

Filogenetski odnosi i rasprostranjenost klenova roda *Squalius* (Cyprinidae, Actinopterygii) u rijekama Jadranskog slijeva

Mišur, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:110229>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno - matematički fakultet

Biološki odsjek

Ana Mišur

**FILOGENETSKI ODNOSI I RASPROSTRANJENOST
KLENOVA RODA *Squalius* (Cyprinidae, Actinopterygii) U
RIJEKAMA JADRANSKOGA SLIJEVA**

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen u Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Perice Mustafića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

*Ovaj rad posvećujem najboljim ljudima koje poznajem, svojim roditeljima.
Hvala vam što ste mi svojom ljubavlju, požrtvovnošću, strpljenjem i vjerom
dali svijet na dlanu.*

Hvala mojoj braći na podršci, savjetima i svakoj lijepoj riječi.

*Hvala mentoru izv.prof.dr.sc. Perici Mustafiću na profesionalnosti
tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala neposrednoj voditeljici dr.sc. Ivani Buj na susretljivosti,
strpljenju, utrošenom vremenu i korisnim savjetima.*

*Hvala mojim prijateljima Ivi, Jeleni, Maji, Andrei, Čavcu i Penavi na
podršci.*

*I na kraju, posebno hvala Gabrijelu, ovaj uspjeh dijelimo skupa jer ti si moj,
a ja sam tvoja.*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

FILOGENETSKI ODNOSI I RASPROSTRANJENOST KLENOVA RODA *Squalius* (Cyprinidae, Actinopterygii) U RIJEKAMA JADRANSKOGA SLIJEVA

Ana Mišur

Rooseveltov trg 6,10 000 Zagreb, Hrvatska

Rod *Squalius*, karakterističan za rijeke jadranskoga slijeva, od velike je važnosti za očuvanje biološke raznolikosti. Filogenetski odnosi roda nisu dovoljno istraženi, kao ni njegova evolucija na ovom području. Podatci o prisutnosti i rasprostranjenosti pojedinih vrsta riba prikupljeni su s 19 lokacija duž jadranskog slijeva. Glavni cilj ovoga rada bio je utvrditi filogenetske odnose klenova roda *Squalius*, njihovu filogeografiju, geografsku rasprostranjenost te prisutnost kriptičkih vrsta ili podvrsta. Utvrđena je specifična prostorna raspodjela vrsta koja je bila uvjetovana geografskim čimbenicima koji su se mijenjali tijekom povijesti te utjecali na evoluciju vrsta ovog roda. Rezultati dobiveni filogenetskim analizama ukazuju na mogućnost dvostruke kolonizacije jadranskog slijeva vrstama roda *Squalius*. Otkrivena je također prisutnost nove filogenetske linije koja moguće predstavlja zasebnu taksonomsku jedinicu.

(br.str. 56, br.sl. 11, 4 tablice, br.lit.nav. 64, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: filogenija, bioraznolikost, filogeografija

Voditelj: Dr. sc. Perica Mustafić, izv. prof.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Ivana Buj

Ocjenjitelji:

Dr.sc. Perica Mustafić

Dr.sc. Zora Popović

Dr.sc. Ines Radanović

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology Graduation Thesis

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AND DISTRIBUTION OF THE GENUS *Squalius* IN RIVERS OF THE ADRIATIC WATERSHED

Ana Mišur

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Genus *Squalius*, is common in the rivers of the Adriatic basin, it is of great importance for biodiversity conservation. Phylogenetic relationships of the genus are underexploited and so is its evolution in this area. Data on the presence and distribution of genus were collected from 19 locations along the Adriatic Basin. The main objective of this study was to determine the phylogenetic relationships of the genus *Squalius*, their phylogeography, geographic distribution and the presence of species or subspecies. There was a specific spatial distribution of species, which indicates the great influence of geography, which has historically been variable in the evolution of the species of this genus. The results obtained by phylogenetic analyzes indicate the possibility of a double colonization of Adriatic Basin with species of genus *Squalius*. We found the presence of a new phylogenetic line which could represent a separate taxonomic unit.

