.3.1 Samice

Pri samicah so bile izmerjene vsebnosti testosterona zelo variabilne v začetku valilne sezone in so se gibale od 3,73 do 13,73 ng/g iztrebkov (tabela 16, slika 59). Količina testosterona skozi sezono je bila zelo različna pri samicah, posledično so se pojavili časovno različni vrhovi. Prva dva vrhova sta se pojavila takoj po izleganju jajc, prvi konec maja in drugi, ki se je z nihanji kazal od prve polovice junija do konca junija. Tretji vrh je bil nakazan v začetku avgusta, temu je sledil padec vsebnosti in nato še en porast vsebnosti testosterona v sredini septembra. Najmanjše vsebnosti smo izmerili v začetku oktobra. Pri samicah smo največje vsebnosti izmerili v septembru, največja vsebnost 31,27 ng/g iztrebkov je bila izmerjena pri samici z oznako 1 (tabela 16, slika 59).

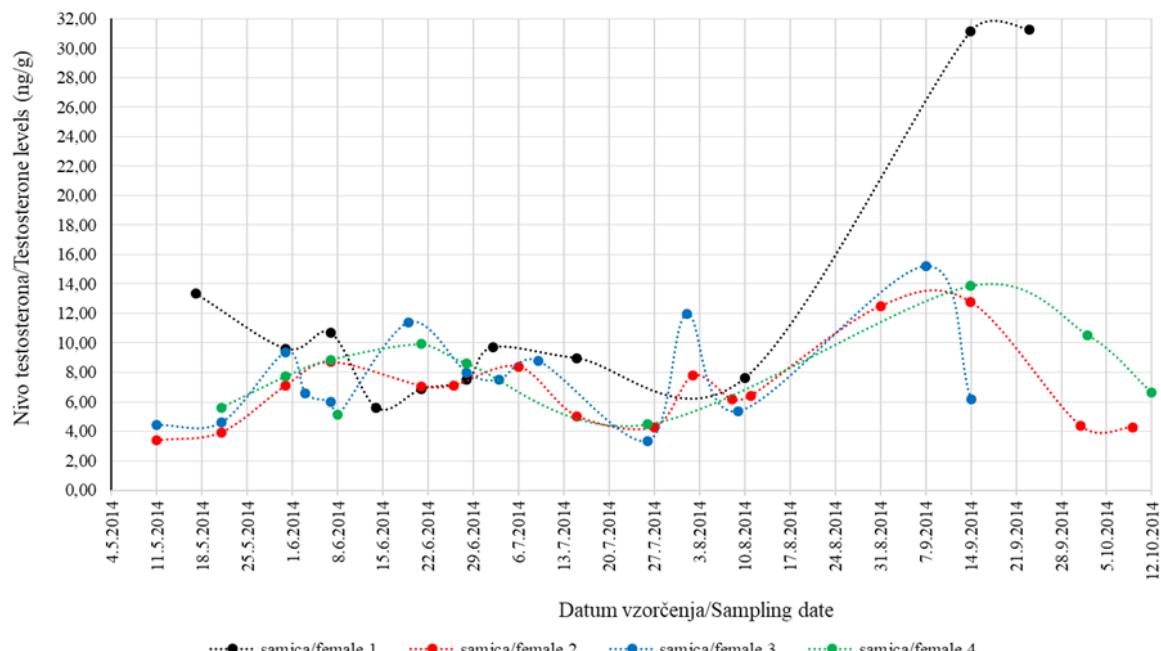
Tabela 16: Razpon vsebnosti testosterona v iztrebkih samic grške kornjače ($N = 4$).

Table 16: Range of testosterone values in faeces of Hermann's Tortoise females ($N=4$).

Samice/Females	Testosteron/Testosterone (ng/g iztrebkov/faeces)	
Mesec/Month	Min	Max
Maj/May	3,37	13,37
Junij/June	5,08	11,40
Julij/July	3,36	9,71
Avgust/August	5,36	12,49
September/September	6,17	31,27
Oktober/October	4,26	10,54

Na sliki 59 je prikazana dinamika testosterona pri vseh samicah.

Vsebnosti testosterona v iztrebkih pri posamezni samici so prikazani na slikah od 42 do 45 (str. 75–77).



Slika 59: Nivo testosterona pri samicah.

Figure 59: Females testosterone levels.

4.3.2.2 Odrasli samci

Pri vseh samcih smo opazili, da so vsebnosti v prvi polovici maja manjše od vsebnosti v septembru s tendenco nižanja v oktobru. V maju smo našli najmanjšo izmerjeno vsebnost 4,13 ng/g iztrebkov pri samcu z oznako 4. Pri samcu z oznako 2 smo izmerili največjo vsebnost 15,16 ng/g iztrebkov konec septembra. V drugi polovici maja do sredine junija ter v prvi polovici septembra smo ugotovili večanje vsebnosti testosterona (tabela 17, slika 60).

Tabela 17: Razpon vsebnosti testosterona v iztrebkih odraslih samcev grške kornjače (N = 4).

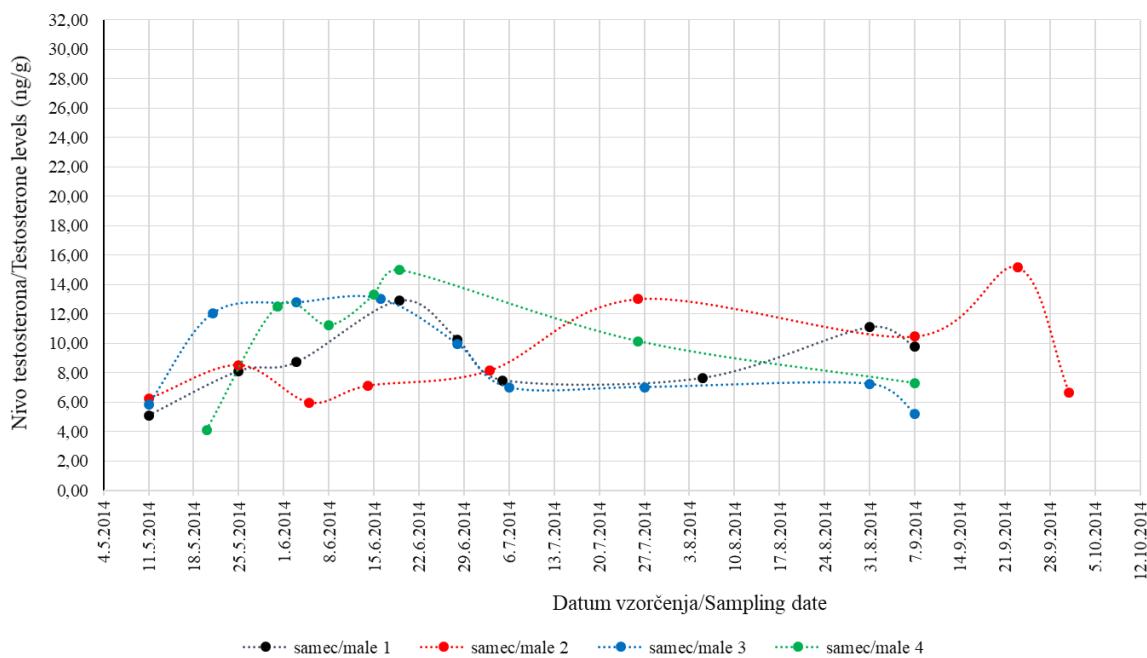
Table 17: Range of testosterone values in faeces of Hermann's Tortoise adult males (N=4).

Odrasli samci/Adult males	Testosteron/Testosterone (ng/g iztrebkov/faeces)	
Mesec/Month	Min	Max
Maj/May	4,13	12,53
Junij/June	6,00	13,30
Julij/July	7,01	14,99
Avgust/August	7,26	11,10
September/September	5,23	15,16
Oktober/October	6,63*	6,63*

* en sam vzorec/single sample

Na sliki 60 je prikazana dinamika testosterona pri vseh odraslih samcih.

Vsebnosti testosterona v iztrebkih pri posameznem odraslem samcu so prikazani na slikah od 47 do 50 (str. 79–80).



Slika 60: Nivo testosterona pri odraslih samcih.

Figure 60: Adult males testosterone levels.

4.3.2.3 Mladi samci

V skupini mladih samcev smo izmerili največje vsebnosti testosterona v mesecu maju. Pri samcu z oznako 2 smo izmerili največjo vsebnost 18,37 ng/g iztrebkov in hkrati pri isti želvi najmanjšo vsebnost konec meseca maja 3,21 ng/g iztrebkov. Pri tej skupini smo opazili veliko nihanja v vsebnostih testosterona od meseca maja do druge polovice julija. Nato se je nihanje nekoliko umirilo, sledil je ponovni dvig vsebnosti v prvi polovici septembra (tabela 18, slika 61).

Tabela 18: Razpon vsebnosti testosterona v iztrebkih mladih samcev grške kornjače (N=4).

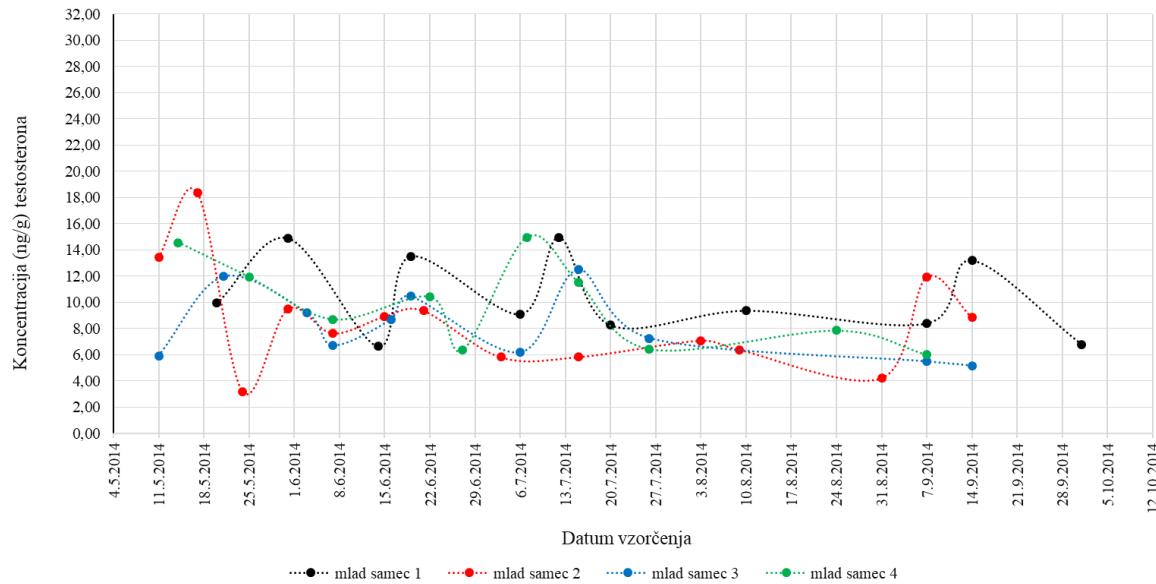
Table 18: Range of progesterone values in faeces of Hermann's Tortoise young males (N=4).

Mladi samci/Young males	Testosteron/Testosterone (ng/g iztrebkov/faeces)	
	Min	Max
Mesec/Month		
Maj/May	3,21	18,37
Junij/June	6,37	13,53
Julij/July	5,83	14,97
Avgust/August	4,24	9,39
September/September	5,16	13,21
Oktober/October	6,80*	6,80*

* en sam vzorec/single sample

Na sliki 61 je prikazana dinamika testosterona pri vseh mladih samcih.

Vsebnosti testosterona v iztrebkih pri posameznem odraslem samcu so prikazani na slikah od 52 do 55 (str. 82–84).



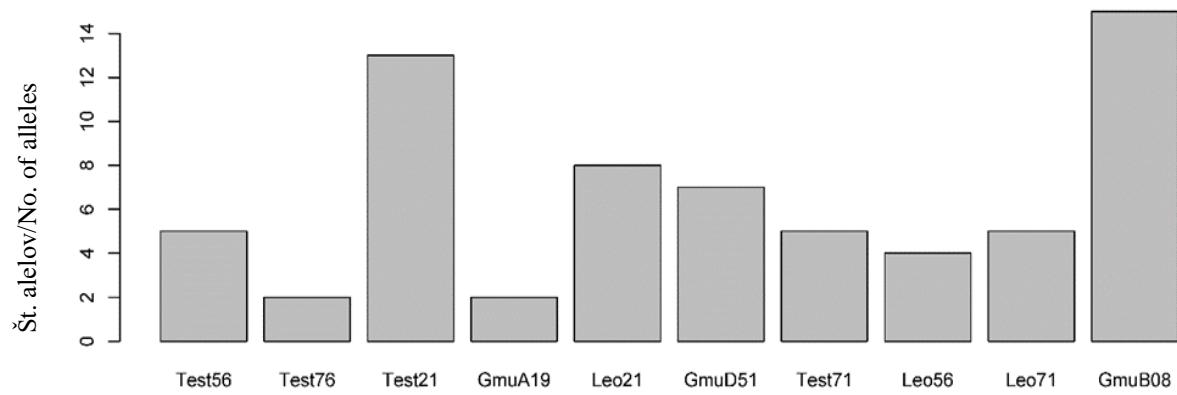
Slika 61: Nivo testosterona pri mladih samcih.

Figure 61: Young males testosterone levels.

4.4 GENETSKE ANALIZE

4.4.1 Mikrosateliti

Vzorce smo analizirali s setom desetih mikrosatelitov. Za posamezne lokuse podajamo število alelov (slika 62) v proučevanem materialu (tabela 19). Največje število alelov smo registrirali na lokusih GmuB08 in Test21, medtem ko sta bila lokusa Test76 in GmuA19 zastopana samo s po dvema aleloma.



Slika 62: Število alelov za posamezne lokuse v proučevanem materialu.

Figure 62: Number of alleles frequency per locus in the experimental material.

Osnovni populacijski parametri kažejo zmerno zmanjšanje efektivnega števila alelov v vseh populacijah glede na skupno število detektiranih alelov v vseh populacijah skupno. Heterozigotnost je bila glede na pričakovano heterozigotnost zmanjšana v populacijah THH-Si, THB-Si in THHz-Si, kar je lahko posledica inbreedinga, lahko pa tudi posledica majhnega števila vzorcev iz posameznih populacij. Fiksacijski indeks se je gibal med -0,251 in 0,187 (tabela 19).

Tabela 19: Osnovni populacijski parametri, ocenjeni na osnovi genotipizacije 10 mikrosatelitnih lokusov.

Legenda: število testiranih osebkov (N), število alelov (Na), efektivno število alelov (Ne), Shanonov indeks informativnosti lokusa (I), opazovana (Ho), pričakovana (He) heterozigotnost, korigirana pričakovana heterozigotnost (uHe) in fiksacijski indeks (F), aritmetična sredina (Am), standardna napaka aritmetične sredine (SE).

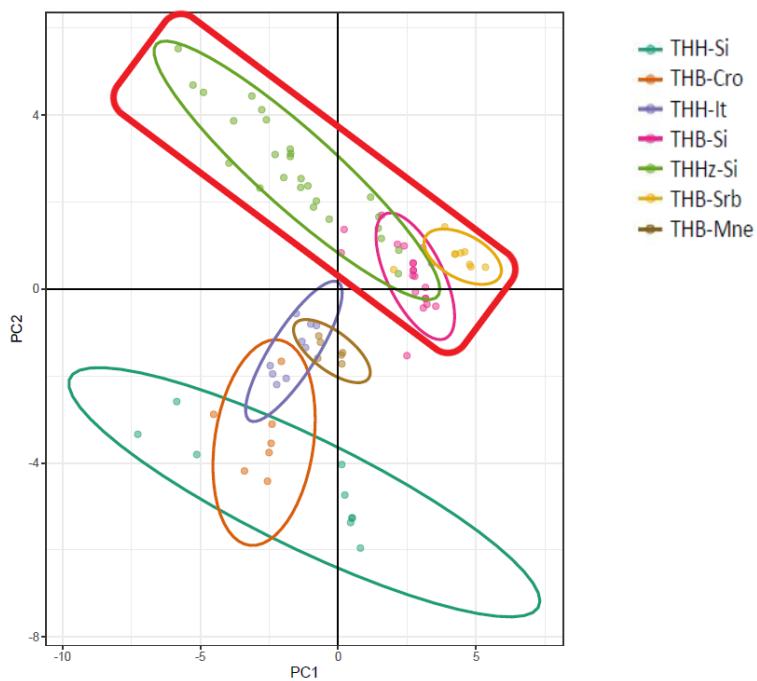
Table 19: Basic population parameters, evaluated on genotyping of 10 microsatellite loci.

Legend: Number of individuals tested (N), Number of alleles (Na), Effective number of alleles (Ne), Shannon information index (I), Observed (Ho), Expected (He) heterozygosity, unbiased expected heterozygosity (uHe) and Fixation index (F), Arithmetic mean (Am), Standard error of arithmetic mean (SE).

Populacija/Population	N	Am/SE	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
THB-Cro	7	/	/	/	/	/	/	/	/
		/	/	/	/	/	/	/	/
THB-Si	21	Am	2,600	1,483	0,423	0,218	0,227	0,233	-0,007
		SE	0,400	0,226	0,134	0,068	0,075	0,076	0,021
THB-Srb	9	Am	1,800	1,365	0,296	0,217	0,172	0,183	-0,219
		SE	0,389	0,201	0,135	0,095	0,076	0,081	
THB-Mne	6	/	/	/	/	/	/	/	/
		/	/	/	/	/	/	/	/
THH-Si	9	Am	3,400	2,032	0,828	0,343	0,441	0,468	0,187
		SE	0,600	0,325	0,161	0,086	0,084	0,089	0,098
THH-It	9	Am	1,000	0,720	0,256	0,163	0,150	0,160	-0,133
		SE	0,447	0,328	0,128	0,075	0,073	0,078	0,074
THHz-Si	26	Am	3,000	2,303	0,750	0,390	0,447	0,456	0,104
		SE	0,856	0,420	0,185	0,072	0,084	0,086	0,074

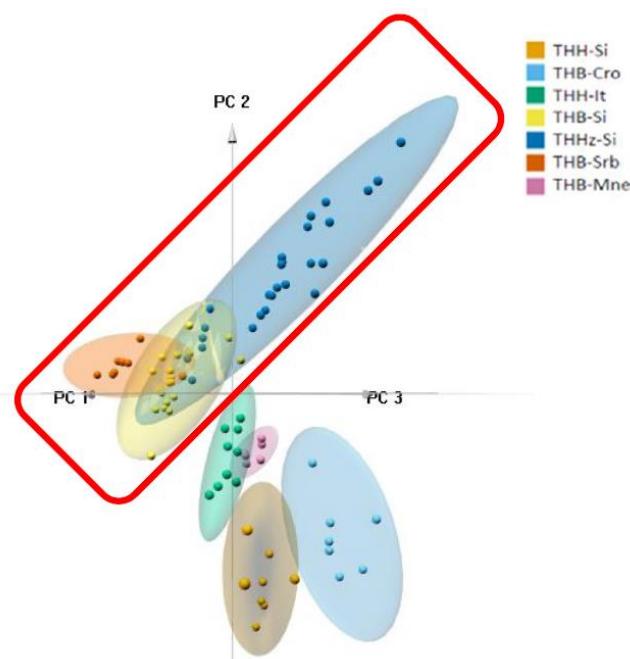
V tabeli podajamo podatke za dve populaciji, ki izpolnjujeta pogoj zadostnega števila osebkov (THB-Si in THHz-Si) in tri populacije, ki so kriterijem blizu (THB-Srb, THH-Si, THH-It). Rezultatov statistične analize ne podajamo za populaciji z manj kot 9 osebki (THB-Cro in THB-Mne)./In the table two population data are presented that meet the condition of a sufficient number of specimens (THB-Si and THHz-Si) and three populations that are close to the criteria (THB-Srb, THH-Si, THH-It). The results of the statistical analysis are not given for the population with less than 9 specimens (THB-Cro and THB-Mne).

Analiza glavnih komponent (PCA) je nakazala ločitev med klastroma THHz-Si, THB-Si, THB-Srb in THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne. Upoštevanje nadaljnjih komponent v PCA ni prineslo izboljšanega ločevanja med populacijami (sliki 63 in 64).



Slika 63: PCA analiza: genotipi mikrosatelitnih lokusov nakazujejo delitev populacij v dva klastra: THHz-Si, THB-Si, THB-Srb (okrožen z rdečo črto) / THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne.

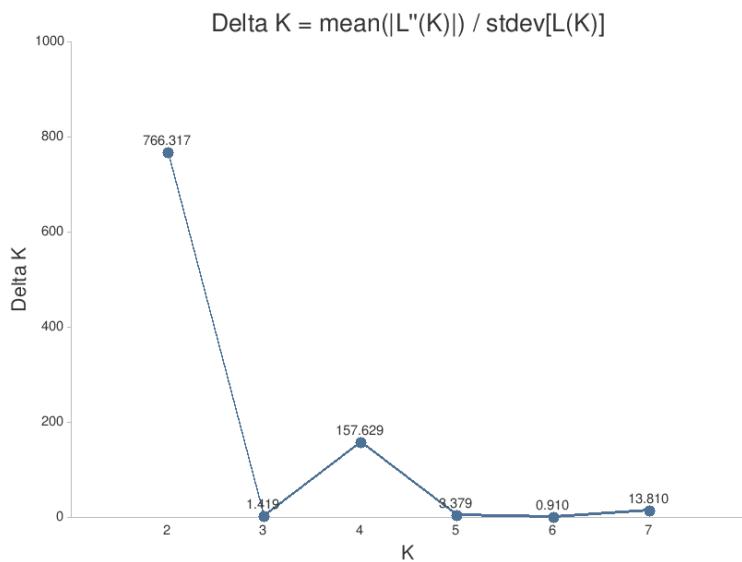
Figure 63: PCA analysis: genotypes of microsatellite suggest splitting of populations in two clusters: THHz-Si, THB-Si, THB-Srb (circled by red line) / THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne.



Slika 64: PCA analiza genotipov mikrosatelitnih lokusov: 3D predstavitev delitve na dve skupini, THHz-Si, THB-Si, THB-Srb (klaster je obkrožen z rdečo črto) in THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne.

Figure 64: PCA analysis of microsatellite genotypes: 3D presentation of division into two groups: THHz-Si, THB-Si, THB-Srb (cluster is circled by red line) and THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne.

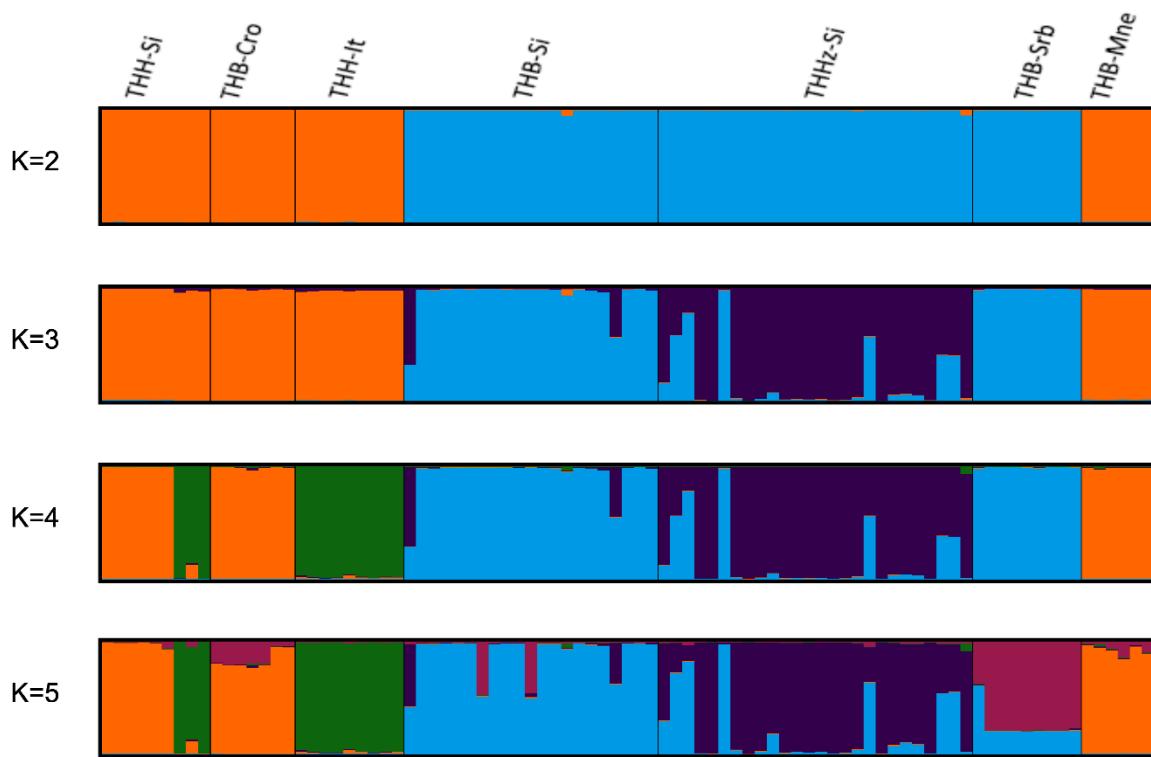
Analiza STRUCTURE podpira delitev populacij v dva klastra, ki se nadalje delita še vsak na dva podklastra. Najprimernejšo vrednost za $K = 2$ smo izračunali z orodjem Clumpak (83). Ocena najverjetnejšega K za program STRUCTURE je prikazana na sliki 65.



Slika 65: Prikaz najustreznejše vrednosti za K v analizi STRUCTURE za obravnavani set podatkov.

Figure 65: Presentation of the most appropriate K value in the STRUCTURE analysis for our data set.

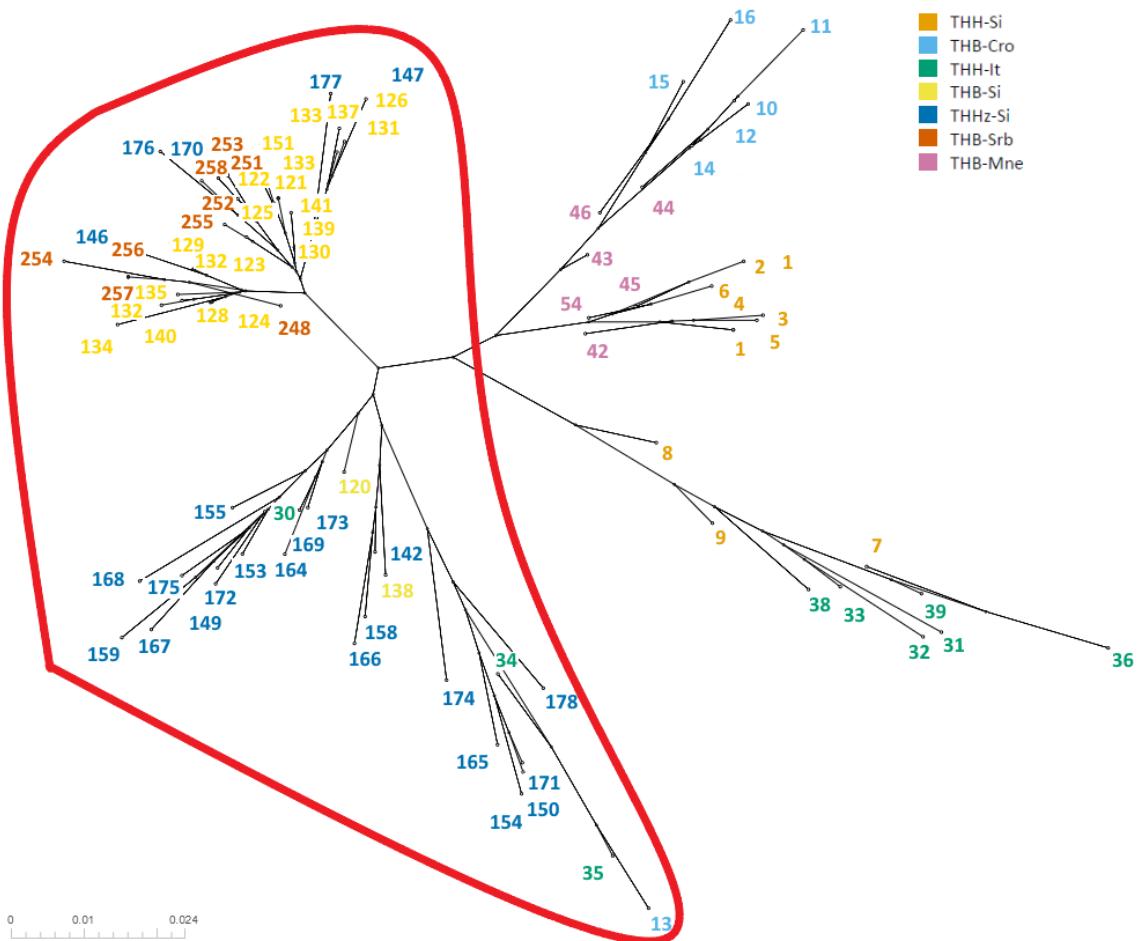
STRUCTURE kaže prvo grobo delitev na dve skupini, ki pa sta po geografskem poreklu obe mešani skupini *Testudo hermanni hermanni* in *Testudo hermanni boettgeri*. Pri $K = 3$ se pojavi *Testudo hermanni hercegovinensis* kot samostojna skupina. Pri $K = 4$ se znotraj skupine THH-Si pokaže poddelitev, ki verjetno izvira iz heterogenosti materiala v THH-Si in nakazuje prisotnost genotipov, značilnih za *Testudo hermanni hermanni* v slovenski populaciji v ujetništvu. Italijanska populacija *Testudo hermanni hermanni* se tudi diferencira od prvotne skupine. Pri $K = 5$ lahko identificiramo populacijo iz Srbije, ki se loči od populacij *Testudo hermanni boettgeri* v Sloveniji in Črni gori. Na sliki 66 predstavljamo delitve populacij za vrednosti $K = 2$ do $K = 5$, pri čemer razdelitev pri $K = 5$ najbolje ustreza strukturi naših vzorcev.



Slika 66: Analiza STRUCTURE: najverjetnejša vrednost za K je 5 (Evanno).

Figure 66: The STRUCTURE analyses: the highest value for K is 5 (Evanno).

Grupiranje mikrosatelitnih genotipov, ki jih predлага analiza STRUCTURE, smo prikazali tudi na drevesu, ki tudi podpira delitev vzorcev na dva klastra (THHz-Si, THB-Si, THB-Srb / THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne), ki se nato še delita na podgrupe (slika 67).



Slika 67: Drevo genotipov mikrosatelitnih lokusov.

Geografske populacije so predstavljene z različnimi barvami, številke predstavljajo posamezne vzorce. Graf podpira delitev populacij v dve skupini; THHz-Si, THB-Si, THB-Srb (okrožene z rdečo črto) / THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne. Celoten material bi lahko razdelili na pet klastrov, kar je skladno z rezultati, ki smo jih dobili s programom STRUCTURE.

Figure 67: Microsatellite loci tree of genotypes.

Geographical populations are presented by different colours, numbers represent individual samples. Graph supports dividing population into two groups; THHz-Si, THB-Si, THB-Srb (circled by red line) / THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne. Further division into five groups is suggested, supported by the STRUCTURE software.

4.4.2 Analiza mitochondrijske DNK

Z analizo mtDNK smo proučevali strukturo zbranega biološkega materiala po posameznih populacijah in medpopulacijske odnose. Poleg identifikacije različnih haplotipov mtDNK in njihove uporabe za identifikacijo različnih populacij smo na osnovi analize sekvenč posameznih osebkov našli tudi primere heteroplazmije pri želvah.

V poravnavi 188 zaporedij 12S rRNK dolžine 284 baznih parov smo med zaporedji *Testudo hermanni* identificirali tri polimorfna mesta in tri haplotipe. Haplotipi, ki smo jih identificirali v našem celotnem materialu in vključujejo tudi dve sorodni vrsti (*Testudo graeca* in *Testudo marginata*), so prikazani na sliki 68. Pri *Testudo graeca* in *Testudo marginata* smo našli še tri dodatne haplotipe, ki jih karakterizira dodatnih 18 polimorfnih mest znotraj gena za 12S rRNK. Rezultati predstavljajo analizo očiščenih sekvenčnih podatkov, kjer smo z ročnim pregledom sekvenc zagotovili ustrezno kakovost podatkov. Polimorfna mesta mtDNK haplotipov *Testudo hermanni hermanni*, *Testudo hermanni boettgeri*, *Testudo hermanni hercegovinensis*, *Testudo marginata* in *Testudo graeca* so zbrana v tabeli 20. Kot referenčno sekvenco za grško kornjačo smo uporabili delno zaporedje mtDNK za to vrsto (DQ080046.1), za mavrsko kornjačo (*Testudo graeca*) smo uporabili zaporedje NC_007698.1 in za širokorobo kornjačo (*Testudo marginata*) zaporedje NC_007692.1.

Tabela 20: Haplotipi definirani na osnovi poravnave odseka mtDNK, del 12S rRNK.

Polimorfna mesta, ki ločujejo haplotipe znotraj *Testudo hermanni* so označena rumeno.

Table 20: Haplotypes, defined according to alignment of mtDNA coding for a portion of 12S rRNA.

Polymorphic sites differentiating haplotypes within *Testudo hermanni* are labelled yellow.

		Zaporedna številka nukleotida v poravnavi/No. of nucleotide in alignment																				
Haplotype/Haplotype	Št. vzorcev/ No. of samples	30	44	58	59	63	70	71	72	73	80	88	90	98	105	111	119	153	208	266	267	278
Ref. DQ080046.1	/	C	C	G	T	C	G	C	G	A	C	A	A	T	G	T	G	A	C	G	T	G
I	123
II	5	T
III	10	T	.	T	
IV	12	.	.	A	.	T	A	.	T	G	T	G	.	C	.	G	.	G	.	A	A	
V	16	.	.	A	.	T	A	.	T	G	T	G	.	C	.	G	.	G	.	T	A	
VI	22	.	T	.	C	.	.	T	T	.	T	.	G	G	A	C	A	G	T	.	.	

Haplotip I je bil prevladujoč haplotip v našem materialu in je bil prisoten v vseh populacijah *Testudo hermanni*, razen v populaciji *Testudo hermanni hermanni* iz Italije. Drugi haplotipi so se pojavljali le v določenih populacijah, haplotip II le v populacijah *Testudo hermanni boettgeri* v Sloveniji in *Testudo hermanni boettgeri* v Srbiji, haplotip III v populacijah *Testudo hermanni hermanni* v Sloveniji in Italiji ter *Testudo hermanni hercegovinensis* v Sloveniji. Haplotipa IV in V smo našli le v populaciji mavrske kornjače (*Testudo graeca*), haplotip VI pa v populaciji širokorobe kornjače (*Testudo marginata*). Razporeditev haplotipov po geografsko opredeljenih skupinah je prikazana v tabeli 21.

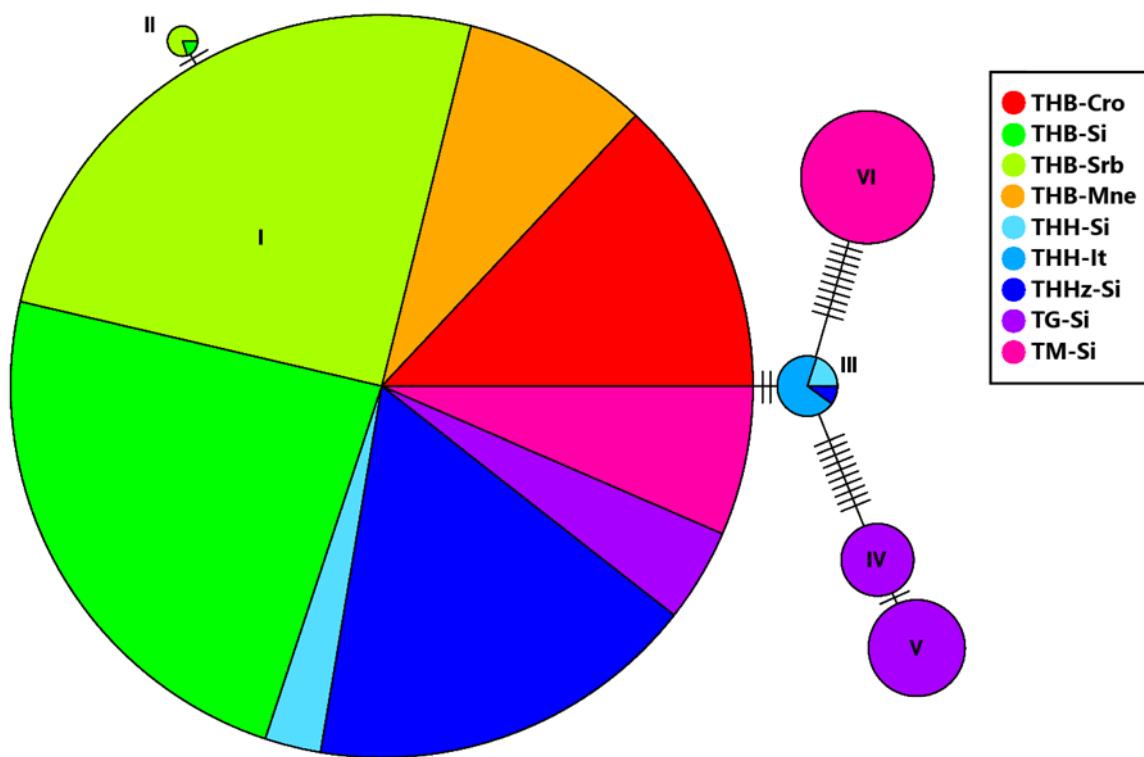
Tabela 21: Razporeditev haplotipov po geografsko opredeljenih skupinah.

Table 21: Haplotypes arrangement based on geographical distribution.

Haplotip/Haplotype/ Populacija/Populatio n	THB- Cro	THB- Si	THB- Srb	THB- Mne	THH- Si	THH- It	THHz- Si	TG- Si	TM- Si
I	16	29	31	10	3	0	21	5	8
II	0	1	4	0	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	2	7	1	0	0
IV	0	0	0	0	0	0	0	12	0
V	0	0	0	0	0	0	0	16	0
VI	0	0	0	0	0	0	0	0	22
Skupaj/Total	16	30	35	10	5	7	22	33	30

Legenda (oznaka populacije- vrsta in lokacija vzorca): THB-Cro: *Testudo hermanni boettgeri* – Hrvaška; THB-Si: *Testudo hermanni boettgeri* – Slovenija; THB-Srb: *Testudo hermanni boettgeri* – Srbija; THB-Mne: *Testudo hermanni boettgeri* – Črna gora; THH-Si: *Testudo hermanni hermanni* – Slovenija; THH-It: *Testudo hermanni hermanni* – Italija; THHZ-Si: *Testudo hermanni hercegovinensis* – Slovenija; TG-Si: *Testudo graeca* – Slovenija; TM-Si: *Testudo marginata* – Slovenija./Legend (population mark- species and location of the sample): THB-Cro: *Testudo hermanni boettgeri* – Croatia; THB-Si: *Testudo hermanni boettgeri* – Slovenia; THB-Srb: *Testudo hermanni boettgeri* – Serbia; THB-Mne: *Testudo hermanni boettgeri* – Monte Negro; THH-Si: *Testudo hermanni hermanni* – Slovenia; THH-It: *Testudo hermanni hermanni* – Italia; THHZ-Si: *Testudo hercegovinensis* – Slovenia; TG-Si: *Testudo graeca* – Slovenia; TM-Si: *Testudo marginata* – Slovenia.

Mreža haplotipov na sliki 68 kaže razširjenost haplotipa I v analiziranih populacijah in jasno ločitev mtDNK haplotipov populacij, ki pripadajo drugim vrstam, *Testudo graeca* in *Testudo marginata*.



Slika 68: Mreža haplotipov, ki ponazarja zastopanost različnih populacij v posameznih haplotipih.

Oznake na črtah, ki povezujejo haplotipe, predstavljajo število baznih parov, v katerih se zaporedja analiziranega odseka mtDNA predstavnikov posameznih haplotipov razlikujejo. Deleži skupin, ki pripadajo istemu haplotipu, so predstavljeni z različnimi barvami v tortnem diagramu.

Figure 68: Piechart showing representation of different population within identified haplotypes.

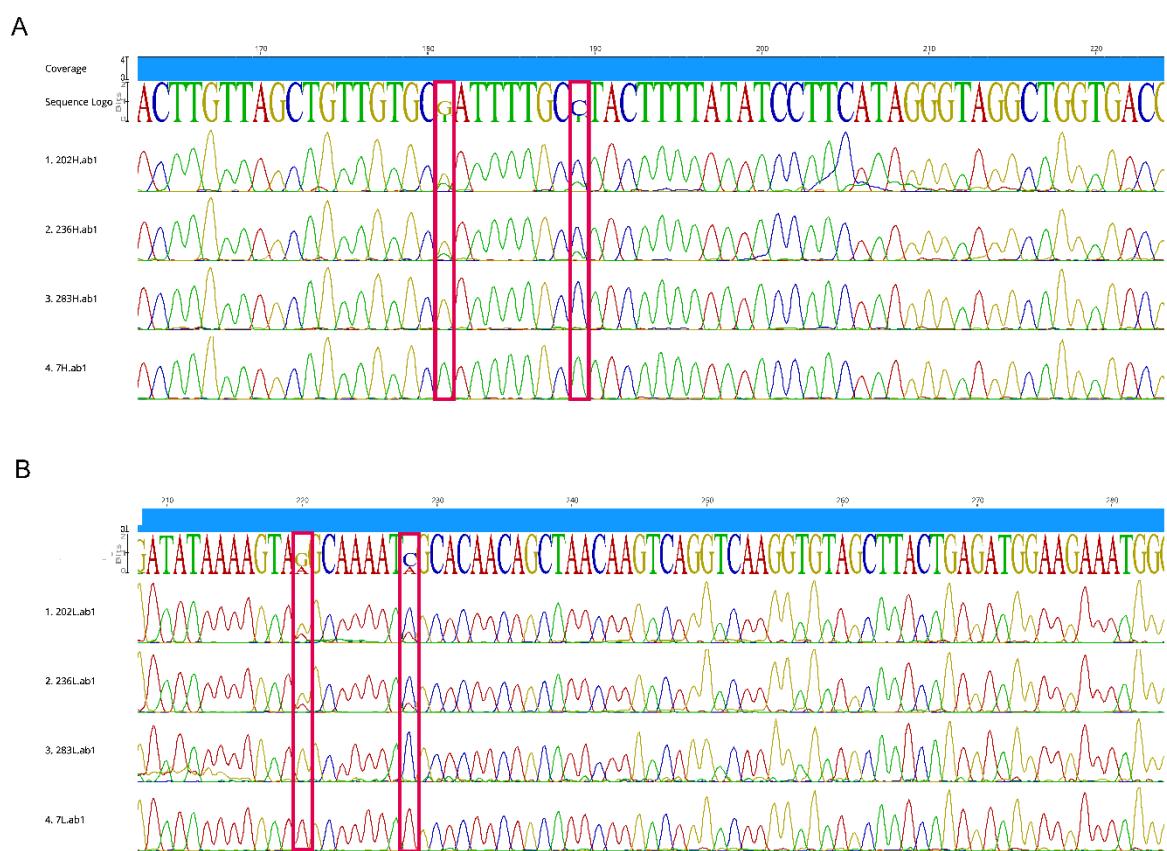
Markings on lines that connect haplotypes represent the number of base pairs in which the sequences of the analysed mtDNA segment of the representatives of each haplotype differ. The proportions of groups belonging to the same haplotype are represented by different colours in the pie chart.