(56 pages, 11 figures, 4 tables, 64 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: phylogeny, biodiversity, phylogeography

Supervisor: Dr. sc. Perica Mustafić,

Assoc. Prof. Assistant Supervisor: Dr. sc. Ivana Buj

Reviewers:

Dr. sc. Perica Mustafić

Dr. sc. Zora Popović

Dr. sc. Ines Radanović

SADRŽAJ

1. UVOD.....	7
1.1. Taksonomska pripadnost roda <i>Squalius</i>	7
1.2. Literaturni podatci o klenovima u jadranskom slijevu.....	8
1.3. Osnovne značajke roda <i>Squalius</i>	10
1.4. Morfologija, biologija i rasprostranjenost.....	10
1.4.1. <i>Sq. squalus</i>	10
1.4.2. <i>Sq. svallize</i>	11
1.4.3. <i>Sq. illyricus</i>	12
1.4.4. <i>Sq. zrmanjae</i>	13
1.4.5. <i>Sq. microlepis</i>	14
1.4.6. <i>Sq. janae</i>	15
1.5. Raznolikost i važnost ihtiofaune.....	17
2. CILJ.....	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Materijali.....	20
3.1.1. Uzorci.....	20
3.1.2. Pribor i uređaji.....	21
3.1.3. Puferi i otopine.....	22
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Izolacija genomske DNK.....	24
3.2.2. Umnažanje mitohondrijskog gena <i>cyt-b</i>	26
3.2.3. Elektroforeza.....	27
3.2.4. Određivanje primarne strukture molekule DNK.....	27
3.2.5. Računalne analize.....	27

4. REZULTATI.....	31
4.1. Broj i rasprostranjenost haplotipova.....	31
4.2. Metoda maksimalne parsimonije.....	36
4.3. Metoda maksimalne vjerojatnosti.....	38
4.4. Bayesova analiza.....	40
4.5. Genska udaljenost.....	41
5. RASPRAVA.....	43
5.1. Rasprostranjenost haplotipova.....	43
5.2. Filogenija.....	46
5.3. Genska raznolikost.....	47
6. ZAKLJUČAK.....	48
7. LITERATURA.....	50

1. UVOD

1.1. Taksonomska pripadnost roda *Squalius*

Predmet ovog diplomskog rada su slatkovodne ribe koje pripadaju rodu *Squalius*. Njihovo hrvatsko ime jest klenovi, a sistematska pripadnost sljedeća:

CARSTVO: Animalia

KOLJENO: Chordata

RAZRED: Actinopterygii

RED: Cypriniformes (šaranke)

PORODICA: Cyprinidae (šarani)

ROD: *Squalius* (Bonaparte, 1837)

Rod *Squalius* (klenovi) je rod razreda Actinopterygii (zrakoperke) iz porodice Cyprinidae (šaranke), koji naseljava slatkovodne tekućice i jezera.

Vrste ovog roda do nedavno su ubrajane u rod *Leuciscus* (Banareescu, 1964; Doadrio i Carmona, 1998). Smatralo se da su se dvije velike potporodice unutar porodice Cyprinidae: Cyprininae i Leuciscinae formirale tijekom oligocena (Cavander i Coburnm 1992; Chen i sur., 1984; Zardoya i Doadrio, 1998). Tu teoriju potvrđuju podaci koji govore da je moguće da se predstavnici potporodice Cyprininae pojavljuju već u srednjem oligocenu (Gaudant, 1977) premda su najraniji fosili Cyprinidae pronađeni na Pirenejskom poluotoku iz vremena kasnog oligocena, što se podudara sa pronalaskom fosila Leuciscinae (Cabrera i Gaudant, 1985). Unutar potporodice Leuciscinae, rod *Squalius* ima važnu ekološku i evolucijsku ulogu. Vrste roda *Squalius* su donedavno svrstavane unutar roda *Leuciscus* (Banareescu, 1964; Doario i Carmona, 1998) ali novija istraživanja govore da rod *Squalius* nije usko povezan s *Leuciscus leuciscus*, tipičnim predstavnikom Leuciscinae (Briolay i sur., 1998; Gilles i sur., 1998). Postoji problem nazivlja pojedinih vrsta, zbog taksonomske nedorečenosti roda.