Haplotipi, ki smo jih sekvencirali v našem poskusnem materialu, imajo v izbranem delu gena za 12S rRNK tri polimorfna mesta, kar rezultira v treh haplotipih za grško kornjačo oben priznanih in ene nepriznane podvrste (*Testudo hermanni hermanni* in *Testudo hermanni boettgeri* ter *Testudo hermanni hercegovinensis*). Poleg vzorcev grške kornjače smo analizirali tudi 33 vzorcev mavrske kornjače in 30 vzorcev širokorobe kornjače, pri katerih smo našli tri haplotipe z 18 polimorfnimi mesti. Nukleotidna zaporedja teh dveh vrst smo primerjali z referenčnimi nukleotidnimi zaporedji mtDNK (*Testudo graeca* ref. NC_007698.1, *Testudo marginata* ref. NC_007692.1). V našem materialu smo poleg razlik v haplotipih opazili tudi prisotnost več haplotipov v enem organizmu, t. i. heteroplazmijo. Mesta, ki dokumentirajo heteroplazmatsko stanje, so označena na slikah 69 in 70.



Slika 69: Odsek poravnave vseh šestih haplotipov in dveh heteroplazmatskih vzorcev. Z IUPAC-kodo sta označeni mesti, ki v vzorcih Het1 in Het2 nakazujeta heteroplazmijo.

Figure 69: Alignment of six haplotypes. With IUPAC code are signed the sites indicating heteroplasmy in samples Het1 and Her2.



Slika 70: Poravnava kromatogramov.

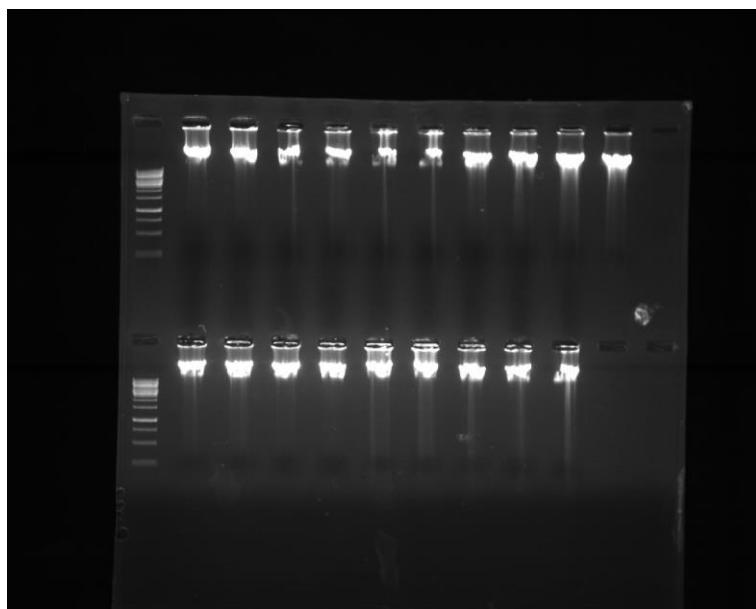
Označeni sta mesti, kjer smo odkrili heteroplazmijo. A: sekvenca težke verige, B: sekvenca lahke verige.

Figure 70: Alignment of chromatograms.

Heteroplasmatic sites are framed. A: sequence of the heavy chain, B: sequence of the light chain.

4.4.3 Sekvenciranje genoma grške kornjače

Za sekvenciranje združenih vzorcev DNK ženskih in moških osebkov smo uporabili po pet izolatov genomske DNK za vsak spol. Vsaka mešanica oz. pool je vseboval enake deleže genomske DNK vseh petih osebkov. Skupna količina DNK v poolih za pripravo genomske knjižnice je znašala pribl. 30 mg. Na sliki 71 je prikazana genomska DNA, izolirana iz krvi samcev in samic.



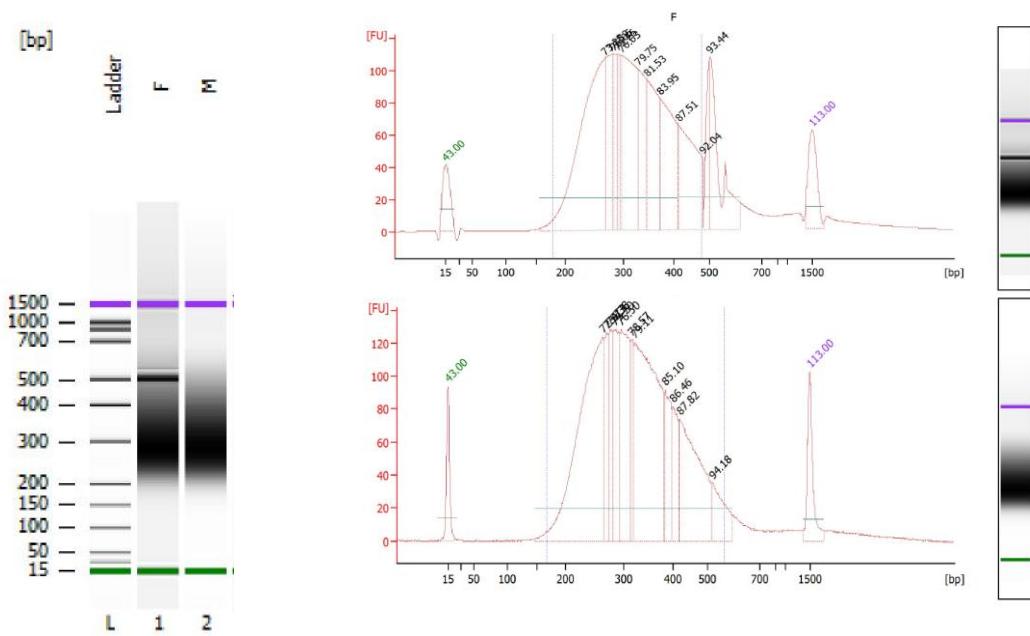
Slika 71: Genomska DNA samic (zgornja vrstica) in samcev (spodnja vrstica).

Vsak vzorec je nanesen v duplikatu razen moškega vzorca številka 5.

Figure 71: Genomic DNA of females (upper row) and males (lower row).

Each sample is shown in duplicates except for the male sample number 5.

Velikostna porazdelitev fragmentov za pripravo knjižnice je prikazana na sliki 72.

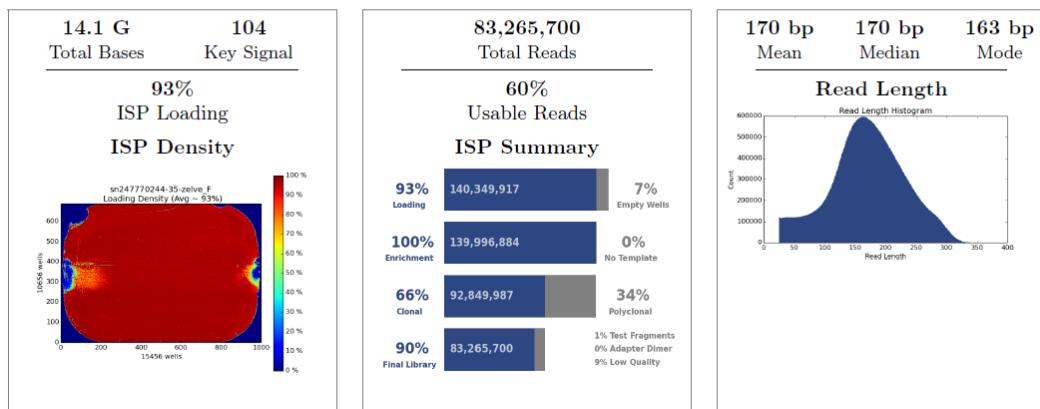


Slika 72: Velikost fragmentov za pripravo knjižice. F in M označujeta ženski in moški združeni vzorec DNK.
Figure 72: Size distribution of fragments for library preparation. F and M designate female and male DNA pool, respectively.

Povprečna dolžina fragmentov za pripravo obeh knjižnic je bila 300 bp, disperzija je bila nekoliko večja v skupnem vzorcu ženske DNK (slika 72). V združenih vzorcih ženske in moške DNK kontaminacije z RNK ni bilo zaznati (slika 71).

Run Report for Auto_sn247770244_sn247770244-35-zelve_F_287

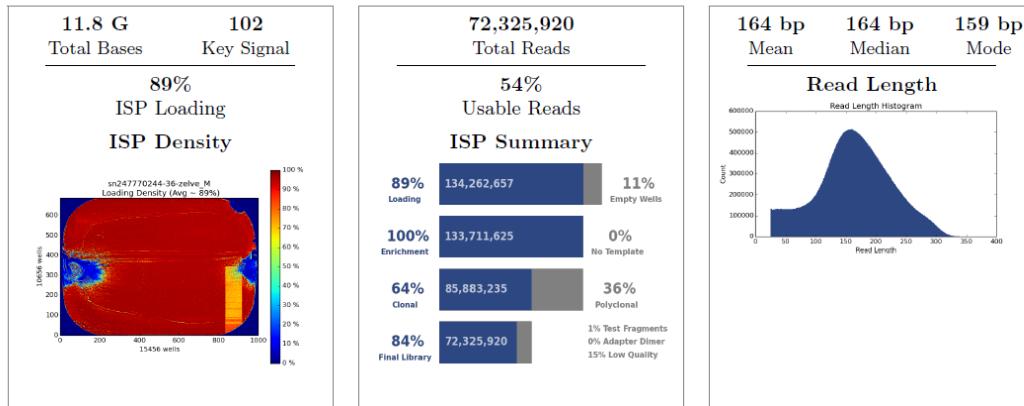
Run Summary



Slika 73: Statistični parametri sekvenciranja skupnega vzorca DNK samic.
Figure 73: Statistical parameters of sequencing of female pool DNA.

Run Report for Auto_sn247770244_sn247770244-36-zelve_M_288

Run Summary



Slika 74: Statistični parametri sekvenciranja skupnega vzorca DNK samcev.

Figure 74: Statistical review of sequencing of male pool DNA.

S sekvenciranjem skupnega vzorca DNK ženskih osebkov smo dobili 14,1 Gbp sekvence, porazdeljene v 83.265.700 odčitkov (60 % uporabnih odčitkov od celotnega števila) s povprečno dolžino 170 bp (slika 73). Sekvenciranje skupnega vzorca DNK moških osebkov je dalo 11,8 Gbp zaporedij v 72.325.920 odčitkih (54 % uporabnih odčitkov od celotnega števila) s povprečno dolžino 164 bp (slika 74).

S sekvenciranjem skupnih vzorcev moških in ženskih živali smo dosegli 3- do 4-kratno pokritje celotnega genoma grške kornjače z odčitki, kar bi moralo zadoščati za odkritje velikih strukturnih razlik med moškim in ženskim genomom, ki bi ga predstavljeni spolni kromosomi ali veliki spolno specifični kromosomski odseki.

4.4.3.1 Poravnava odčitkov na referenčni genom

Za referenčni genom smo izbrali zaporedje *Gopherus evgoodei* (rGopEvg1_v1.p) (ang. Goode's Thornscrub Tortoise), ki je zloženo v kromosome in obsega 2298564209 baznih parov. Za poravnavo na referenčni genom smo po preverjanju kakovosti odčitkov uporabili 81.615.129 ženskih in 70.195.988 moških odčitkov. Statistika uspešnosti poravnave odčitkov je podana v tabeli 22.

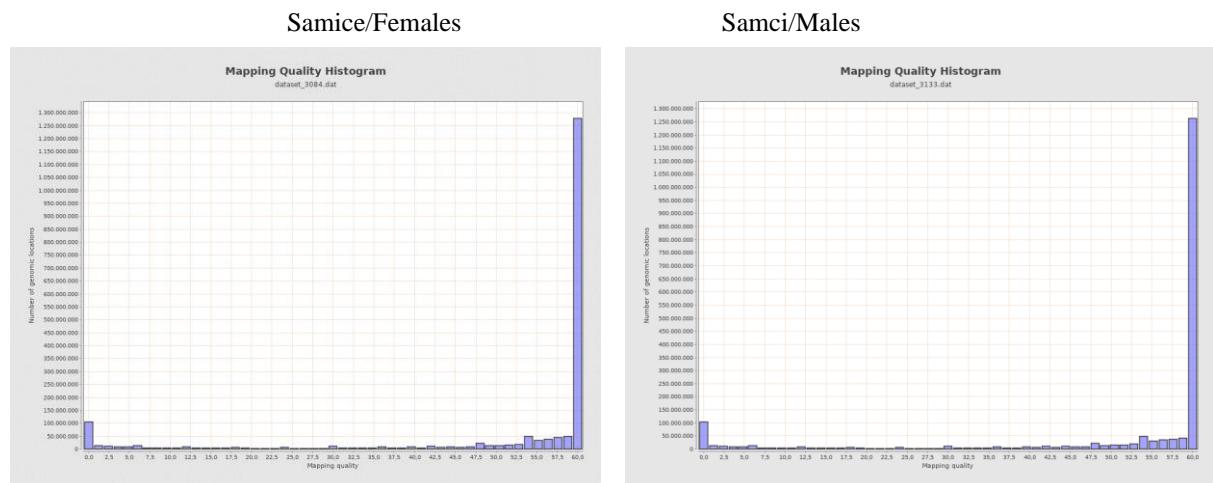
Tabela 22: Povzetek ocene poravnave odčitkov na referenčni genom.

Table 22: Summary of estimated alignment of reads on reference genome.

	Samice/Females	Samci/Males
Število odčitkov/No. of reads	81.615.129	70.195.988
Poravnani odčitki/Aligned reads	74.469.976 / 91,25 %	62.908.287 / 89,62 %
Neporavnani odčitki/Non-aligned reads	7.145.153 / 8,75 %	7.287.701 / 10,38 %

Število neporavnanih odčitkov se v obeh združenih vzorcih giblje okrog 10 % vseh odčitkov, kar je ob upoštevanju dejstva, da smo morali uporabiti za poravnavo genom druge vrste, pričakovani delež.

Na sliki 75 je za oba združena vzorca prikazana kakovost poravnava, ki kaže na zelo dobro kakovost večine poravnava (ocena kakovosti poravnave (MQ) 60,0 in zelo majhen delež poravnava z manjšo kakovostjo). Ta rezultat podpira ustreznost izbire genoma druge vrste za poravnavo naših sekvenc.



Slika 75: Kakovost poravnave odčitkov združenih ženskih in moških vzorcev DNK na referenčni genom.

Figure 75: Mapping quality of reads of female and male DNA pools with the reference genome.

Primerjalna analiza odčitkov obeh združenih vzorcev ne kaže večjih odsekov genoma, ki bi bili prisotni v enem in ne v drugem združenem vzorcu. Mesta, kjer je pokritost slabša, se med združenima vzorcema bistveno ne razlikujejo, kar kaže na dejstvo, da ni diferencialnih odsekov genoma med samicami in samci. To podpira domnevo, da spol pri *Testudo hermanni* ni determiniran s spolnimi kromosomi.

4.4.3.2 Pregled kandidatnih genov

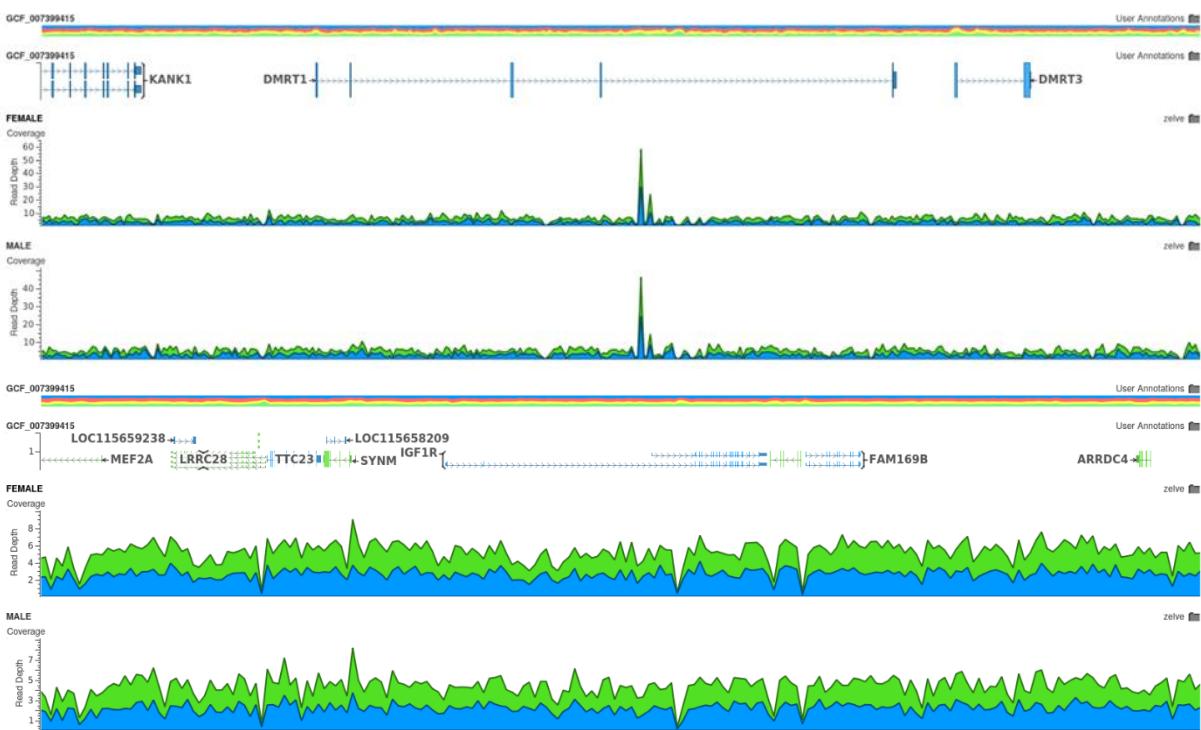
V tabeli 23 je predstavljen seznam kandidatnih genov za diferenciacijo spola, ki smo jih zbrali s sistematičnim pregledom literature in so bili že povezani z determinacijo spola pri nekaterih želvah, dvoživkah in plazilcih.

Tabela 23: Seznam kandidatnih genov za diferenciacijo spola.

Table 23: List of candidate genes for sex differentiation.

Gen	Referenca/References
<i>CIRBP</i>	(37, 38)
<i>HOX</i> družina	(39)
<i>Dmrt1, Wt1</i>	(36)
<i>tSox9, tWt1, tSf1, tDmrt1, tWnt4, tDax1, tMis</i>	(31)
<i>Amh, Ar, Esr1, Fog2, Gata4, Igf1r, Insr, Lhx9, β-catenin, Foxl2, Aromatase</i>	(40)
<i>Fst, Nf-kb, Crabbp2, Jak-Stat, Nf-κB, retinoic-acid, Wnt, Mapk-signaling, Xist</i>	(40)

Za vseh 31 lokusov smo pregledali kodogene regije in njihovo okolico z namenom, da bi identificirali strukturne genomske spremembe ali spolno specifične mutacije. Na nobenem od proučevanih lokusov nismo našli spolno specifičnih razlik med združenima vzorcema obet spolov. V kandidatni regiji okrog gena CIRBP, ki je po literaturnih podatkih veljala za najobetavnejšo, nismo uspeli najti strukturnih razlik (podvojitev, velikih delecijs, velikih insercij) med ženskim in moškim skupnim vzorcem DNK. Slika 76 kaže strukturo genomskega zaporedja dveh kandidatnih lokusov (DMRT1 in Igf1R), kjer tudi ni bilo značilnih razlik med moškim in ženskimi združenimi vzorcem. Takšna analiza je bila narejena za vseh 31 kandidatnih lokusov in nobena ni pokazala značilnih razlik med spoloma.



Slika 76: Primerjava združenega moškega in ženskega DNK vzorca z referenčnim genomom *Gopherus evgoodei* (rGopEvg1_v1.p) v območju kandidatnih genov DMRT1 (zgoraj) in IGF1R (spodaj).

Figure 76: Comparison of sequence alignments of female and male DNA pool aligned to the reference genome of *Gopherus evgoodei* (rGopEvg1_v1.p) in the region of the candidate genes DMRT1 (upper part) and IGF1R (lower part).

5 RAZPRAVA

5.1 REPRODUKCIJA GRŠKIH KORNJAČ V VZREJI

5.1.1 Izleganje jajc

Spolna aktivnost pri grški kornjači traja od marca do oktobra. V naši raziskavi je izleganje potekalo pretežno v mesecu juniju, posamezne želve so izlegale v mesecu juliju. Začetek sezone izleganja jajc v posameznem letu je bil identičen. Za razliko od naše raziskave je Bertolero s sodelavci (2007) pri podvrsti *Testudo hermanni hermanni* na Korziki ugotovil, da so izlegale le maja in junija (63). V Franciji so ugotovili, da gnezdenje poteka od sredine maja do začetka julija, v Grčiji pa od konca aprila do konca junija (28). Ta razlika ustreza hladnejšim podnebnim razmeram na farmi v Sloveniji ter drugi podvrsti v primerjavi z Italijo in Francijo. Tako kot v naši raziskavi, je tudi Bertolero s sodelavci (2007) ugotovil, da ni bilo časovnih razlik med prvim in drugim gnezdom. Glede na čas izleganja gnezd so ugotovili, da so bila prva gnezda skoncentrirana v maju, druga in tretja gnezda pa v juniju (63), med tem ko so bila v naši raziskavi prva gnezda v juniju, druga gnezda pa v drugi polovici junija in začetku julija.

Iskanje mesta izleganja najpogosteje traja 15 minut, lahko tudi do nekaj ur. Gnezda največkrat izkopljejo zgodaj popoldne, sam akt izkopavanja traja od dve do šest ur (28). Mesto izleganja jajc je v korelaciji s temperaturo tal. Pozno popoldan oz. zgodaj zvečer, še pred temo, so temperature izbranega mesta najprimernejše (28). V naši raziskavi so želve gnezdo izkopale večinoma dopoldne, od 10 do 13 ure (prvo leto jih je v tem času izlegalo 81,3 %; drugo leto 76,9 %, tretje leto 80,0 %). Posamezne samice so prekinile izkop gnezda in največkrat začele z novim izkopom naslednji dan. Swingland in Stubbs (1985) navajata, da samica z vonjem zaznava opazovalca in prekine z izleganjem (28). V naši raziskavi nismo ugotavljali, če so želve občutljive na zunanje vplive pri pripravi gnezda. Želve začnejo s samim aktom izleganja jajc in dovoljno opazovanje.

Samice so izkopavale luknjo izključno z zadnjimi nogami. Velikost izkopanega gnezda je bila povezana z velikostjo oz. veslajem (radius) zadnjih nog. Po končanem izkopavanju je sledil kratek počitek in nato izleganje jajc. Intervalli med izleganjem posameznega jajca so bili dolgi vsaj 90 sekund. Po izleganju zadnjega jajca je samica s kremlji urejala položaj posameznega jajca tudi do pol ure.

Ko so bila vsa jajca na svojem mestu, je hitro prekrila z zemljo celotno gnezdo tako, da se mesto izkopa ni ločilo od okolice. Podobne rezultate sta ugotavljala tudi Swingland in Stubbs (1985) (28).

Pearse s sodelavci (2001) je v njihovi raziskavi dokazal, da se plodnost ob odsotnosti samcev signifikantno zmanjša z vsako naslednjo sezono, čeprav se v ženskem spолнem traktu ohranijo žive semenčice za daljše obdobje. Želje samice predstavljajo enega od izjemnih živalskih fenomenov. V svojih jajcevodih oz. tubulih lahko hranijo spermo tudi več kot tri leta (92). Cheylan (2001) navaja, da jo hranijo v tubulih in vodih submukoznih žlez na robu velikih žleznih segmentov beljaka in materničnih regijah jajcevoda (93).

V naši raziskavi smo sledili in opazovali vpliv odsotnosti samcev na število izleženih jajc kot tudi odstotek neoplojenih jajc *Testudo hermanni boettgeri*. Od 50 opazovanih samic je prvo leto izlegalo 76,0 % (38 želv), drugo leto se je število izlegajočih samic zmanjšalo sprva na slabo četrtino (12 želv) ter tretje leto nato na slabo desetino (4 želve). Skupno število izleženih jajc je upadlo od 166 jajc v prvem letu na 41 v drugem letu (24,7 % v primerjavi s prvim letom). V tretjem letu je število upadlo na 17 jajc (10,2 % v primerjavi s prvim letom). Ugotavljam, da je skladno z manjšim številom izlegajočih želv upadlo tudi skupno število jajc. Očitna razlika je bila opazna tudi v primerjavi med velikostjo prvega in drugega gnezda v vseh treh letih raziskave. V literaturi nismo zasledili vzroka za takšno zmanjšanje izleganja jajc ob odsotnosti samcev. V prvem letu je bil odstotek vseh samic, ki so izlegale jajca ob prvem gnezdenju, 81,3 %, ob drugem gnezdenju smo pričakovali višji odstotek, a je bil le 18,7 %. Cutuli s sodelavci (2013) je v svoji raziskavi dobil boljše rezultate; leto od oddvojite samic od samcev je prvo gnezdo izleglo 14 od 15 želv samic podvrste *Testudo hermanni hermanni* (93,3 %), drugo gnezdo so izlegle 4 želve (26,7 %) od 15 želv (26). V nadaljevanju naše raziskave je bil v drugem letu odstotek samic, ki so tisto leto izlegale jajca ob prvem gnezdenju, 95,1 %, presenetljivo je bil ob drugem gnezdenju le 4,9 %, v tretjem letu pa je bil odstotek samic, ki so tisto leto izlegale jajca ob prvem gnezdenju, 82,4 %, ob drugem gnezdenju so bili odstotki primerljivi s prvim letom (17,6 %). Na tem mestu se postavlja vprašanje, kako samice regulirajo oplodnjo svojih jajc in zakaj gnezdijo navkljub odsotnosti samca. Pearse s sodelavci (2001) ugotavlja, da je poleg odsotnosti samca, vzrok za zmanjšanje uspešnega oplojevanja tudi slabša oziroma manjša količina shranjenih semenčic v maternici. Menimo, da je tudi to lahko vzrok nizke oploditve izleženih jajc v tretjem letu.

V naši raziskavi nobena želva podvrste *Testudo hermanni boettgeri* ni izlegla treh gnezd v posamični aktivni sezoni. Časovni razpon med zaporednima gnezdoma je znašal 11 do 26 dni. Bertolero s sodelavci (2007) je pri *Testudo hermanni hermanni* na Korziki proučeval interval med dvema gnezdoma kot tudi število dni med dvema zapovrstnima izleganjema. Med prvim in drugim gnezdenjem je ugotovil podobni časovni razmik, to je v povprečju 21,2 dneva oz. 19,9 dneva (63). Cheylan (2001) navaja 10 do 21 dni (94). Cutuli s sodelavci (2013) piše, da imajo samice ponavadi dva do tri gnezda na aktivno sezono v razmiku 15 do 20 dni (26). V naši raziskavi je sezona izleganja jajc prvo leto trajala 30 dni, naslednje leto 22 dni in tretje leto 26 dni. Slednje kaže na razlike v letih, kar je odvisno tako od posameznih želv kot vremenskih pogojev. Prvo leto je izlegalo večje število želv, kar doprinese k daljšemu izleganju jajc.

Pregled želv, ki so izlegala jajca v naši raziskavi, je pokazal, da sta dve od teh želv izlegali jajca vsako leto, devet je izlegalo jajca prvi dve leti in ena želva je izlegala jajca prvo in tretje leto. Dve želvi sta v obdobju treh let vsaka po petkrat izlegli skupaj 20 oz. 15 jajc. Zakaj želve v posameznem letu izlegajo eno ali več gnezd, ni popolnoma jasno. Domnevamo, da vpliva več faktorjev hkrati, kot so prehrana, podnebne razmere, zaloga semena. V naši raziskavi je najtežja želva izlegla sedem jajc v enem gnezdu, kar je bilo največje število jajc na gnezdo. Zanimivo je, da ta želva ni izlegla še drugega gnezda, zato v skupnem številu jajc ni dosegla največjega števila jajc. Po vsej verjetnosti velikost želve ni pomembna za uspešno izleganje jajc in reprodukcijo. Bertolero s sodelavci (2011) (5) je v svoji raziskavi ugotovil velikost gnezda tudi do devet jajc. Glede na rezultate naše raziskave lahko zaključimo, da ni pomembno samo zmanjšano število izleženih jajc, zmanjšana je tudi oplodnja jajc. Zanimivo je, da je povprečno število izleženih jajc na gnezdo ostalo med leti skoraj enako.

Pričakovali smo, da si s shrambo semenčic omogočijo oplodnjo jajc vsako leto. Razumljivo je, da so pogoji v naravi spremenljivi, zato so t. i. samoukrepi kornjač ob neugodnih razmerah (npr. pomanjkanje hrane, neugodne klimatske razmere) največkrat opaženi z zmanjšano reprodukcijo. Na tem mestu se postavi vprašanje, kaj je glavni sprožitelj izločanja semenčic iz tubulov v maternici oz. kaj vpliva na ovulacijo in s tem na število jajčec.

5.1.2 Velikost in oblika jajc

Velikost in oblika jajc se lahko zelo razlikuje znotraj vrste, celo znotraj gnezda samega. Jajca grške kornjače so bele barve, imajo trdo lupino in so skoraj eliptične oblike (5). Naša raziskava je potrdila, da so jajca znotraj gnezda različne velikosti in oblik. Na osnovi teh podatkov lahko ugotavljamo tudi zdravstveno stanje samice, kajti nekatera prikrita obolenja so povezana z velikostjo in obliko jajca, npr. oviduktitis, pomanjkanje kalcija, atrofija ovarijev. Zunanji kliničnih znakov pri samicah nismo opazili.

V naši raziskavi pri opazovani skupini grških kornjač, kar je prikazano v tabeli 4, je bila povprečna velikost jajc podvrste *Testudo hermanni boettgeri* manjša v primerjavi z rezultati na manjši skupini jajc, ki so predstavljene v tabeli 5 (95). Razlika med telesno maso želve in številom jajc na gnezdo je lahko povezana s hrano, z zdravstvenim statusom posamezne živali in drugimi parametri. Ugotavljamo, da so bile meritve jajc v okviru naše raziskave pri petdesetih samicah manjše tako od meritve jajc Bertolera s sodelavci (2011) (5) kot tudi od meritov v naši drugi raziskavi treh gnezd starejših kornjač podvrste *Testudo hermanni boettgeri* iz druge obore (95). Iz tega lahko sklepamo, da tudi starost lahko vpliva na velikost jajc. Rezultati, ki jih je dobil Highfield (1996), so bili nekoliko drugačni od rezultatov v naši raziskavi, jajca so bila večja (40×29 mm) in občutno lažja (12 do 14 g) (8). Domnevamo, da je razlika nastala zaradi meritov pri kornjačah na drugi geografski lokaciji, saj je znano, da so na nekaterih področjih prisotni značilno večji posamezniki (npr. Srbija, Bolgarija). Zavedati se je treba, da se tudi življenjski pogoji v naravi lahko znatno razlikujejo. Hailey in Loumbourdis (1988) sta izmerila povprečno maso jajca podvrste *Testudo hermanni boettgeri* v Grčiji 17,8 g, z razponom od 10,5 do 23,5 g (96). Njuni rezultati so primerljivi z našimi izmerami.

V naši raziskavi smo primerjali telesno maso posamezne želve s številom njenih jajc v obdobju treh let (slika 22). Rezultati naše raziskave ne kažejo povezave med telesno maso želv in maso njihovih jajc. Longepierre s sodelavci (2003) pa je v njihovi raziskavi ugotovil signifikantno povezavo med dolžino jajca, maso jajca, volumnom jajca in obliko jajca z velikostjo gnezda, maso gnezda, volumnom gnezda in maso samice jajca grške kornjače (97).

Na podlagi primerjav z rezultati drugih raziskav ugotavljamo, da je učinkovitost reprodukcije (koliko samic izlega jajca, ali je razmerje med spoloma v posamezni obori res ustrezno glede na število in oplojenost jajc) pri proučevani skupini manjša od pričakovane glede na rezultate drugih avtorjev (44, 47).

Predlagamo uvedbo rednega monitoringa na farmi z namenom bolj učinkovite reprodukcije. Še posebej je pomembno, da je bil v naši opazovani skupini velik odstotek samic, ki v tem obdobju niso izlegale. V prvem letu, ko so bili zraven še samci v ustreznemu razmerju (1 : 4,2 v korist samic), 24,0 % samic ni izlegalo jajc. Redno spremljanje zdravstvenega statusa skupine (okužbe z različnimi patogeni in presnovne bolezni, reprodukcijske bolezni, druge kronične bolezni), porabe hrane ter vrste hrane pri samicah in samcih je na farmi nujno potrebna. Razmerje med spoloma naj se prilagaja starosti skupine. Prav tako je za uspešno reprodukcijo nujna dovolj dolga hibernacija. Ob dobrih pogojih reje se izboljša tudi raven dobrobiti za živali v skupini, ki vsekakor pozitivno vpliva tudi na reprodukcijo.

5.1.3 Inkubacija jajc

V literaturi opisujejo, da traja čas inkubacije za grško kornjačo v divjini 90 do 124 dni in v umetnih pogojih v razponu 56 do 102 dni s temperaturo v razponu 22 do 35 °C (5, 27). Bertolero s sodelavci (2011) govori tudi o tem, da lahko v naravi še neizlegla želvica ostane v jajcu in se izleže šele naslednje leto (5). V Črni gori sta Gvozdenović in Iković (2014) pri prosto živečih kornjačah podvrsti *Testudo hermanni boettgeri* ocenila čas inkubacije med 67 in 75 dni (27). Eendebak (2001) je ob umetnem valjenju ugotovil, da je različna temperatura inkubacije (24 do 36 °C) vplivala na različen čas valjenja jajc (88,3 do 109,2 dni) (44). Naše meritve so podobne meritvam Eendebaka (2001), pri katerem je pri temperaturi 31 do 32 °C inkubacija trajala od 55,3 do 57,4 dni (44). Jajca z naše farme so bila podvržena enakim mikrohabitativnim pogojem; temperatura je nihala med 31 in 32 °C, povprečna vrednost vlage v inkubatorju je bila 80 %. Dolžina valjenja je variirala med 52 in 98 dni oz. povprečna 60,3 dni (prvo leto), 54,2 dni (drugo leto) in 53,8 (tretje leto), kar kaže na individualna odstopanja dolžine valjenja posameznih jajc. Menimo, da poleg individualnega razvoja osebka obstajajo znotraj inkubatorja minimalna odstopanja v temperaturi in vlagi, ki nato še dodatno vplivajo na hitrost razvoja posamezne kornjače, kar se odraža v razponu dolžine inkubacije.

Med valilniškim ostankom je bilo 62,5 % neoplojenih jajc, 53,1 % inficiranih jajc, 28,1 % izsušenih in 21,9 % jajc v različnih stopnjah razvoja plodu. Odstotek se prekriva, ker sta bila v nekaterih jajcih odkrita dva ali več vzrokov/razlogov. Oplojenost in razvoj plodu nista bila vedno potrjena. Najpogosteji vzrok infekcije so bili različni patogeni (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp., *Purpureocillium lilacinum*).

V naši prejšnji raziskavi (96) so bili rezultati embrionalne smrtnosti 14,9 %; od tega je bila smrtnost potrjena v 2,2 % v zgodnji stopnji razvoja, 5,2 % v srednji stopnji razvoja in 7,5 % v pozni stopnji razvoja. V tej raziskavi smo opazili višji odstotek embrionalne smrtnosti v zgodnji stopnji razvoja. Mrtvi zarodki so bili najdeni v 9,38 % v zgodnji stopnji razvoja, v 6,25 % skupaj v srednji stopnji razvoja in v pozni stopnji razvoja (dva embria v vsaki skupini). Opazili smo tudi visok odstotek dehidriranih jajc (28,1 %). Razlog za veliko embrionalno smrtnost v zgodnji stopnji razvoja in velik odstotek dehidriranih jajc je lahko posledica okoljskih faktorjev kot so visoka temperatura ali nizka vlažnost. S tega razloga priporočamo natančen nadzor pri inkubaciji, redno kontrolo in vzdrževanje mikroklimatskih indikatorjev ter uporabo opozorilne naprave (senzorji za temperaturo in vlago).

Valjenje je treba imeti pod natančnim nadzorom. Treba je redno slediti vsem napakam jajc in na podlagi teh izboljšati pogoje valjenja, kar omogoča zdrav podmladek. Zaradi neprimerenega valjenja lahko pogine veliko šibkejših mladičev takoj po izvalitvi ali imajo le-ti kasneje veliko zdravstvenih težav. Z izboljšanjem pogojev valjenja se zmanjša možnost infekcij, poveča se odstotek valitev in s tem dobrobit želv. Posamezne parametre (vlaga, temperatura) bi bilo treba spremljati in v skladu s temi meritvami uvajati spremembe. Ob rednih pregledih bi lahko sproti odstranjevali neoplojena in inficirana jajca. Prav tako bi bila nujno potrebna fumigacija pred samo inkubacijo.

Zdravstveni status in prehrana starševske skupine, razmerje samci samice znotraj skupine in mikroklimatski pogoji (temperatura, relativna vlaga) skozi celotno inkubacijo so pomembni faktorji, ki vplivajo na preživitvene rezultate (96). Nekateri avtorji (98, 99) so ugotovili, da so oplojena jajca večja od neoplojenih. Rezultati naše raziskave so potrdili te ugotovitve. Med 125 jajci (ostala so bila poškodovana in niso bila vključena v izračun) so bila oplojena jajca za 0,9 g večja težja od neoplojenih. Predvidevamo, da je ravno razlika v teži vzrok, da so večja jajca odpornejša na vplive iz okolja. Naša strategija in predlogi so, da je potrebna redni pregled jajc in odstranitev jajc z maso pod 10 g ali jajc s spremenjeno ali počeno lupino.

5.2 KEMIJSKA SESTAVA ŽELVJIH JAJC

Povezava med velikostjo jajc, sestavo jajc in velikostjo novoizleglih želv je bila proučevana pri velikem številu oviparnih vrst (100). Povprečna velikost in masa jajc *Testudo hermanni boettgeri* je opisana v poglavju številka 4.2. Povprečna velikost petnajstih jajc je bila v tem delu raziskave nekoliko večja: $29,9 \times 39,5$ mm in prav tako tudi povprečna masa jajc – 20,7 g. Razlika je nastala najverjetneje zaradi tega, ker so bila odvzeta jajca samo iz treh legel in ne prikazujejo povprečja vseh izleženih jajc. Glede na dostopno literaturo nismo našli podatkov o debelini lupine. Povprečna izmerjena debelina lupine jajc v tem delu raziskave pri *Testudo hermanni boettgeri* je znašala 0,5 mm. Menimo, da je debelina lupine pomemben indikator povezave med velikostjo in maso jajca, zato bi bilo zanimivo v nadalnjih raziskavah proučiti morebitno povezavo med debelino lupine in maso jajca.

V naši raziskavi smo ugotovili, da pri *Testudo hermanni boettgeri* lupina predstavlja 12,5 %, beljak 46,9 % in rumenjak 40,6 % celotnega jajca. V literaturi navajajo, da lupina želvjih jajc predstavlja približno 11 do 12 % (razpon: 4,3–24,7 %), beljak približno 46 do 47 % (razpon: 34,4–61,9 %) in rumenjak predstavlja približno 41 do 42 % (razpon: 32,1–55,0 %) celotnega jajca (46). Hewavisenti in Parmenter (2002) poročata, da je jajce ravnoribte želve (*Natator depressus*, ang. Australian Flatback Sea Turtle) vsebovalo približno enak delež rumenjaka in beljaka. Lupina je predstavljala približno 5 %, beljak 45 %, in rumenjak 50 % celotnega jajca (101). Jajca mavrske kornjače (*Testudo graeca*) so sestavljena iz 16 % lupine, 44 % beljaka in 40 % rumenjaka (8). Speake s sodelavci (2001) je izmeril pri grški kornjači 42,5 % rumenjaka (9).

Želvja jajca vsebujejo bolj ali manj enakovredna razmerja hrani, vendar je lahko pomembno nihanje v količini vode v jajcu vezano na vrste in njihove habitate. Med gnezdi *Malaclemys terrapin* (ang. Diamondback Terrapin) in želve navadne hlastavke (*Chelydra serpentina*) so ugotovili, da imajo manjša jajca proporcionalno manj vode, kot jo imajo večja jajca (47). Wallace s sodelavci je pri orjaški usnjači (*Dermochelys coriacea*, ang. Leatherback Sea Turtle) proučeval povezavo med maso jajca, sestavo jajca in velikostjo novoizleglih želv (100). V naši raziskavi nismo posebej proučevali velikost jajc in vsebino vode.