1.2 Literaturni podatci o klenovima u jadranskom slijevu

Iako je rod *Squalius* bio predmet većeg broja istraživanja, o njegovoj evoluciji još uvijek nema mnogo podataka. Osim toga, čak ni sistematika ovog roda nije do kraja riješena te taksonomski status mnogih populacija, kao i rasprostranjenost vrsta nisu poznati. Na području jadranskoga slijeva u Hrvatskoj te Bosni i Hercegovini, što je i područje istraživanja ovog diplomskog rada, provedeno je više istraživanja koja su obuhvaćala populacije klenova. Primjerice Heckel i Kner (1958) opisuju vrstu *Sq. illyricus* s područja rijeka Soče, Krke i Cetine, *Sq. svallize* s područja Vrgorca i rijeke Neretve i *Sq. albus* iz rijeke Krke. Karaman (1925) opisuje vrstu *Sq. zrmanjae* i navodi rijeku Zrmanju kao njeno stanište. Bogutskaya i Zupančič (1999) ponovo opisuju *L. zrmanjae* (Karaman, 1925) gdje navode da je njegova rasprostranjenost ograničena samo na rijeke Zrmanju i Krku. Bianco i Knežević (1987) potvrđuju prisutnost *L. svallize* u rijekama Neretvi i Trebišnjici te također opisuju još jednu vrstu roda *Leuciscus* iz rijeke Krke gdje podrazumijevaju *L. illyricus* podvrstom *L. cephalus*. Rasprostranjenost *Sq. svallize* je također upitna s obzirom da se navodi njegova prisutnost u rijeci Ljutoj (Kosić, 1903) i na području istarskog poluotoka (Leiner i sur., 1995) a obično se podrazumijeva da nastanjuje rijeke Neretvu, Trebišnjicu i Maticu (Bogutskaya i Zupančič, 1999). Taler (1953); Saboncello (1967); Vuković i Ivanović (1971) navode rijeku Soču kao stanište *Sq. illyricus*, međutim te navode odbacuje Sket (1967). Bogutskaya i Zupančič (1999) ponovo analiziraju uzorak iz Soče i navode ga kao *Sq. illyricus*. Unatoč tome nema novijih podataka o prisutnosti *Sq. illyricus* u rijeci Soči (Kottelat i Freyhof, 2007). Na temelju navedenog popisa radova koji su se bavili klenovima u jadranskom slijevu, moglo bi se zaključiti kako se radi o vrlo dobro proučenoj skupini riba. No, s obzirom da je sistematika klenova vrlo složena, a svi navedeni radovi temeljili su se isključivo na morfološkim značajkama te su obuhvaćali jednu ili manji broj populacija, oni nisu omogućili razjašnjavanje sistematskog statusa i filogenetskih odnosa vrsta roda *Squalius* u području istraživanja. Štoviše, zabilježen je niz sinonima i krivih identifikacija (npr. samo klenovi iz Krke navode se pod šest imena: *Sq. illyricus*, *Sq. albus*, *L. illyricus*, *L. cephalus*, *L. cephalus* var. *albus* i *Sq. squalus* te nije jasno radi li se o sinonimima ili prisutnosti većeg broja vrsta, linija ili tipova, a slična je situacija i na većini ostalih lokaliteta). S druge strane, klenovi iz jadranskoga slijeva gotovo da i nisu bili premet istraživanja molekularne filogenije (osim nekoliko jedinki uključenih u istraživanje filogeografije potporodice

Leuciscinae; Perea i sur., 2010). Upravo takva istraživanja su nužna kako za razjašnjavanje točnog taksonomskog statusa i srodstvenih odnosa, tako i za rasvjetljavanje evolucije ovog roda.