V nasprotju z jajci plazilcev vsebujejo kokošja jajca približno 9,5 % lupine, 63 % beljaka in 27,5 % rumenjaka (102). Iz rezultatov dobljenih v naši raziskavi pri grški kornjači vidimo, da njihova jajca vsebuje znatno več rumenjaka v primerjavi s kokošjimi jajci, kar je skladno z rezultati pri tej (9) in drugih vrstah želv (8, 46).

V naši raziskavi smo določili sestavo vsebine jajca (brez lupine) *Testudo hermanni boettgeri*, ki vsebuje 80,7 % vlage, 2,3 % pepela 10,2 % beljakovin, in 6,8 % maščob. Glede na nam dostopne podatke iz literature, sestava jajca *Testudo hermanni boettgeri* še ni bila objavljena. Če naše rezultate primerjamo s podatki o sestavi jajc *Malayemys macrocephala* (ang. Snail-Eating Turtle, imenovana tudi Rice Field Terrapin) je razvidno, da slednja vsebujejo manj vlage (72,9 %) in pepela (1,5 %) vendar več beljakovin (12,4 %) in maščob (8,6 %) (103). Jajca olivne želve (*Lepidochelys olivacea*, ang. Olive Ridley Sea Turtle) so vsebovala: 43,4 % vlage, 3,5 % pepela, 49,2 % beljakovin in 3,9 % maščob (104). Obstaja velika razlika v primerjavi z jajci morskih želv zlasti v količini vlage in beljakovin.

Če primerjamo sestavo kokošjih jajc, ki vsebujejo 74 % vlage, 12 % beljakovin in 11 % maščob (48), s sestavo jajc *Testudo hermanni boettgeri* vidimo, da slednja vsebujejo manj beljakovin in maščob, ter so bolj vodena v primerjavi s kokošjimi jajci.

Sestavo maščobnih kislin in aminokislin v jajcih so proučevali pri različnih vrstah želv (9, 103, 104). Znotraj skupine grških kornjač, podvrsta *Testudo hermanni boettgeri*, ki so bile v ujetništvu v živalskem vrtu v Edinburgu, so analizirali sveža jajca, ki so v povprečju tehtala 18,6 g, sam rumenjak je tehtal 7,9 g. Proučevali so maščobno sestavo, profil maščobnih kislin in v maščobi topne antioksidante v rumenjaku (9). Thompson in Speake (2002) sta interpretirala, da je maščobno kislinska sestava maščob v rumenjaku delno določena z materino prehrano in delno z ekspresijo materinih biokemičnih poti pretvorbe maščobnih kislin, ki nastajajo kot prilagoditev hraničnih zalog za zadostitev potreb embria (105). Naši rezultati, vezani na sestavo maščobnih kislin rumenjaka, se delno razlikujejo od rezultatov Speaka s sodelavci (9) v večji količini palmitoleinske kisline, stearinske kisline, oleinske in arahidonske kisline. Večji je bil tudi delež enkrat nenasičenih maščobnih kislin. Očitna razlika je opazna v manjši količini linolne in α -linolenske kisline pri naših rezultatih. Najverjetnejši razlog je razlika prehrane v vzrejnih pogojih. Prehrana naše preiskovane skupine je temeljila na travi, dopolnjeni z dodatno sezonsko zelenjavjo in sadjem, pri Speaku s sodelavci (9) so prehrano kornjač dopolnjevali tudi s prehranskimi dodatki.

Upoštevati je treba, da ima grška kornjača poparitveni tip (ang. postnuptial) reprodukcijskega cikla. To pomeni, da zaključku reprodukcijske faze sledi intenzivno prehranjevalno obdobje, ki omogoči kopiranje hraničnih snovi. Te omogočajo polno rast gonad pozno jeseni pred prihajajočo hibernacijo (10). Za natančnejšo raziskavo bi bilo treba opraviti poglobljen pregled in analizo prehrane staršev, okoljskih pogojev in vsebine jajc. Pri proučevanih jajcih je bila v rumenjaku linolna kislina zastopana v le 1,78 % ter α -linolenska kislina v 0,67 % celotnega maščobnega kislinskega sestava celokupnih lipidov. V preiskavi, ki so jo opravili Speake in sodelavci (9), so želve krmili le z zelenimi rastlinami, ki prispevajo α -linolensko kislino kot glavno večkrat nenasveteno kislino. Pri njih je linolna kislina tako predstavljala 6,6 % in α -linolenska kislina 3,8 %. Tako kot Speake s sodelavci (9), tudi mi v rumenjaku nismo našli dokozaheksanojske kisline (DHA), ki je pomembna za embrionalni razvoj. Vrednosti maščobnih kislin iz naše raziskave v primerjavi z vrednostmi v kokošjem rumenjaku so bile manjše z izjemo miristinske, palmitoleinske, oleinske in eikozanojske kisline, katerih vrednosti so bile večje (51, 103).

Ob primerjavi rezultatov naše raziskave pri podvrsti *Testudo hermanni boettgeri* (tabela 7) z rezultati, ugotovljenimi pri vrsti *Malayemys macrocephala* (ang. Snail-Eating Turtle) (103), vidimo, da je bila vsebnost maščobnih kislin v jajcih *Testudo hermanni boettgeri* manjša za vse maščobne kisline razen za oleinsko, vakcensko in eikozanojsko kislino. Razmerje omega-3/omega-6 maščobnih kislin v naši raziskavi (0,41 %) je bilo skoraj dvakrat večje kot pri *Malayemys macrocephala* (ang. Snail-Eating turtle) (0,23 %) (103). Menimo, da je vzrok za razlike v tem, da ta slednja vrsta domuje v Aziji, tako se razlikuje tudi v sami sestavi prehrane.

Zelo malo podatkov je na voljo o aminokislinski sestavi želvjih jajc. Rezultati naše raziskave so prikazani v tabeli 8. Vrednosti esencialnih aminokislin v jajčnem beljaku pri kokoši in prepelici so večje od vrednosti v jajcu grške kornjače. Pri primerjavi rezultatov naše preiskave z rezultati pri *Malayemys macrocephala* (ang. Snail-Eating Turtle) (103) vidimo, da so pri grški kornjači manjše vsebnosti arginina, prolina, tirozina, izolevcina, metionina, triptofana in valina. Ostale aminokisline so bile prisotne v večji količini: cistein, asparaginska kislina, treonin, serin, glutaminska kislina, glicin, alanin, levcin, fenilalanin, lizin in histidin. V primerjavi s kokošjim jajcem so vsebnosti aminokislin v jajcu *Testudo hermanni boettgeri* znatno manjše (48).

V jajčnem beljaku podvrste *Testudo hermanni boettgeri* smo našli največje vsebnosti glutaminske kisline, in sicer 0,115g/100g (pri kokošjem beljaku 1,52 g/100g (48)), in asparaginske kisline 0,101g/100g (pri kokošjem beljaku 0,85 g/100g (48)). Vsebnosti aminokislin v kokošjem beljaku so vsaj osem do desetkrat večje (48). Menimo, da bi bilo treba izvajati nadaljnje preiskave jajc na vsebnost aminokislin, ki so lahko pomembne za ustrezен razvoj plodu. Na področju raziskav je pri želvah še veliko nejasnih mehanizmov, ki skrbijo za uspešno reprodukcijo in razvoj zarodkov, zato bi bilo treba poleg kemijskih in fizioloških vključiti tudi druge raziskave, npr. proučevanje s pomočjo genetskih orodij.

Obstaja zelo malo objavljenih raziskav o količini elementov v sledeh v želvijih jajcih. Svinca (Pb) in kadmija (Cd) nismo našli v lupini; Pb, Cd, As, Zn, Ni, Mn, Co nismo detektirali v beljaku; Cd in As nismo našli v rumenjaku. Lam s sodelavci (2006) je prav tako merit prisotnost elementov v sledeh pri orjaški črepahi (*Chelonia mydas*, ang. Green Sea Turtle) v lupini, beljaku in rumenjaku. Njihove vrednosti so bile vse višje, razen Mn v lupini, Cu v beljaku in Cu ter Mn v rumenjaku, ki so bili manjši v primerjavi z našimi koncentracijami. Glavni razlog za raziskovanje teh elementov v želvijih jajcih je onesnaževanje in njihova potencialna grožnja morskim želvam (106). Strinjam se, da je lahko koncentracija elementov v sledeh, najdena v jajcih želv, posledica tako prehrane kot onesnaženega okolja, kot je opisal Lam s sodelavci (2006) (106). Domnevamo lahko, da se količina elementov v sledeh oz. vpliv le-teh na želve spreminja na podlagi obremenitev, ki izhajajo iz njihovega življenjskega okolja, prehrane in posledično količino le-teh v jajcu. Dolgoročno gledano lahko preobremenjenost z elementi v sledeh vpliv na slabšo rast, dolgoživost in reprodukcijo želv, zato bi z vzorčenjem na različnih naravnih biotopih kornjač lahko ugotovili referenčne vrednosti in posredno ugotavljali vpliv zunanjih dejavnikov na ostale fiziološke parametre (npr. razvoj, reprodukcija).

Koncentracije različnih aminokislin, maščobnih kislin in elementov v sledeh v jajcih različnih vrst želv v različnih razmerjih. Farme, ki gojijo želve, so unikaten življenjski sistem, zato so potrebne nadaljnje preiskave na tem področju. Posebej pomembna je prehrana staršev in od tega je odvisna sestava jajc v rej. Poznavanje natančne kemijske sestave jajca bi tako skupaj z dopolnjeno prehrano prinesla napredek k uspešnosti reje kornjač. Hranilne snovi, ki so potrebne za uspešen razvoj kornjač in nadalje uspešno reprodukcijo pri kopenskih želvah, še niso natančno raziskane.

Namen naše raziskave je bil ovrednotiti kemijsko sestavo, aminokislinsko sestavo, sestavo maščobnih kislin in nekaterih elementov v sledeh v jajcih *Testudo hermanni boettgeri*. Menimo, da naše meritve lahko uporabijo kot nadaljnja primerjava z vrednostmi prosto živečih kornjač. Sklepamo tudi, da se rezultati lahko uporabijo tudi v oceni onesnaženosti okolja.

5.3 SPOLNI HORMONI IN NJIHOVI METABOLITI V IZTREBKIH ŽELV

Namen naše študije je bil ugotavljanje dinamike spolnih hormonov v iztrebkih pri samicah in samcih v ujetništvu v skupni obori. Želeli smo ugotoviti, ali se lahko oceni spol na podlagi količine hormonov. Ta raziskava lahko služi kot preliminarna študija o meritvah količine hormonov v iztrebkih grške kornjače. Dobro poznavanje in razumevanje reprodukcijskega cikla in reprodukcijskega potenciala posameznih vrst želv nam je lahko v veliko pomoč pri zaščiti ogroženih vrst. Veliko vrst želv po svetu je na robu izumrtja, o njihovi reprodukciji pa je malo znanega (6).

Ocenjevanje reprodukcijske aktivnosti in monitoring hormonov je učinkovito in uporabno orodje za načrtovanje, nadzor in vodenja razmnoževanja pri različnih živalskih vrstah. Izkazalo se je kot pomembno orodje tako pri živalih v ujetništvu kot pri prosto živečih živalih (55). Malo študij je uporabilo neinvazivne tehnike določevanja hormonov v iztrebkih plazilcev, zlasti pri želvah. V nam dostopni literaturi je pri želvah in drugih plazilcih malo podatkov. Rittenhouse s sodelavci (2005) je opravil analizo kortikosteroidnih metabolitov pri škatlarici (*Terrapene carolina triunguis*, ang. Box Turtle) (107). Umapathy s sodelavci (2015) je uporabil neinvazivno analizo steroidov v iztrebkih in situ z endokriniom profiliranjem z direktno kompetitivno EIA pri *Vijayachelys silvatica* (ang. Cochin Cane Turtle) in *Indotestudo travancorica* (ang. Travancore Tortoise) (108). Atkins s sodelavci (2002) je v svoji študiji ugotovila, da analiza testosterona v blatu ni nujno uporabna za oceno reproduktivnega statusa pri *Tiliqua nigrolutea* (ang. Blue-Tongued Lizard) zaradi pomanjkljive korelacije med koncentracijo testosterona v blatu in plazmi. Glavni razlog nezanesljivih rezultatov v njihovi raziskavi so bile sezonske variacije v pogostosti prehranjevanja in posledično počasnega prehoda iztrebkov skozi prebavila (109). Kummrow s sodelavci (2011) je s pomočjo neinvazivne tehnike z metodo EIA izmeril metabolite spolnih steroidov v iztrebkih samice jemenskega kameleona (*Chamaeleo calyptratus* ang. Veiled Chameleons) (11) in ocenil spolno aktivnost. Tehnika se je izkazala kot uporabno orodje za proučevanje spolnih hormonov pri plazilcih.

V naši raziskavi smo proučevali nivo spolnih hormonov v iztrebkih grške kornjače. Zanjo je značilno, da so v Sloveniji aktivne od aprila do oktobra, odvisno od podnebnih razmer v posameznem letu. Dvorjenje in parjenje potekata skozi celotno aktivno obdobje. Gnezdenje oz. izleganje jajc se začne konec maja in konča nekje konec junija oz. do prve polovice julija. Najpogosteje samice izlegajo dve gnezdi. Na naši farmi v okviru preiskovane skupine samice s tremi gnezdi v eni sezoni nismo imeli.

5.3.1 Progesteron

V naši študiji smo pri samicah v času izleganja jajc ugotovili porast progesterona med obdobjem tik pred ali takoj po izleganju jajc. Na začetku merjenja, tj. v sredini maja, so bile vsebnosti progesterona najmanjše. Sledil je dvig, ki je vrh dosegel konec maja oz. začetku junija. Nato je sledil padec sredi junija, temu ponovni drugi vrh konec junija, ki je trajal do sredine julija. Strinjam se s Huot-Daubremonom in sodelavci (2003), da je padec progesterona v začetku junija povezan z izleganjem jajc prvega gnezda (62). Ugotavljam, da je istočasno padel tudi nivo estradiola. Progesteron je narastel v periovulatornem obdobju ali takoj po ovulaciji in padel v obdobju nastajanja lupine v jajcevodu, kar ugotavlja tudi drugi avtorji (60, 62). Pri *Testudo hermanni hermanni* so variabilne količine progesterona ugotovljene skozi celo leto z največjimi vsebnostmi v periovulatornem obdobju aprila in maja, vendar le pri prosto živečih samicah. Progesteron spodbuja proizvodnjo beljakovin svetlega beljaka (62). Največja koncentracija progesterona je povezana tudi s končnim zorenjem foliklov in nastankom rumenega telesa po ovulaciji skupaj s padcem estradiola (110).

V naši raziskavi so bile vrednosti progesterona pri samcih majhne maja ter od julija do oktobra, največji dvig vrednosti smo opazili v mesecu juniju. Pri samicah so bile največje vsebnosti progesterona drugi polovici maja. Vsebnosti v mesecu maju in juniju so bile bolj variabilne. Največja vsebnost progesterona pri posamezni samici je bila v naši raziskavi izmerjena konec maja oz. na začetku junija, s časovnim zamikom najverjetneje zaradi vpliva drugačnih klimatskih pogojev, so naše meritve pri *Testudo hermanni boettgeri* primerljive s *Testudo hermanni hermanni*, katere raziskave so opravili Huot-Daubremont s sodelavci (62).

Ugotovili smo, da je bila v juniju količina progesterona pri samcih večja v primerjavi s samicami. V juliju, avgustu, septembru in oktobru je bila količina konstantna pri obeh spolih.

Pri mladih samicah ugotavljam, da je bila krivulja nihanja progesterona podobna krivulji samic. Zanimivo je, da se pri skupini mladih samcov dodatno pojavi manjši dvig progesterona sredi julija. V literaturi nismo zasledili podatkov o meritvah spolnih hormonov pri mlajših kornjačah. Naši rezultati kažejo, da se pri mladih kornjačah pojavljajo dodatna nihanja vrednosti progesterona, kar kaže morda na dodatno fiziološko vlogo tega hormona v razvoju.

5.3.2 Estradiol

Naloga estradiola pri želvah je stimulacija vitelogeneze, to je končno zorenje foliklov ovarijs pred njihovo sprostivijo in aktivacija ovarijs po parjenju (111). Značilno je, da naraste količina estradiola pred vitelogenezo, tako so vrhovi tega hormona vezani na število izleganih gnezd (110).

Preovulatorni vrh estradiola kaže na zaključevanje zorenja foliklov (110). V naši raziskavi je v času izleganja jajc estradiol med samicami variiral. Vrh smo ugotovili v drugi polovici maja in začetku junija. Opazili smo, da dvigu estradiola sledi dvig progesterona.

Pozno poletni dvig estradiola pri samicah je povezan z obnovitvijo vitelogeneze (oz. folikularne rasti) kar so ugotovili znanstveniki v Franciji pri *Testudo hermanni hermanni* (62). Vrhovi se pojavijo tik pred izleganjem jajc. Ugotavljam, da so naši rezultati primerljivi z njihovimi rezultati.

Sekrecija progesterona, estradiola in testosterona pri samicah je izredno variabilna med vrstami (10, 60, 62). Ne kaže dosledne povezave z ovarialnim ciklom (60). Dvig nivoja testosterona in estradiola je povezan z vitelogenezo. Nivo obeh hormonov pade v času ovulacije; vrednosti testosterona na splošno padejo pred padcem estradiola. Povečanemu nivoju progesterona med ovulacijo sledi padec med nastanjem lupine v jajcevodu (60). Strinjam se, da so vrhovi nivoja progesterona in estrogena pri želvah z več gnezdi povezani z uspešno ovulacijo. Ugotavljam, da nastajajo časovni zamiki v količini izločenega estradiola oz. v največjih vsebnostih, kar je verjetno posledica drugačnih klimatskih razmer v času vzorčenja.

Največje vsebnosti estradiola pri samcih smo ugotovili v drugi polovici maja in začetku junija. Dvig estradiola kaže na spermatogenezo (60).

Mladi samci so imeli največje vsebnosti estradiola v sredini maja, vrednosti so bile višje v primerjavi z odraslimi samci. Glede na dinamiko hormona ugotavljam, da določitev spola na podlagi meritev v blatu pri mladih samcih ni zanesljiva, zato metoda pri njih ni uporabna.

5.3.3 Testosteron

Vrh koncentracije testosterona korelira z vrhom koncentracije estrogena, vendar je njegova količina desetkrat večja. Izkazalo se je, da je testosteron pomemben sekretorni proizvod ovarijskega korelira med plazemskim estrogenom in testosteronom (110). Huot-Daubremont s sodelavci (2003) ugotavlja, da visoka vsebnost testosteronov v aprilu, takoj po hibernaciji, kaže na zorenje foliklov. Avtorji navajajo dramatičen padec v maju, kar sovpada z ovulacijo z izleganjem jajc. Sledi padec testosterona v juniju in juliju med izleganjem jajc. Navajajo tudi, da so bile med samicami v času izleganja jajc vrednosti testosterona zelo variabilne. Sledi ponoven dvig v avgustu, ko pride do ponovne vitelogeneze in rasti foliklov (62).

V naši raziskavi so bile najmanjše vsebnosti testosterona pri samicah izmerjene konec julija, sledil je dvig v začetku avgusta. Največji dvig vsebnosti smo zaznali v začetku septembra, čemur je sledil padec. Pri samicah v ujetništvu je bila dinamika podobna dinamiki samcev le v manjših vsebnostih, kar je ugotavljal tudi Huot-Daubremont s sodelavci (2003). Le ti navajajo, da dvig testosterona pri samicah v avgustu in septembru kaže na vitelogenezo v jesenskem času (62).

Strinjam se s Kuchlingom (1982), ki je v svoji raziskavi v Črni gori opisal (61), da ima grška kornjača poparitveni cikel, ker večanje vsebnosti testosterona od maja do junija kaže na potek spermatogeneze. Licht (1982) je ugotavljal, da testosteron pri samcih spremlja rast testisov in spermatogenezo, vendar dviga nivoja med spomladanskim parjenjem omenjeni avtor ni ugotovil (60).

V naši raziskavi je pri samicah v obdobju med izleganjem jajc nivo testosterona narastel v primerjavi z vsebnostmi iz meseca maja, ko je bilo opravljeno prvo vzorčenje. Količina testosterona pri samcih je bila sredi maja približno enaka kot v oktobru pred samo hibernacijo. V juniju, med obema izleganjema, se je nivo dvignil. V krvi *Testudo hermanni hermanni* so Huot-Daubremont s sodelavci (2003) najmanjše vrednosti izmerili v obdobju od aprila do junija (62).

Zanimivo je, da so v Franciji ugotovili, da je bil pri prosto živečih samicah nivo testosterona večji v primerjavi s samicami v ujetništvu, kar kaže na to, da se pri samicah v naravnem okolju rast foliklov pojavila prej (62).

Currylow s sodelavci (2013) navaja, da imajo samice vrste *Terrapene carolina carolina* (ang. Eastern Box Turtle) pogosto nezaznavni nivo plazemskega testosterona z izjemo meritev spomladji (112). V naši raziskavi smo dokazali ravno nasprotno, ker smo v iztrebkih pri *Testudo hermanni boettgeri* vedno izmerili vsebnost testosterona, ki je bila malo manjša od količine pri samcih.

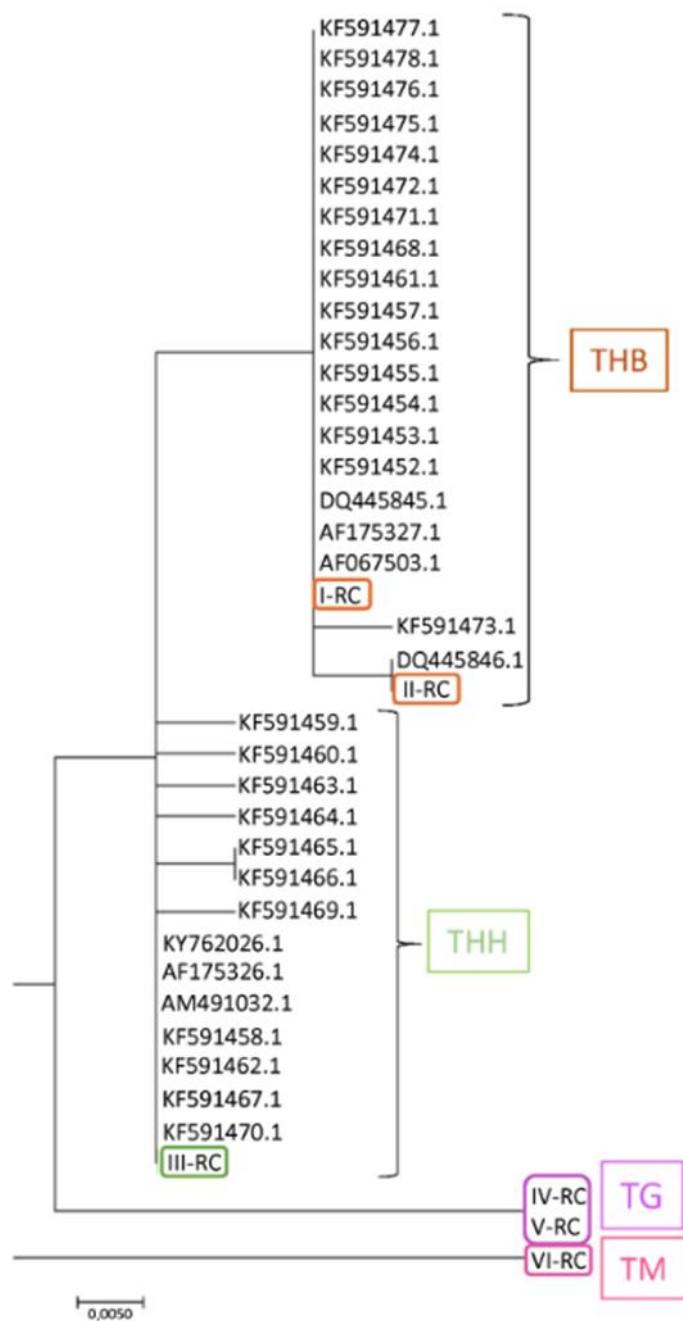
Ugotavljam, da bi bilo treba za pripravo referenčnih vrednosti hormonov v iztrebkih pridobiti večje število podatkov in preiskati večje število kornjač. Iz naših rezultatov je razvidno, da obstajajo očitne individualne razlike v koncentraciji posameznih vrednosti hormonov v iztrebkih. Zaključimo lahko, da vsebnosti hormonov, izmerjene v iztrebkih pri preiskovanih želvah, niso zadostne za določevanje spola. Izjema je obdobje izleganja jajc, ko bi na podlagi izmerjenih vsebnosti hormonov, na podlagi razmerja med posameznimi hormoni v iztrebkih kornjače lahko določili spol. Ne smemo pozabiti, da na dinamiko hormonov pri kornjačah vplivajo tudi klimatske razmere, saj velja dejstvo, da so funkcije plazilcev soodvisne od temperature v danem okolju. Za nadaljnje študije bi poleg večjega števila podatkov in živali potrebovali sočasno vzorčenje blata in krvne plazme posamezne kornjače, da bi lahko na podlagi primerjave koncentracije hormonov v blatu in v plazmi ugotavljal različne podatke, npr. časovni odmik in razlika med vrednostmi v odvzetem materialu.

5.4 GENETSKA ANALIZA

5.4.1 Analiza mitohondrijske DNK

V naši raziskavi smo analizirali 188 vzorcev grške kornjače (predstavniki dveh priznanih podvrst, *Testudo hermanni hermanni* in *Testudo hermanni boettgeri* ter še nepriznane podvrste *Testudo hermanni hercegovinensis*) s petih različnih geografskih lokacij. Analiza mtDNK *Testudo hermanni* na odseku kodirajoče regije za 12S rRNK je pokazala relativno majhno pestrost nukleotidnega zaporedja, ki pa omogoča razlikovanje tipov mtDNK med priznanimi podvrstama grške kornjače. Znotraj *Testudo hermanni boettgeri* smo našli dva mtDNK haplotipa (I in II), za *Testudo hermanni hermanni* je bil značilen haplotip III, našli smo ga tudi pri nekaterih vzorcih populacije THHz-Si. Haplotip II je bil prisoten samo v srbski in slovenski populaciji *Testudo hermanni boettgeri*. Prisotnost samo tega haplotipa v srbski populaciji je lahko posledica omejenega vzorčenja, v slovensko populacijo je verjetno prišel z uvozom živali iz Srbije. Zanimivo je, da se tretja, nepriznana podvrsta, *Testudo hermanni hercegovinensis*, po mtDNK haplotipu ni razlikovala od sestrške podvrste *Testudo hermanni boettgeri*, nekateri osebki so imeli celo haplotip značilen za *Testudo hermanni hermanni* (haplotip III). Podobno raznolikost mtDNK haplotipov znotraj rodu *Testudo* so nakazale že predhodne študije (67), kjer so našli tudi razlike med mtDNK haplotipi znotraj posameznih populacij (68). Perez in sod. (2014) so pri grških kornjačah na širšem področju Sredozemlja in južne Evrope našli v naravnih populacijah 27 haplotipov mtDNK, ki jih je opredeljevalo 25 polimorfnih mest (77). Teh 27 haplotipov predstavlja večji del javno dostopnih nukleotidnih zaporedij mtDNK grške kornjače, zbirko dopolnjujeta še dva haplotipa, od katerih je eden značilen za *Testudo hermanni boettgeri*, drugi pa za *Testudo hermanni hermanni* (67). Poleg teh 29 haplotipov, kjer je navedena tudi taksonomska informacija pri kateri podvrsti *Testudo hermanni* so bili identificirani, je v genski banki še pet haplotipov proučevane regije mtDNK *Testudo hermanni*, ki pa taksonomsko niso opredeljeni do ravni podvrste (86, 113, 114). Halotipov, ki jih opisujejo Mirimin in sod. (68), v javno dostopnih bazah podatkov ni, nekonzistentna numeracija nukleotidnih pozicij preprečuje zanesljivo rekonstrukcijo nukleotidnih zaporedij, zato teh sedmih haplotipov nismo vključili v našo primerjavo.

Natančna analiza vseh javno dostopnih mtDNK zaporedij, ki kodira 12S rRNK pri grški kornjači, je pokazala, da je ločevanje dveh priznanih podvrst (*Testudo hermanni hermanni* in *Testudo hermanni boettgeri*) na osnovi mtDNK haplotipov načelno mogoče, čeprav ni popolnoma zanesljivo, ni pa mogoče na osnovi teh podatkov od obeh priznanih podvrst ločevati tretje, še nepriznane podvrste *Testudo hermanni hercegovinensis*. V našem materialu najdemo haplotip I, ki je značilen za *Testudo hermanni boettgeri* tudi pri nekaterih vzorcih *Testudo hermanni hermanni* iz Slovenije, kar utegne biti posledica kontakta obeh podvrst na komercialni farmi. Haplotipi, ki smo jih identificirali v naših vzorcih, se vključujejo v nabor haplotipov, ki so že bili identificirani pri *Testudo hermanni boettgeri* (haplotipa I in II) in *Testudo hermanni hermanni* (haplotip III). Tri polimorfna mesta, ki razločujejo haplotipe I, II in III, so že zajeta v naboru 34 javno dostopnih nukleotidnih zaporedij *Testudo hermanni*. Umestitev mtDNK haplotipov, ki smo jih identificirali v našem materialu *Testudo hermanni* (haplotipi I, II in III), vključno s haplotipi dveh sestrskih vrst, *Testudo graeca* in *Testudo marginata* (haplotipi IV, V in VI), je predstavljena na sliki 77. Haplotipa I in II sta umeščena v skupino haplotipov, ki so značilni za pripadnike podvrste *Testudo hermanni boettgeri*, haplotip III pa spada med haplotipe, značilne za podvrsto *Testudo hermanni hermanni*. Relativno skromna variabilnost mtDNK haplotipov v našem materialu *Testudo hermanni boettgeri* (samo haplotipa I in II) je pogojena z omejenim obsegom vzorčenja, pretežno v farmskih populacijah. Možnost ločevanja med *Testudo hermanni boettgeri* in *Testudo hermanni hermanni* na osnovi mtDNK potrjuje haplotip III, ki je bil identificiran samo pri pripadnikih te podvrste. Edino izjemo predstavljajo vzorci *Testudo hermanni hercegovinensis*, ki so imeli delno haplotip I in delno haplotip III, kar podpira dvome o umestnosti priznavanja te potencialno tretje podvrste *Testudo hermanni*. Ločitev dveh sestrskih vrst *Testudo graeca* in *Testudo marginata* je zelo jasna.



Slika 77: Neighbour-joining drevo mtDNK haplotipov.

Neighbour-joining drevo, ki prikazuje medsebojne odnose med našimi mtDNK haplotipi in javno dostopnimi haplotipi *Testudo hermanni*. Nabor haplotipov za podvrsti *Testudo hermanni* in sestrski vrsti *Testudo graeca* in *Testudo marginata* so označene na sliki.

Figure 77: Neighbour-joining tree of mtDNA haplotypes.

Neighbour-joining tree showing relationship among mtDNA haplotypes identified in this study with publicly available haplotypes in *Testudo hermanni*. Haplotypes, typical for both subspecies *Testudo hermanni* and two sister species, *Testudo graeca* in *Testudo marginata* are marked on the picture.

Naši vzorci grške kornjače sicer pokrivajo dokaj široko geografsko področje, kjer sta prisotni dve priznani in ena še nepriznana podvrsta *Testudo hermanni*, vendar samo manjši del vzorcev predstavlja vzorce iz prosto živečih populacij. To je verjetno razlog, da smo v naši raziskavi sicer zabeležili tri mtDNA haplotipe znotraj *Testudo hermanni*, ki se med seboj razlikujejo na treh mestih v sekvenciranem delu mtDNA. Majhno pestrost mtDNA so zabeležili tudi v zelo majhnih in izoliranih populacijah grške kornjače, kot so nekatere francoske in populacije s Korzike (77). Prisotnost istega haplotipa mtDNA v populacijah različnih podvrst (haplotip I v populacijah THB, THH-Si in THHz-Si) v naši raziskavi nakazuje možnost antropogenega vpliva na komercialne populacije, ki v nekaterih primerih ne odražajo formalno deklariranega porekla.

Heteroplazmija pomeni prisotnost več kot enega tipa mtDNA v enem organizmu. Pri različnih vrstah obstajajo znatne razlike v frekvenci heteroplazmatskih posameznikov. Primer zabeležene heteroplazmije pri želvah predstavlja morska želva vrste glavata kareta (*Caretta caretta*). Pri tej vrsti se pri posameznih osebkih pojavlja heteroplazmija, ki jo lahko odkrijemo z analizo ponavljajočih se zaporedij na 3' koncu kontrolne regije mtDNA (75). V naši študiji smo odkrili dva osebka s heteroplazmijo, ki sta bila oba nosilca kombinacije mtDNA haplotipov I in III. Iz sekvenčnih podatkov nismo mogli oceniti kvantitativnega razmerja med obema haplotipoma, prav tako tudi ne faze vezave alelnih variant. Najverjetnejši scenarij je, da gre za hkratno prisotnost haplotipov I in III, vendar možnosti rekombinacije med heteroplazmatskima mestoma ne moremo izključiti. Za odgovor na to vprašanje bi bilo treba klonirati obe različici in s sekvenciranjem klonov določiti heteroplazmatska haplotipa.

5.4.2 Mikrosateliti

Analiza mikrosatelitnih lokusov v našem materialu podpira delitev populacij v dve skupini, kar nakazuje PCA analiza. Podobno grupiranje genotipov mikrosatelitnih lokusov potrebuje tudi filogenetsko drevo, ki tudi podpira delitev vzorcev v dva klastra (prvi THHz-Si, THB-Si, THB-Srb ter drugi THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne). Kompaktnejši klaster sestavljajo vzorci THHz-Si, THB-Si, THB-Srb. Ta klaster združuje vzorce dveh podvrst, *Testudo hermanni boettgeri* in *Testudo hermanni hercegovinensis*, kar do neke mere potrebuje zadržke pri priznavanju tretje podvrste, *Testudo hermanni hercegovinensis*.

Drugi klaster je bolj heterogen (THH-Si, THB-Cro, THH-It, THB-Mne) in združuje osebke obeh uradno priznanih podvrst *Testudo hermanni*. V populacijah najdemo posamezni, pri katerih se fenotipska in genotipska klasifikacija ne ujemata (npr. vzorci iz skupine THH-It št. 30, 34, 35 so v drevesu razporejeni na vejo *Testudo hermanni hercegovinensis*). Populacijska analiza nakazuje zmanjšano alelno pestrost v posameznih podpopulacijah, kar je verjetno posledica ozkih grl ob nastanku nekaterih komercialnih populacij in majhnega števila osebkov ustanoviteljev teh populacij. V nasprotju s tem kažejo naravne populacije kljub statusu ogroženosti vrste še vedno relativno visoko raven genetske pestrosti. Heterozigotnost v večjih populacijah se giblje med 40 % in 47 % (THH-Si, THB-Cro in THHz-Si), v komercialnih populacijah pa je relativno nizka, med 14 % in 20 % (THH-It, THB-Srb in THB-Mne). Slednje je po vsej verjetnosti posledica majhnega števila ustanoviteljev teh populacij. Rezultati mikrosatelitne analize predlagajo formiranje dveh klastrov vzorcev, analiza STRUCTURE potrjuje delitev vzorcev v dva klastra, ki se ujemata z rezultati PCA analize. Kompakten klaster tudi tu tvorijo vzorci, ki pripadajo populacijam THHz-Si, THB-Si in THB-Srb ($K = 2$), potem se ta klaster pri $K = 3$ razdeli v skladu s podvrstno pripadnostjo (ločitev THHz od THB). Ločevanje podvrst *Testudo hermanni hermanni* in *Testudo hermanni boettgeri* se nakazuje šele pri višjih vrednostih za K ($K = 4$ in $K = 5$).

5.4.3 Sekvenciranje genoma grške kornjače

V javno dostopnih bazah za grško kornjačo je relativno malo genomskega podatkov, prav tako tudi ni podatkov o mehanizmu, ki uravnava determinacijo spola pri tej vrsti. Zato smo hipotezo o obstoju spolno specifičnih regij v genomu grške kornjače (spolni kromosomi ali obsežnejše spolno specifične regije) preverili z analizo združenih vzorcev DNK moških in ženskih živali. Primerjava obeh združenih vzorcev bi morala razkriti razlike v kariotipu (XX, XY, ZW, WW). Prav tako bi spolno specifične razlike v nukleotidnih zaporedjih v okolici kandidatnih genov za determinacijo spola, ki so jih identificirali pri nekaterih drugih vrstah želv, lahko dale informacijo o morebitni genetski determiniranosti spola pri grški kornjači.

Na podlagi poravnave odčitkov na referenčni genom rGopEvg1_v1.p (*Gopherus evgoodei*; ang. Goode's Thornscrub Tortoise), ki obsega 2.298.564.209 bp, smo ugotovili, da ni diferencialnih odsekov genoma med samicami in samci, saj se mesta, kjer naši sekvenčni podatki slabše pokrivajo genom *Gopherus evgoodei*, med združenimi moškimi in ženskimi vzorci ne razlikujejo.

Z analizo literarnih podatkov smo oblikovali nabor kandidatnih lokusov, ki so bili pri nekaterih vrstah plazilcev in dvoživk že povezani s procesom determinacije spola: CIRBP, HOX family (39), Dmrt1, Wt1 (36); tSox9, tWt1, tSf1, tDmrt1, tWnt4, tDax1, tMis, (31), Amh, Ar, Esr1, Fog2, Gata4, Igf1r, Insr, Lhx9, β -catenin, Foxl2, Aromatase (40), Fst, Nf-kb, Crabp2, Jak-Stat, Nf- κ B, retinojska kislina, Wnt, Mapk-signalizacija in Xist (40).

Pregled strukturnih elementov v naši analizi ni v okolici nobenega od teh genov pokazal značilnih razlik med genomskeimi zaporedji združenih moških in ženskih vzorcev. Tudi detajlni pregled nukleotidnih zaporedij kodogenih regij kandidatnih genov ni pokazal razlik med moškim in ženskim združenim vzorcem. Rehn in Schroeder (2017) (37) sta pri sladkovodni želvi navadni hlastavki (*Chelydra serpentina*, ang. Snapping Turtle) opisala časovni vzorec izražanja *CIRBP* mRNK, ki vpliva na diferenciacijo spola in je povezan z nukleotidnim polimorfom na kodonu 63 v *CIRBP* (c63A > C), kjer je različica A termosenzitivna, različica C pa ne. V naših sekvenčnih podatkih nismo našli nukleotidnega polimorfizma na tem mestu v kandidatnem genu *CIRBP*.

6 ZAKLJUČKI

Na podlagi zastavljenih hipotez so naši zaključki naslednji:

1. V skupini 50 želv je prvo leto izlegalo 38 želv, ki so skupaj izlegle 166 jajc (134 izvaljenih želv, en neizvaljen – živ, sedem zamrtih plodov, 20 neoplojenih jajc, štiri inficirana jajca). Drugo leto je izlegalo 12 želv, ki so skupaj izlegle 41 jajc (33 izvaljenih želv, šest zamrtih plodov in dve neoplojeni jajci). Tretje leto so izlegale le štiri želve, ki so izlegle 17 jajc (osem izvaljenih želv, dva zamrta ploda in sedem neoplojenih jajc). Z dobljenimi rezultati smo potrdili prvo hipotezo, da v odsotnosti samcev upade število izvaljenih, kot tudi število oplojenih jajc. Vendar odstotek oplojenih jajc drugo leto ne upade glede na število izvaljenih jajc, medtem ko se tretje leto število oplojenih jajc skoraj razpolovi, torej se dodatno zmanjša z vsakim naslednjim letom.
2. V naši raziskavi smo ugotovili znatno odstopanje v sestavi med jajcem želv in jajcem kokoši tako v količini in vrsti maščobnih kislin kot aminokislin ter elementov v sledeh, kar potrjuje našo drugo hipotezo.
3. Glede na rezultate naše raziskave pri proučevani skupini želv ugotavljamo, da ne moremo določiti referenčne vrednosti koncentracij posameznih spolnih hormonov v iztrebkih pri spolno zrelih grških kornjačah za določevanje spola zaradi velikih razlik v koncentracijah med posameznimi živalmi. Na podlagi izmerjenih vrednosti v času izleganja jajc se na podlagi razmerja med posameznimi hormoni v iztrebkih odraslih kornjač lahko določi spol, kar delno potrdi našo tretjo hipotezo.
4. Tako kot smo predvideli v četrtri hipotezi, smo v populaciji želv na izbrani farmi lahko z uporabo molekulskih orodij zaznali strukturiranost populacije želv, ki kaže prisotnost klastra, ki ga lahko ločimo od drugih proučevanih vzorcev. Klaster sestavlja vzorci iz populacij THB-Si, THB-Srb in THHz-Si, kar kaže na povezanost farmske populacije *Testudo hermanni boettgeri* z izvorno populacijo *Testudo hermanni boettgeri* v Srbiji, umestitev vzorcev iz populacije THHz-Si v isti klaster pa podpira dvome o upravičenosti priznavanja *Testudo hermanni hercegovinensis* kot tretje podvrste *Testudo hermanni*. Preostali vzorci, izven tega klastra nakazujejo možnost ločevanja *Testudo hermanni hermanni* od *Testudo hermanni boettgeri* (THH-Si in THH-It). Vzorci THB-Cro in THB-Mne niso uvrščeni v farmski klaster *Testudo hermanni boettgeri*, kar je verjetno posledica nereprezentativnega vzorca obeh populacij (7 in 6 vzorcev).

Nukleotidno zaporedje kodogene regije mtDNK za 12S rRNK je v naši raziskavi sicer pokazalo nukleotidno raznolikost, a na osnovi identificiranih haplotipov ne moremo zanesljivo ločevati med podvrstami znotraj *Testudo hermanni*, je pa mogoča medvrstna diskriminacija.