Podrijetlo i raznolikost riblje faune mediteranskog područja se nastoje objasniti pomoću tri moguće hipoteze, a sve podrazumijevaju podrijetlo sa područja Azije (Banarescu, 1989; 1992). Prva hipoteza pretpostavlja da su azijske vrste mogle nastaniti područje središnje Europe preko mreža rijeka jedino u razdoblju oligocena, prije uzdizanja Urala (Banarescu, 1992). Daljnje širenje šaranki na područje južne Europe i sjeverne Afrike preko Gibraltara je bilo moguće sve do pleistocena i djelomične izolacije Pirinejskog poluotoka (Almacá, 1976; Banarescu, 1964; 1989; 1992). Štoviše, uniformna fauna ciprinida središnje Europe, iscrpljena tijekom razdoblja glacijacije zamijenjena je dunavskim ciprinidima u interglacijalnim i postglacijalnim periodima (Banarescu, 1992). Druga hipoteza (Bianco, 1990), podrazumijeva širenje azijskog pretka ciprinida tijekom tako zvane mesinske krize saliniteta za vrijeme pliocena kada se mediteranski bazen gotovo potpuno isušio, a potom ispunio slatkom vodom Sarmatskog mora (Hsu i sur., 1977). Prema toj hipotezi slatkovodna faza Mediterana bila bi odgovorna za rasprostranjenost ciprinida na mediteranskom području kao i za visoku razinu endemizma na području Pirinejskog poluotoka i južne Grčke (Bianco, 1990). Treća hipoteza predlaže da se širenje ciprinida dogodilo u vrijeme formiranja sjeverne obale Afrike u ranom pliocenu. Pomicanje afričke i europske ploče pogodovalo bi fizičkoj barijeri južno mediteranskih vrsta ciprinida i naknadnoj kolonizaciji sjeverne Afrike i Pirinejskog poluotoka (Doadrio, 1990).

Bez obzira na navedena saznanja, filogenetski odnosi roda *Squalius* na području Mediterana ostaju nejasni.

1.3. Osnovne značajke roda *Squalius*

Ovaj rod obuhvaća 47 vrsta rasprostranjenih u Europi i Aziji te pokazuje veliku raznolikost na području Mediterana (Bogutskaya i sur., 2010). Naziv dolazi od lat. riječi *squaleo*, *squalidus*, što znači „s grubom kožom“.

Na području jadranskoga slijeva, prema dosadašnjim podacima, rod je predstavljen sa šest vrsta: istarski klen (*Squalius janae*, Bogutskaya i Zupančič, 2010), svalić (*Squalius svallize*, Heckel i Kner, 1858), zrmanjski klen (*Squalius zrmanjae*, Karaman, 1928), makal (*Squalius microlepis*, Heckel, 1843), ilirski klen (*Squalius illyricus*, Heckel i Kner, 1858) i primorski klen, bijeli klen (*Squalius squalus*, Bonaparte, 1838).

Navedene su vrste slabo istražene, uz napomenu da su *Sq. illyricus*, *Sq. zrmanjae* i *Sq. svallize* endemi jadranskoga slijeva, a *Sq. microlepis* kritično je ugrožen hrvatski endem (Ćaleta i sur., 2015).

1.4. Morfologija, biologija i rasprostranjenost klenova u jadranskom slijevu

1.4.1. *Squalius squalus*

Primorski klen ima pigmetne raspoređene po rubovima slobodnog dijela ljuski te zbog toga s boka ima općenito „mrežasti“ uzorak. Prsne, trbušne i podrepna peraja tamnosmeđe su obojene. Usta su mala, poludonja i koso postavljena. Maksimalna veličina do koje naraste je 35 cm (preuzeto iz www.ribe-hrvatske.com).

Naseljava vodotoke u Italiji koji se slijevaju u Ligursko i Tirensko more te rijeke jadranskoga slijeva u Italiji, Švicarskoj, Sloveniji, Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini te Crnoj Gori do Skadarskog jezera (Bogutskaya i Zupančič, 2010). Rasprostranjenost vrste *Sq. squalus* u Hrvatskoj kao i njegov taksonomski status nisu jasni. Poznato je da naseljava rijeke Istarskoga poluotoka (Dragonja, Raša, Pazinčica, Boljunčica), rijeku Krku i Neretvu (Bogutskaya i Zupančič, 1999).

Regionalni IUCN status: nije procijenjena (Mrakovčić i sur., 2006)

Globalni IUCN status: najmanje zabrinjavajuća (IUCN Red list ver. 3.1)



Slika1. *Squalius squalus*
(preuzeto iz www.ittiofauna.org)

1.4.2. *Squalius svallize*

Svalić ima vitko tijelo dugo do 20 cm. Glava mu je uska, a čelo usko i zaobljeno. Usta su mala, poludonja i koso postavljena, a donja usna prekrivena je gornjom. Tijelo mu pokrivaju velike ljuske, leđa su tamnosive, bokovi metalnosrebrne boje, a trbuh bijel. Živi u tekućim krškim vodama, i to u većim jatima. Nalazi se i u podzemnim tokovima. Hrani se vodenim beskralješnjacima. Zbog zagađenja, unosa alohtonih vrsta i uništavanja prirodnoga staništa je ugrožen (Mrakovčić i sur., 2006).

Rasprostranjen je u slijevu rijeke Neretve, Imotskom polju, Baćinskim jezerima, rječici Ljutoj u Konavlima te rijeci Matici. Zabilježen je također na području Istre (Mirna, Pazinčica, Raša, Boljunčica i Rakov potok) (Leiner i Popović, 1984; Leiner i sur., 1995) međutim, s obzirom na taksonomske nedoumice taj podatak nije pouzdan (Bogutskaya i Zupančić, 1999).

Ubraja se u hrvatske autohtone endemske vrste (Mrakovčić i sur., 2006).

Regionalni IUCN status: osjetljiva (Mrakovčić i sur., 2006)

Globalni IUCN status: osjetljiva(IUCN Red list ver. 3.1)



Slika2. *Squalius svallize*
(preuzeto iz www.ribe-hrvatske.com)

1.4.3. *Squalius illyricus*

Ilirski klen je riba veličine do 40 cm. Tijelo mu je vretenasta oblika, a glava uska. Usta su poludonja, razmjerno mala, mesnatih usana. Prsne peraje su zaobljene i uvijek okrenute unatrag. Bokovi su metalnosrebrne boje, leđa su malo tamnija, a trbuh srebrno bijel. Hrani se širokim spektrom hrane životinjskog i biljnog podrijetla. Naseljava sporije nizinske vodene tokove. Zbog onečišćenosti i unosa alohtonih (stranih) vrsta i uništavanja prirodnoga staništa dosta je ugrožen. Prisutan je u Italiji, Sloveniji i Hrvatskoj.

U Hrvatskoj ga se može naći u rijekama Cetini i Krki (Mrakovčić i sur., 2006).

Autohtona je vrsta i endem jadranskog slijeva (Mrakovčić i sur., 2006).

Regionalni IUCN status: osjetljiva (Mrakovčić i sur., 2006)

Globalni IUCN status: gotovo ugrožena (IUCN Red list ver. 3.1)



Slika 3. *Squalius illyricus*
(preuzeto iz www.ittiofauna.org)

1.4.4. *Squalius zrmanjae*

Prema Karamanu (1928), ova se vrsta razlikuje od *S.svallize* iz Neretve po nešto šiljatijoj glavi, manje vitkom tijelu i po manjem broju mekanih šipčica u leđnoj i podreproj peraji. Zrmanjski klen ima pigmente u obliku trokutića na središnjem dijelu ljuske. Boja tijela je srebrnkasta s tamnijim leđima i svjetlijim trbuhom. Maksimalna veličina do koje naraste je 35cm. Mlade jedinke žive u jatu, a odrasle pojedinačno. Živi pretežno u krškim tekućicama, premda se ponekad može naći i u ujezerenim dijelovima (Mrakovčić i sur., 2006).

Naseljava rijeku Zrmanju s pritocima Krpom i Krnjezom. Zabilježen i u donjem dijelu Krke. Zrmanjski je klen unesen povratnom hidrocentralom i u sustav rijeke Ričice, gdje čini veliki problem za endemskog hrvatskog pijora (*Telestes croaticus*)(<http://www.new.ribe-hrvatske.com>).

Smatra se da je *Sq. zrmanjae* jedina vrsta *Squalius* prisutna u rijeci Zrmanji. Upitna je prisutnost zrmanjskog klena u rijeci Cetini s obzirom da se vrsta o kojoj su Katurić (Katurić, 1883), Karaman (Karaman, 1928) i Leiner i Popović (Leiner i Popović, 1984) raspravljali u svojim radovima navodi kao *L. illyricus* ili *L. zrmanjae* (Bogutskaya i Zupančić, 1999).

Sq. zrmanjae je autohtona, endemska vrsta jadranskoga slijeva i hrvatski endem.