Dobljeni rezultati sekvenciranja potrjujejo našo hipotezo, da med genomsko DNK različnih spolov ni velikih strukturnih razlik, ki bi nakazovale obstoj spolnih kromosomov oziroma obsežnih spolno specifičnih regij. Na kandidatnih lokusih, ki so pri nekaterih drugih vrstah plazilcev in dvoživk povezani z diferenciacijo spola med združenima vzorcema moške in ženske genomske DNK, nismo našli strukturnih razlik v posameznih nukleotidih. Zato sklepamo, da so za diferenciacijo spola pri grški kornjači verjetno odgovorni okoljski dejavniki, ki lahko vplivajo na različen režim izražanja kandidatnih genov, ki so vključeni v proces diferenciacije spola.

7 POVZETEK

Naša raziskava je razdeljena na štiri dele.

V prvem delu naše raziskave smo na farmi želv tri leta proučevali izbrano skupino *Testudo hermanni boettgeri*, v kateri je bilo vključenih 50 odraslih samic in 12 odraslih samcev. Prvo leto so v isti obori vse odrasle živali prebivale skupaj do konca reprodukcijskih aktivnosti (parjenja). Konec meseca maja smo po spolu ločili skupino za to sezono in naslednji dve sezoni. Število jajc in število drugega izleganja je postopno upadal. Prvo leto je jajca izlegalo 76,0 % samic, drugo leto 24,0 % in tretje leto le 8,0 %. Drugo gnezdo je imelo v prvem letu 26,3 % samic, naslednji dve leti je imela drugo gnezdo le ena samica. Opazili smo majhno signifikantno korelacijo med telesno maso posamezne želve in številom izleženih jajc. Med maso želve in povprečno maso jajc signifikantne korelacije nismo ugotovili. Skozi celotno opazovanje smo merili maso jajc (razpon povprečne mase jajc je bil od 15,1 do 16,8 g), dolžino (razpon povprečne dolžine jajc je bil od 33,9 do 36,1 mm) in širino jajc (razpon povprečne širine jajc je bil od 27,5 do 28,0 mm).

Izležena jajca smo prestavili v valilnike. Po zaključeni inkubaciji smo pregledovali valilniški ostanek (19,3-52,5 %). Dolžina inkubacije je variirala od 52 do 70 dni. Delež inkubiranih jajc, sposobnih preživetja, je bil prvo leto 80,7 %, drugo leto 80,5 % in tretje leto 47,8 %. Med neizleglimi jajci je bilo 62,5 % neoplojenih, 53,1 % inficiranih, 28,1 % dehidriranih in v 21,9 % smo našli želvje mladiče na različnih stopnjah razvoja.

V drugem delu raziskave smo proučevali sestavo jajca grške kornjače. Naš cilj je bil ovrednotiti osnovno sestavo, aminokislinski profil in profil maščobnih kislin, kot tudi proučiti prisotnost nekaterih elementov v sledeh. Povprečna velikost petnajstih jajc je bila $29,9 \times 39,5$ mm in povprečna masa 20,7 g. Lupina je predstavljala 12,5 %, beljak 46,9 % in rumenjak 40,6 % celotnega jajca podvrste *Testudo hermanni boettgeri*. Refrakcijski indeks beljaka je bil 1,3341, rumenjaka pa 1,5120. Beljak je vseboval 98,2 % vode, 0,9 % beljakovin, 0,7 % pepela in maščobe v sledeh. Rumenjak je vseboval 60,6 % vode, 21,0 % beljakovin, 14,2 % maščob in 4,0 % pepela. Vrednost pH beljaka je bila 8,8.

Med maščobnimi kislinami, ki so bile izmerjene v jajčnem rumenjaku, so prevladovale: oleinska kislina (53,26 %), palmitinska kislina (13,84 %), palmitoleinska kislina (12,58 %) in vakcenska kislina (9,33 %). Aminokislinska sestava je bila izmerjena v jajčnem beljaku, v katerem je bilo ugotovljenih 18 aminokislin. Večinski delež aminokislin v beljaku prestavlajo glutaminska kislina, asparaginska kislina, levcin, fenilalanin, lizin, glicin, serin, treonin in alanin. V lupini smo našli naslednje elemente v sledeh (razvrščeni so na podlagi padajočih koncentracij): Fe, Ni, Cu, Mn, Co, Zn, Cr, As in Se; v beljaku: Fe, Cu, Cr, Se in v rumenjaku: Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Cr, Ni, Pb, Co.

Naši rezultati o sestavi jajc pri *Testudo hermanni boettgeri* so lahko osnova za nadaljnje raziskave ter za primerjavo z vrednostmi v jajcih pri prosto živečih in drugih vrstah kornjač. Izmerjene vsebnosti, predvsem elementov v sledeh, so lahko pripomoček pri proučevanju vpliva onesnaženosti okolja, v katerem proučevane kornjače prebivajo, se prehranjujejo in se razmnožujejo.

V tretjem delu naše raziskave smo na manjši farmi proučevali skupino odraslih želv podvrste *Testudo hermanni boettgeri*, starih več kot 26 let. Proučevali smo štiri odrasle samice in štiri odrasle samce. Hkrati smo pri istem rejcu opazovali štiri mlade samce, ki so bili rojeni v ujetništvu in so bili stari 6 in 7 let. Od sredine maja do začetka oktobra smo zbirali vzorce iztrebkov ($N = 131$). Spolni hormoni (progesteron, estradiol in testosteron) so bili ekstrahirani iz iztrebkov in analizirani s pomočjo encimsko-imunskega postopka (ELISA) v skladu z navodili proizvajalca.

Nivo progesterona v iztrebkih samcev se je povečal takoj po obdobju izleganja jajc. Nasprotno je bil nivo progesterona pri samicah največji tik pred izleganjem jajc z vrednostmi od 58,19 do 137,01 ng/g iztrebkov. Pri samcih je bil nivo estradiola največji pred obdobjem izleganja jajc. Na začetku obdobja izleganja jajc se je nivo estradiola pri samicah gibal od 260,98 do 1711,50 pg/g iztrebkov. Največji nivo testosterona je bil pri samcih izmerjen takoj po izleganju jajc, tj. 14,99 ng/g iztrebkov. Pri samicah je bil nivo testosterona variabilen na začetku obdobja izleganja jajc z vrednostmi od 3,93 do 10,67 ng/g iztrebkov. Največji nivo testosterona pri samicah je bil izmerjen septembra, tj. 31,27 ng/g iztrebkov.

Žal se ELISA ni izkazala kot ustrezna metoda za določanje spolnih hormonov v iztrebkih mladih kornjač *Testudo hermanni boettgeri*. Pri odraslih želvah bi lahko bila ta metoda uporabna za dokazovanje aktivnosti reproduktivnih organov pri obeh spolih.

V četrtem delu naše raziskave smo proučevali variabilnost mitohondrijske DNK, strukturo populacij z mikrosatelitnimi označevalci in sekvencirali celoten genom združenih vzorcev DNK moških in ženskih živali. Z analizo mtDNA 188 vzorcev grške kornjače (podvrst *Testudo hermanni hermanni*, *Testudo hermanni boettgeri* in še ne potrjene podvrste *Testudo hermanni hercegovinensis*) v predelu, ki kodira 12S rRNK, s petih različnih geografskih lokacij smo identificirali tri različne mtDNA haplotipe pri *Testudo hermanni*, ki se razlikujejo na treh nukleotidnih pozicijah. Z vključitvijo vzorcev dveh sorodnih vrst (*Testudo graeca* in *Testudo marginata*) smo našli še tri dodatne haplotipe, ki jih karakterizira dodatnih 18 polimorfnih mest znotraj gena za 12S rRNK. Na osnovi identificiranih haplotipov je mogoča medvrstna diskriminacija, ne pa zanesljivo ločevanje med podvrstami znotraj *Testudo hermanni*. Najpogostejši haplotip I je prisoten pri vseh treh podvrstah *Testudo hermanni*. Prisotnost različnih haplotipov znotraj podpopulacij v naši raziskavi kaže človeški vpliv, to je na vnos kornjač različnega izvora v komercialne populacije, ki zato predstavljajo kombinacije genotipov z različnih geografskih lokacij. Pri dveh kornjačah smo opazili heteroplazmijo.

Z analizo vzorcev s setom desetih mikrosatelitnih označevalcev smo proučevali genetske odnose med populacijami grške kornjače v našem poskusu. Ugotovili smo, da je genetska pestrost v večjih populacijah, ki niso namenjene komercialni rabi, večja kot v komercialnih populacijah. PCA analiza je pokazala, da populacije *Testudo hermanni boettgeri* iz Slovenije in Srbije ter populacija *Testudo hermanni hercegovinensis* iz Slovenije tvorijo relativno kompaktno gručo, ki se loči od preostalih vzorcev. Z analizo mikrosatelitnih lokusov s programom STRUCTURE smo lahko pokazali enako razmejitve na dve gruči pri vrednosti K = 2, pri višjih vrednostih K pa se od manjše kompaktne gruče najprej oddvoji populacija *Testudo hermanni hercegovinensis*, kasneje pa se od slovenske populacije *Testudo hermanni hermanni* oddvoji še italijanska populacija *Testudo hermanni hermanni*.

S sekvenciranjem celotnega genoma združenih vzorcev DNK ženskih in moških živali smo žeeli preveriti hipotezo, da so razlike med moškim in ženskim genomom pri *Testudo hermanni* odgovorne za diferenciacijo spola. S pregledno literaturo smo identificirali 31 lokusov, ki so pri različnih vrstah plazilcev in dvoživk odgovorni za determinacijo spola. Genomske sekvence združenih ženskih in moških vzorcev smo poravnali z genomske sekvence *Gopherus evgoodei* in poskušali najti strukturne razlike med žensko in moško sekvenco v okolini kandidatnih lokusov. Naša skupna vzorca ženske in moške DNA na nobenem od kandidatnih lokusov nista kazala strukturnih razlik niti konsistentnih razlik med ženskim in moškim združenim vzorcem na ravni posameznih nukleotidov v kodogenih regijah kandidatnih genov. Na osnovi teh rezultatov sklepamo, da pri *Testudo hermanni* spol ni determiniran s spolnimi kromosomi ali obsežnejšimi spolno specifičnimi regijami niti s spolno specifičnimi aleli na proučevanih 31 kandidatnih lokusih.

8 SUMMARY

Our research was divided into several parts.

In the first part of our research, the three-year monitoring of a group of *Testudo hermanni boettgeri* on the reptile farm was performed, which included 50 adult females and 12 adult males. In the first year, all adults lived together in the same enclosure until the end of reproductive activities (mating). At the end of May, we separated group by gender for this season and the next two seasons. The quantity of eggs and number of second clutches declined gradually. Namely, eggs were laid by 76.0% of females in the first year, by 24.0% in the second year and only by 8.0% in the third year. Second clutches were seen in 26.3% of females in the first year, while in the following two years, only one female was observed to lay a second clutch. A small but significant correlation between the weight of a single tortoise and the number of eggs laid was seen. There was no significant correlation between the weight of a tortoise and its average egg weight. Throughout the observation period, the egg weight (the average egg weights ranged from 15.1 to 16.8 g), egg length (the average egg lengths ranged from 33.9 to 36.1 mm) and width of eggs (the average egg width ranged from 27.5 to 28.0 mm) were measured.

The laid eggs were placed into hatcheries after the incubation had concluded. Subsequently, at the end of incubation, eggshell mortality (19.3-52.5%) was examined. The incubation length varied from 52 to 70 days. The viability rate for the incubated eggs was 80.7% in the first year, 80.5% in the second year and 47.8% in the third year. Among the unhatched eggs, 62.5% were unfertilized, 53.1% were infected, 28.1% were dehydrated and 21.9% were found in various stages of embryonic development.

In the second part of this study, the composition of Hermann's tortoise (*Testudo hermanni boettgeri*) eggs was studied. Our aim was to evaluate the basic composition, amino acid and fatty acid profile, as well as to examine the presence of specific trace elements in the eggs. The average size of the fifteen eggs was 29.9×39.5 mm and the average weight was 20.7 g. The shell composed 12.5% of the whole *Testudo hermanni boettgeri* egg; the albumen 46.9%; and the yolk 40.6%. The refractive index of the albumen was 1.3341 and that of the yolk was 1.5120.

The egg albumen contained 98.2% water, 0.9% protein, 0.7% ash and has trace amount of fat. The egg yolk contained: 60.6% water, 21.0% protein, 14.2% fat, and 4.0% ash. The albumen pH was 8.8.

Among the fatty acids measured in the egg yolks, oleic acid (53.26%), palmitic acid (13.84%), palmitoleic acid (12.58%) and, vaccenic acid (9.33%) were the most abundant. The amino acid composition was measured in the egg albumen, and 18 amino acids were detected. The main amino acids present in egg albumen were glutamic acid, aspartic acid, leucine, phenylalanine, lysine, glycine, serine, threonine, and alanine. The following trace elements were found in the shell (concentrations presented in descending order): Fe, Ni, Cu, Mn, Co, Zn, Cr, As and Se; in the albumen: Fe, Cu, Cr, Se; and in the yolk: Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Cr, Ni, Pb, Co.

The results of our study of the egg composition of *Testudo hermanni boettgeri* can be used as a basic study for further comparison with the egg values of free-living tortoises and other tortoise species. The measured contents, especially the trace elements, can aid in studying the impact of environmental pollution in areas where the studied turtles live, feed and reproduce.

In the third part of this study, on a smaller farm, we observed a group of adult animals of *Testudo hermanni boettgeri* who were over 26 years old. We studied four adult females and four adult males. At the same time, at the same breeder, we observed four young males who were born in captivity and were 6 and 7 years old. From mid-May until the start of October, samples were collected (N=131). Sex hormones (progesterone, oestradiol and testosterone) were extracted from the faeces and analysed by enzyme immunoassays (ELISA) according to the manufacturer's instructions.

The level of progesterone in the faeces of the males increased immediately after the egg-laying period. In contrast, the progesterone levels in females were highest prior to egg laying, with values ranging from 58.19 to 137.01 ng/g faeces. In males, oestradiol levels were highest before the egg-laying period. At the beginning of the egg-laying period, the oestradiol levels in females ranged from 260.98 to 1711.50 pg/g faeces. The highest testosterone level in males, 14.99 ng/g faeces, was measured immediately after egg laying.

In females, the testosterone levels were variable at the onset of the egg-laying period, with values ranging from 3.93 to 10.67 ng/g faeces. The highest level of testosterone in females, 31.27 ng/g faeces, was measured in September.

Unfortunately, ELISA was not a useful method for determining sex hormones in the faeces of young *Testudo hermanni boettgeri* tortoises. In adult tortoises, however, this method could be useful for verifying the activity of the reproductive organs in both sexes.

In the fourth part of our study, we studied the variability of mitochondrial DNA, the structure and genetic relatedness of populations using microsatellite markers, and sequenced the entire genome of the pooled male and female DNA samples. By analysing the mtDNA of 188 samples of Hermann's tortoise (subspecies *Testudo hermanni hermanni*, *Testudo hermanni boettgeri* and the as yet unconfirmed subspecies *Testudo hermanni hercegovinensis*) in the region encoding 12S rRNA from five different geographical locations, we identified three different mtDNA haplotypes, that differed at three nucleotide positions. By including samples from two related species (*Testudo graeca* and *Testudo marginata*), we found three additional haplotypes that were characterized by additional 18 polymorphic sites within the 12S rRNA gene. Based on the identified haplotypes, was possible to discriminate the species, but not a reliable separation between subspecies within *Testudo hermanni*. The most common haplotype I is present in all three subspecies of *Testudo hermanni*. We also found the presence of different haplotypes within one subpopulation in our study, which showed human influence, i.e., the introduction of turtles of different origins into commercial populations, which therefore represented combinations of genotypes from different geographical locations. Heteroplasmy was observed in two turtles.

By analysing the samples using a set of ten microsatellite markers, we studied the genetic relationships between the Hermann's tortoise populations in our experiment. We found that genetic diversity was higher in larger non-commercial populations than in commercial populations. PCA analysis showed that the populations of *Testudo hermanni boettgeri* from Slovenia and Serbia and the population of *Testudo hermanni hercegovinensis* from Slovenia formed a relatively compact cluster that differed from the clusters of the remaining samples.

By analysing the microsatellite loci with the STRUCTURE program, we were able to show the same segregation into two clusters at $K = 2$, and at higher K values, the population of *Testudo hermanni hercegovinensis* first separated from the smaller compact cluster, and later, the Italian population of *Testudo hermanni hermanni* separated from the Slovenian population of *Testudo hermanni hermanni*.

By sequencing the entire genome of the pooled female and male DNA samples, we wanted to test the hypothesis that differences between the male and female genome described in the literature are responsible for sex differentiation in *Testudo hermanni*. Through the literature review, we identified 31 loci that are responsible for sex determination in different species of reptiles and amphibians. The genomic sequences of female and male samples were aligned with the genomic sequence of *Gopherus evgoodei*, and attempts were made to find structural variation between the female and male sequences in the vicinity of the candidate loci. Our pooled female and male DNA samples showed neither structural variation at the candidate loci nor consistent differences between the female and male pooled samples at the level of individual nucleotides within the coding regions of the candidate genes. Based on these results, we concluded that in *Testudo hermanni*, sex is not determined by sex chromosomes or more extensive sex-specific regions nor by sex-specific alleles in the coding regions of the 31 candidate loci studied.

9 ZAHVALE

Mentorici prof. dr. Alenki Dovč se zahvaljujem za ideje, vso strokovno pomoč in nasvete pri nastajanju doktorskega dela. Hvala vsem sodelujočim kornjačam. Pa je za nami še druga runda.

Zahvaljujem se članom komisije, doc. dr. Jošku Račniku, izr. prof. dr. Kseniji Šinigoj Gačnik in izr. prof. dr. Simoni Sušnik Bajec za natančen pregled in predloge za izboljšanje doktorskega dela. Hvala za potrpljenje.

Za pregled citirane literature se zahvaljujem vodji Centra za informatiko in knjižnico na Veterinarski fakulteti mag. Brigit Greccs-Smole. Za lektoriranje doktorskega dela se zahvaljujem lektorici mag. Nataši Koražija in AJE za lektoriranje angleškega dela doktorske disertacije.

Iskrena hvala prof. dr. Nini Čebulj-Kadunc za vedno konstruktivno pozitivno debato. Hvala Boštjanu Drolcu »Ni živleja brez Veleja«.

Prof. dr. Katarini Košmelj in doc. dr. Iztoku Tomažiču hvala za usmeritve pri statistiki.

Dr. Renati Lindtner-Knific za vso spodbudo (to je to, Renata).

Doc. dr. Zlatki Bajc hvala za pomoč pri analizi jajc.

Dr. Jasni Mićunović se zahvaljujem za pomoč pri bakteriologiji.

Iskrena hvala prof. dr. Petru Dovču, dr. Tinetu Pokornu, doc. dr. Minji Zorc iz Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete ter Jeleni za vso pomoč pri genetskem delu naloge.

Za podporo in pomoč se zahvaljujem tudi vsem svojim sodelavcem Veterinarske fakultete, predvsem sodelavkam iz Tajništva, sodelavcem na Inštitutu za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce in vsem na Kliniki za reprodukcijo, dr. Igorju Klobučarju za pomoč pri nastanku kar nekaj fotografij tako ali drugače (»Nikon rules«).

Zahvaljujem se Žigu A. Dularju in Karmen Dular, rejcem želv, za sodelovanje pri tej študiji ter prijateljem s farme Mireli Majetić, Joletu.

Hvala Dušanu Hrenu, Andreju Bolčiču, Mojci Muzik, Vuku Ikoviću za vso pripravljenost in pomoč ter raziskovanje kraljestva želv.

Za sofinanciranje doktorskega študija se zahvaljujem Evropskemu socialnemu skladu (»Naložba v vašo prihodnost« – operacijo delno financira Evropska unija), Republiki Sloveniji, Ministrstvu za izobraževanje, znanost in šport, v okviru javnega razpisa za izbor operacij »Inovativna shema za sofinanciranje doktorskega študija za spodbujanje sodelovanja z gospodarstvom in reševanje aktualnih družbenih izzivov – generacija 2012, Univerza v Ljubljani« in Veterinarski fakulteti, Univerze v Ljubljani. Raziskave so bile finančno podprte preko ARSO programskih skupin: P4-0092 Zdravje živali, okolje in varna hrana, P4-0053 Endokrini, imunski in encimski odzivi pri zdravih in bolnih živalih, P4-0220 Primerjalna genomika in genomska diverziteta.

Od srca bi se zahvalila moji Lani, staršema, družini, da so kar so, me razumejo in vedno verjamejo vame. Hvala, neizmerno rada vas imam.

Hvala Dominiki, Majama, Katarini in Valentinama ter vsem tistim, ki so bili in so vedno z mano, pa čeprav jih ni več tu (Renata, Miro).

10 LITERATURA

1. Dovč A. Poročilo o presoji tveganja za naravo za gojitev tujerodne vrste živali (grška kornjača – *Testudo hermanni*). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2005: 35 str.
2. Dovč A, Račnik J, Zorman Rojs O, et al. Reja grških želv v Sloveniji. Vet Nov 2005; 31(5/6): 173–83.
3. Willemsen RE. Status of *Testudo hermanni* in Greece. In: Ballasian D, eds. Red data book on Mediterranean chelonians. Bologna: Edagricole, 1995: 110–8.
4. Stubbs D. *Testudo hermanni*, Hermann's tortoise. In: Swingland IR, Klemens MW, eds. The conservation biology of tortoises. Gland, Switzerland : International Union for Conservation of Nature, IUCN, 1989: 34–6. (Occasional Papers of the IUCN Species Survival Commission, SSC, No. 5)
5. Bertolero A, Cheylan M, Hailey A, Livoreil B, Willemsen RE: *Testudo hermanni* (Gmelin 1789) – Hermann's tortoise. In: Conservation biology of freshwater turtles and tortoises: a compilation project of the IUCN/SSC tortoise and freshwater turtle specialist group. Chelonian Res Monogr 2011; 5: 059.1–059.20.
6. CITES. CITES identification manual. Vol. 3. Geneva: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES), 2002: 221–2.
7. Fritz U, Auer M, Bertolero A, et al. A rangewide phylogeography of Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Reptilia: Testudines: Testudinidae): implications for taxonomy. Zool Scr 2006; 35(5): 531–43.
8. Highfield AC. Practical encyclopedia of keeping and breeding tortoises and freshwater turtles. 1st ed. London: Carapace Press, 1996: 141–257.
9. Speake BK, Surai PF, Gore M. Lipid composition, fatty acid profiles, and lipid-soluble antioxidants of eggs of the Hermann's tortoise (*Testudo hermanni boettgeri*). Zoo Biol 2001; 20(2): 75–87.
10. Blanvillain G, Owens DW, Kuchling G. Hormones and reproductive cycles in turtles. In: Norris DO, Lopez KH, eds. Hormones and reproduction of vertebrates. San Diego: Elsevier, 2011: 277–303.
11. Kummrow MS, Gilman C, Mackie P, Smith DA, Mastromonaco GF. Noninvasive analysis of fecal reproductive hormone metabolites in female veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) by enzyme immunoassay. Zoo Biol 2011; 30(1): 95–115.
12. Köhler G, Haecky V, Eidenmüller B. Incubation of reptile eggs: basics, guidelines, experiences. 1st ed. Malabar, Fla.: Krieger, 2005: 132–85.
13. Valenzuela N, Adams DC. Chromosome number and sex determination coevolve in turtles. Evolution 2011; 65(6): 1808–13.
14. Hulin V, Girondot M, Godfreyb M, Guillon J. Mixed and uniform brood sex ratio strategy in turtles: the facts, the theory, and their consequences. In: Wyneken J, Godfrey MH, Bels V, eds. Biology of turtles. Boca Raton; London: CRC Press, 2008: 279–300.
15. Zenboudji S, Cheylan M, Arnal V, et al. Conservation of the endangered Mediterranean tortoise *Testudo hermanni hermanni*: the contribution of population genetics and historical demography. Biol Conserv 2016; 195: 279–91.

16. Cutuli G, Pierpaoli M, Cardoso S, Vannini M, Fratini S. Cross-amplification of microsatellite loci for species of the genus *Testudo*. *Herpetol J* 2012; 22(3): 195–8.
17. Biello R, Zampiglia M, Corti C, et al. Who's who in the western Hermann's tortoise conservation: a STR toolkit and reference database for wildlife forensic genetic analyses. *bioRxiv* 2018: 484030. doi: 10.1101/484030
18. Ferri V. Palearctic subregion. In: Ferri V, ed. *Turtles and tortoises*. Richmond Hill, Ont.: Firefly Books, 2002: 56–79.
19. McArthur S, Wilkinson R, Barrows M, Meyer J. Introduction. In: McArthur S, Wilkinson R, Meyer J, eds. *Medicine and surgery of tortoises and turtles*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2004: 1–30.
20. Frye FL. Reptile care, an atlas of diseases and treatments. Neptune City: T.F.H. Publications, 1991: 345–92.
21. Highfield AC. Practical encyclopedia of keeping and breeding tortoises and freshwater turtles. 1st ed. London: Carapace Press, 1996: 22–36.
22. Vinke T, Vinke S. *Testudo hercegovinensis* Werner, 1899, die Dalmatinische Landschildkröte. *Schildkröten Fokus* 2004; 1(1): 22–34.
23. Perälä J. Biodiversity in relatively neglected taxa of *Testudo*, L., 1758 s. l. *Chelonii* 2002(3): 40–53.
24. Djordjevic S, Djurakic M, Golubovic A, Ajtic R, Tomovic L, Bonnet X. Sexual body size and body shape dimorphism of *Testudo hermanni* in central and eastern Serbia. *Amphib Reptilia* 2011; 32(4): 445–58.
25. Makridou K, Charalambos T, Bakaloudis D, Vlachos C. Sexual dimorphism of *Testudo* tortoises from an unstudied population in northeast Greece. *Herpetology Notes* 2019; 12: 229–33.
26. Cutuli G, Cannicci S, Vannini M, Fratini S. Influence of mating order on courtship displays and stored sperm utilization in Hermann's tortoises (*Testudo hermanni hermanni*). *Behav Ecol Sociobiol* 2013; 56(2): 273–81.
27. Gvozdenović S, Iković V. Egg incubation period in the Hermann's tortoise *Testudo hermanni* Gmelin, 1789 (Testudines, Cryptodira, Testudinidae). *Hyla* 2014; 2: 45–6.
28. Swingland IR, Stubbs D. The ecology of a Mediterranean tortoise (*Testudo hermanni*): reproduction. *J Zool* 2009; 205(4): 595–610.
29. Galeotti P, Sacchi R, Pellitteri-Rosa D, Fasola M. Olfactory discrimination of species, sex, and sexual maturity by the Hermann's tortoise *Testudo hermanni*. *Copeia* 2007; 2007(4): 980–5.
30. Cutuli G, Cannicci S, Vannini M, Fratini S. Influence of male courtship intensity and male–male competition on paternity distribution in Hermann's tortoise, *Testudo hermanni hermanni* (Chelonia: Testudinidae). *Biol J Linn Soc* 2014; 111(3): 656–67.
31. Modi WS, Crews D. Sex chromosomes and sex determination in reptiles: commentary. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(6): 660–5.
32. Alam S, Sarre SD, Gleeson D, Georges A, Ezaz T. Did lizards follow unique pathways in sex chromosome evolution? *Genes* 2018; 9(5): 239.

33. Quinn AE, Sarre SD, Ezaz T, Marshall Graves JA, Georges A. Evolutionary transitions between mechanisms of sex determination in vertebrates. *Biol Lett* 2011; 7(3): 443–8.
34. Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(6/7): 887–900.
35. Quinn AE, Georges A, Sarre SD, Guarino F, Ezaz T, Graves JA. Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science* 2007; 316(5823): 411. doi: 10.1126/science.1135925
36. Montiel EE, Badenhorst D, Lee LS, Literman R, Trifonov V, Valenzuela N. Cytogenetic insights into the evolution of chromosomes and sex determination reveal striking homology of turtle sex chromosomes to amphibian autosomes. *Cytogenet Genome Res* 2016; 148(4): 292–304.
37. Rhen T, Schroeder AL. The genetics of thermosensitive sex determination. *Temperature (Austin)*. 2016; 4(2): 109–11. doi: 10.1080/23328940.2016.1259723
38. Schroeder AL, Metzger KJ, Miller A, Rhen T. A novel candidate gene for temperature-dependent sex determination in the common snapping turtle. *Genetics* 2016; 203(1): 557–71.
39. Martin-del-Campo R, Sifuentes-Romero I, Garcia-Gasca A. Hox genes in reptile development, epigenetic regulation, and teratogenesis. *Cytogenet Genome Res* 2019; 157(1/2): 34–45.
40. Radhakrishnan S, Literman R, Neuwald J, Severin A, Valenzuela N. Transcriptomic responses to environmental temperature by turtles with temperature-dependent and genotypic sex determination assessed by RNAseq inform the genetic architecture of embryonic gonadal development. *PLoS One* 2017; 12(3): e0172044. doi: 10.1371/journal.pone.0172044
41. Liang HW, Wang LH, Sha H, Zou GW. Development and validation of sex-specific markers in *Pelodiscus sinensis* using restriction site-associated DNA sequencing. *Genes* 2019; 10(4): e302 (11 str.). doi: 10.3390/genes10040302
42. Highfield AC. Practical encyclopedia of keeping and breeding tortoises and freshwater turtles. 1st ed. London: Carapace Press, 1996: 1–14.
43. Farke CM, Olek K, Gerding WM, Distler C. Multiple paternity and sperm storage in captive Hermann's tortoises, *Testudo hermanni boettgeri* determined from amniotic fluid adhering to the eggshell. *Mol Cell Probes* 2015; 29(4): 254–7.
44. Eendebak B. Incubation period and sex ratio of *Testudo hermanni boettgeri*. In: International Congress on Testudo Genus. Gonfaron-Hyères-France, 2001.
45. Iverson J, Ewert MA. Physical characteristics of reptilian eggs and a comparison with avian eggs. In: Deening D, Ferguson MWJ, eds. Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991: 87–100.
46. Miller JD, Dinkelacker SA. Reproductive structures and strategies of turtles. In: Wyneken J, Godfrey MH, Bels V, eds. Biology of turtles. Boca Raton: CRC Press, 2008: 225–78.
47. Köhler G, Haecky V, Eidenmüller B. Incubation of reptile eggs: basics, guidelines, experiences. 1st ed. Malabar : Krieger, 2005: 9–13.

48. Belitz HD, Grosch W. Food chemistry. 2nd ed. Berlin: Springer, 2009: 521–6.
49. Booth DT, Thompson MB. A comparison of reptilian eggs with those of megapode birds. In: Deening D, Ferguson MWJ, eds. Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1991: 325–44.
50. Zeidler G. Shell eggs and their nutritional value. In: Bell DD, Weaver WD, eds. Commercial chicken meat and egg production. 5th ed. Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 2002: 1109–28.
51. Tisaj K. Pomen jajc v prehrani študentov. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani; 2011.
52. Aubret F, Blanvillain G, Kok PJ. Myth busting? Effects of embryo positioning and egg turning on hatching success in the water snake *Natrix maura*. Sci Rep 2015; 21(5): e13385. doi:10.1038/srep13385
53. Prajanban BO, Shawsuan L, Daduang S, et al. Identification of five reptile egg whites protein using MALDI-TOF mass spectrometry and LC/MS-MS analysis. J Proteomics 2012; 75(6): 1940–59.
54. Hosen SMZ, Swati P, Dibyajyoti S. Artificial and fake eggs: dance of death. Adv Pharmacol Pharm 2013; 1(1): 13–7.
55. Schwarzenberger F, Francke R, Goltenboth R. Concentrations of faecal immunoreactive progestagen metabolites during the oestrous cycle and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). J Reprod Fertil 1993; 98(1): 285–91.
56. Schwarzenberger F, Mostl E, Palme R, Bamberg E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. Anim Reprod Sci 1996; 42(1/4): 515–26.
57. Lasley BL, Kirkpatrick JF. Monitoring ovarian-function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. J Zoo Wildl Med 1991; 22(1): 23–31.
58. Hao YJ, Nabi G, Deng XJ, Wang D. Non-invasive fecal steroid measurements for monitoring the reproductive status of a critically endangered yangtze finless porpoises (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*). Front Endocrinol 2019; 10: e606. doi:10.3389/fendo.2019.00606
59. Schwarzenberger F. The many uses of non-invasive fecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. Int Zoo Yb 2007; 41: 52–74.
60. Licht P. Endocrine patterns in the reproductive cycle of turtles. Herpetologica 1982; 38(1): 51–61.
61. Kuchling G. Effect of temperature and photoperiod on spermatogenesis in the tortoise *Testudo hermanni hermanni* Gmelin. Amphib Reptilia 1982; 2: 329–41.
62. Huot-Daubremont C, Bradshaw SD, Bradshaw FJ, Kuchling G, Grenot CJ. Variation of plasma sex steroid concentrations in wild and captive populations of Hermann's tortoise (*Testudo hermanni hermanni*) in Southern France. Gen Comp Endocrinol 2003; 130(3): 299–307.

63. Bertolero A, Nougarede JP, Cheylan M. Female reproductive phenology in a population of Hermann's tortoise *Testudo hermanni hermanni* in Corsica. *Herpetol J* 2007; 17(2): 92–6.
64. Mahmoud IY, Licht P. Seasonal changes in gonadal activity and the effects of stress on reproductive hormones in the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 107(3): 359–72.
65. DeSalle R, Schierwater B, Hadrys H. MtDNA: the small workhorse of evolutionary studies. *Front Biosci Landmark* 2017; 22: 873–87.
66. Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 2000; 109(6): 365–71.
67. van der Kuyl AC, Ballasina DLP, Dekker JT, Maas J, Willemse RE, Goudsmit J. Phylogenetic relationships among the species of the genus testudo (Testudinidae) inferred from mitochondrial 12S rRNA gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2002; 22(2): 174–83.
68. Mirimin L, Vernesi C, Bertolucci C, Mazzotti S, Bertorelle G. Mitochondrial DNA variation and divergence in three Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*) populations. *Ital J Zool* 2004; 71: 199–201.
69. Fritz U, Siroky P, Kami H, Wink M. Environmentally caused dwarfism or a valid species: is *Testudo weissingeri* Bour, 1996 a distinct evolutionary lineage? New evidence from mitochondrial and nuclear genomic markers. *Mol Phylogenet Evol* 2005; 37(2): 389–401.
70. Parham JF, Macey JR, Papenfuss TJ, et al. The phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 38(1): 50–64.
71. Fritz U, Harris DJ, Fahd S, et al. Mitochondrial phylogeography of *Testudo graeca* in the Western Mediterranean: old complex divergence in North Africa and recent arrival in Europe. *Amphib Reptilia* 2009; 30(1): 63–80.
72. Mashkaryan V, Vamberger M, Arakelyan M, et al. Gene flow among deeply divergent mtDNA lineages of *Testudo graeca* (Linnaeus, 1758) in Transcaucasia. *Amphib Reptilia* 2013; 34(3): 337–51.
73. Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V, et al. Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nature Genet* 2000; 25(3): 255–7.
74. Grzybowski T. Extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots. *Electrophoresis* 2000; 21(3): 548–53.
75. Drosopoulou E, Tsiamis G, Mavropoulou M, et al. The complete mitochondrial genome of the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae): genome description and phylogenetic considerations. *Mitochondrial DNA* 2012; 23(1): 1–12.
76. Forlani A, Crestanello B, Mantovani S, et al. Identification and characterization of microsatellite markers in Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*, Testudinidae). *Mol Ecol Notes* 2005; 5(2): 228–30.

77. Perez M, Livoreil B, Mantovani S, et al. Genetic variation and population structure in the endangered Hermann's tortoise: the roles of geography and human-mediated processes. *J Hered* 2014; 105(1): 70–81.
78. Mucci N, Mengoni C, Randi E. Wildlife DNA forensics against crime: resolution of a case of tortoise theft. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 8(1): 200–2.
79. Dovč A, Stvarnik M, Mavri U, Gregurić-Gračner G, Tomažič I. Experiences with Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*) microchipping in Slovenia: short communication. *Acta Vet Hung* 2016; 64(1): 47–53.
80. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: an update. *Bioinformatics* 2012; 28(19): 2537–9.
81. Dray S, Dufour AB. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J Stat Softw* 2007; 22(4): e1–20. doi: 10.18637/jss.v022.i04
82. Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, Phillips C, Carracedo A, Lareu MV. An overview of Structure: applications, parameter settings, and supporting software. *Front Genet* 2013; 4: e98. doi: 10.3389/fgene.2013.00098
83. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 2005; 14(8): 2611–20. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
84. Kamvar ZN, Tabima JF, Grunwald NJ. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *Peer J* 2014; 2: e281. doi: 10.7717/peerj.281
85. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 2006; 23(2): 254–67. doi:10.1093/molbev/msj030
86. Alvarez Y, Mateo JA, Andreu AC, Díaz-Paniagua C, Diez A, Bautista JM. Mitochondrial DNA haplotyping of *Testudo graeca* on both continental sides of the straits of Gibraltar. *J Hered* 2000; 91(1): 39–41.
87. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio JC, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol Biol Evol* 2017; 34(12): 3299–302.
88. Paradis E. Pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics* 2010; 26(3): 419–20.
89. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv* 2013; ID: arxiv-1303.3997
90. Afgan E, Baker D, Batut B, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(W1): W537–44.
91. Okonechnikov K, Conesa A, Garcia-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2016; 32(2): 292–4.
92. Pearse DE, Janzen FJ, Avise JC. Genetic markers substantiate long-term storage and utilization of sperm by female painted turtles. *Heredity* 2001; 86(Pt 3): 378–84.
93. Gist DH, Congdon JD. Oviductal sperm storage as a reproductive tactic of turtles. *J Exp Zool* 1998; 282(4/5): 526–34.

94. Cheylan M. *Testudo hermanni* Gmelin, 1798 – Griechische Landschildkröten. In: Fritz U, ed. Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIIA: Schildkröten (Testudines) I (Bataguridae, Testudinidae, Emydidae). Wiebelsheim: Aula, 2001: 179–289.
95. Stvarnik M, Bajc Z, Gacnik KS, Dovc A. Evaluation of different chemical compositions in eggs of the Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*). Slov Vet Res 2017; 54(1): 11–20.
96. Stvarnik M, Klobučar I, Lindtner Knific R, Gregurić Gračner G, Dovč A. Hatching artefacts in Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*) after artificial incubation. Clin Theriogenology 2019; 11(3): 479.
97. Longepierre S, Grenot C, Hailey A. Individual, local and subspecific variation in female Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*) reproductive characters. Contrib Zool 2003; 72(4): 221–6.
98. Noel KM, Qualls CP, Ennen JR. A comparison of artificial incubation and natural incubation hatching success of Gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) eggs in Southern Mississippi. Herpetologica 2012; 68: 324–33.
99. Landers JL, Garner JA, Mcrae WA. Reproduction of Gopher tortoises (*Gopherus Polyphemus*) in Southwestern Georgia. Herpetologica 1980; 36: 353–61.
100. Wallace BP, Sotherland PR, Tomillo PS, et al. Egg components, egg size, and hatchling size in leatherback turtles. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2006; 145(4): 524–32.
101. Hewavisenthi S, Parmenter CJ. Egg components and utilization of yolk lipids during development of the flatback turtle *Natator depressus*. J Herpetol 2002; 36: 43–50.
102. Li-Chan ECY, Powrie W, Nakai S. The chemistry of eggs and eggs products. In: Stadelman WC, Cotterill OJ, eds. Egg science and technology. 4th ed. New York: Food Product Press, 1995: 105–75.
103. Tunsaringkarn T, Siriwong W, Tungjaroenchai W. Chemical compositions of eggs from chicken, quail and snail-eating turtle. Thai J Agric Sci 2011; 44(5): 478–86.
104. Castro-Gonzalez MI, Perez-Gil Romo F. [Chemical composition of eggs of the olive ridley *Lepidochelys olivacea* (Testudines: Cheloniidae) and it's potential as a food source]. Rev Biol Trop 2011; 59(4): 1729–42.
105. Thompson MB, Speake BK. Energy and nutrient utilisation by embryonic reptiles. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2002; 133(3): 529–38.
106. Lam JC, Tanabe S, Chan SK, Lam MH, Martin M, Lam PK. Levels of trace elements in green turtle eggs collected from Hong Kong: evidence of risks due to selenium and nickel. Environ Pollut 2006; 144(3): 790–801.
107. Rittenhouse CD, Millspaugh JJ, Washburn BE, Hubbard MW. Effects of radiotransmitters on fecal glucocorticoid metabolite levels of three-toed box turtles in captivity. Wildl Soc Bull 2005; 33(2): 706–13.
108. Umapathy G, Deepak V, Kumar V, Chandrasekhar M, Vasudevan K. Endocrine profiling of endangered tropical chelonians using noninvasive fecal steroid analyses. Chelonian Conserv Biol 2015; 14(1): 108–15.

109. Atkins N, Jones SM, Edwards A. Fecal testosterone concentrations may not be useful for monitoring reproductive status in male blue-tongued lizards (*Tiliqua nigrolutea*: Scincidae). *J Herpetol* 2002; 36(1): 106–9.
110. Callard IP, Lance V, Salhanick AR, Barad D. The annual ovarian cycle of *Chrysemys picta*: correlated changes in plasma steroids and parameters of vitellogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 1978; 35(3): 245–57.
111. Lance VA, Rostal DC, Grumbles JS, Morici L. Endocrine profiles of the reproductive cycle of male and female desert tortoises. *Publ Soc Herpetol Mex* 1995; 2: 45–9.
112. Currylow AF, Tift MS, Meyer JL, Crocker DE, Williams RN. Seasonal variations in plasma vitellogenin and sex steroids in male and female Eastern box turtles, *Terrapene carolina carolina*. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 180: 48–55.
113. Carvalho SB, Velo-Antón G, Tarroso P, et al. Spatial conservation prioritization of biodiversity spanning the evolutionary continuum. *Nat Ecol Evol* 2017; 1(6): 151. doi:10.1038/s41559-017-0151
114. Fritz U, Bininda-Emonds OR. When genes meet nomenclature: tortoise phylogeny and the shifting generic concepts of *Testudo* and *Geochelone*. *Zoology (Jena)* 2007; 110(4): 298–307. doi: 10.1016/j.zool.2007.02.003