Regionalni IUCN status: osjetljiva (Mrakovčić i sur., 2006)

Globalni IUCN status: gotovo ugrožena (IUCN Red list ver. 3.1)



Slika 4. *Squalius zrmanjae*
(preuzeto iz www.fishbase.org)

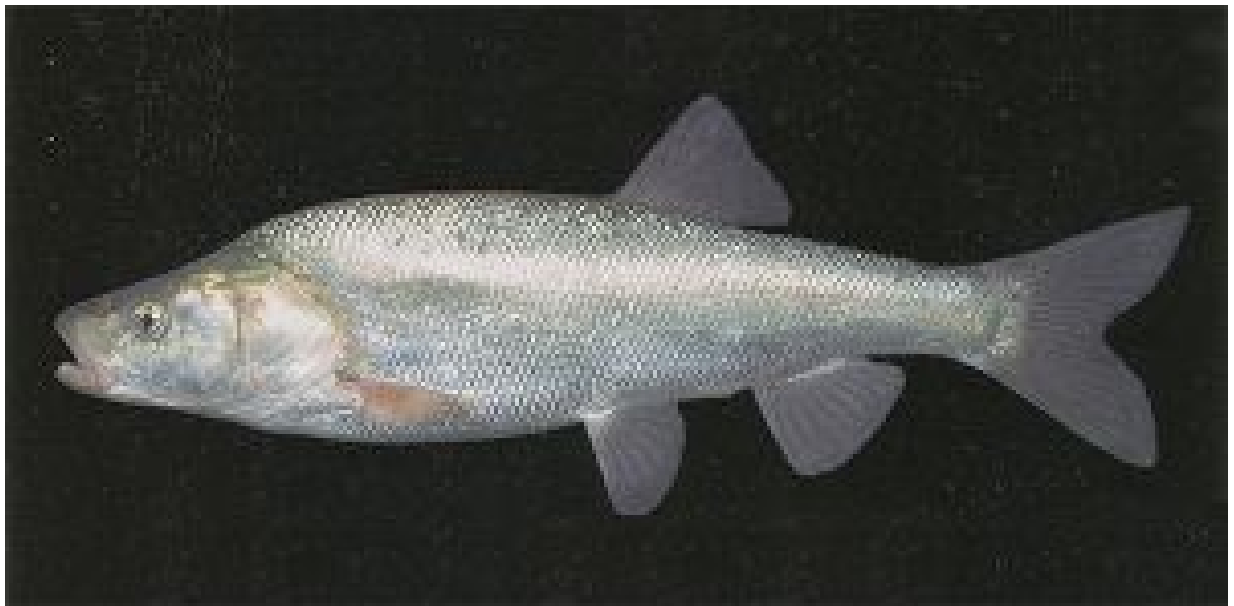
1.4.5. *Squalius microlepis*

Makal je riba vretenasta tijela koja može narasti do 30 cm. Tijelo joj prekrivaju male ljuske. Po bočnim stranama tijela proteže se slabo uočljiva tamna pruga. Leđa su tamnosiva, bokovi metalnosrebrni, a trbuh bijel. Peraje su svijetložute boje. Živi u sporotekućim vodama i čistim jezerima. Veći se primjerci hrane sitnim ribama pa čak i mladi iste vrste (Mrakovčić i sur., 2006).

Obitava samo u vodama na području Imotskog (jezero Prološko blato te rijeke Vrljika i Ričica), Vrgorca (rijeka Matica) te Tihljani i potencijalno u Trebižatu u Bosni i Hercegovini. Autohtona je vrsta i endem jadranskoga slijeva (Mrakovčić i sur., 2006).

Regionalni IUCN status: kritično ugrožena (Mrakovčić i sur., 2006)

Globalni IUCN status: ugrožena (IUCN Red list ver. 3.1)



Slika 5. *Squalius microlepis*
(preuzeto iz www.ittiofauna.org)

1.4.6. *Squalius janae*

Istarski klen ima pigmente raspoređene po rubovima slobodnog dijela ljuski te zbog toga s boka ima općenito „mrežasti“ uzorak. Prsne, trbušne i podrepna peraja obojene su svjetlo-žuto. Boja oka također je žućkasta. Gornja usna je vidljivo dulja od donje i znatno izbočena naprijed. Najveći primjerci mogu biti dugi i do 35cm.

Nastanjuje rijeke Dragonju, Pazinčicu, Boljunčicu, a u prošlosti je naseljavao i isušeno jezero Čepić. Vrlo vjerojatno dolazi i u višim dijelovima Mirne i Raše (Zupančić i sur., 2010). S obzirom da je *Sq. janae* tek nedavno opisan kao zasebna vrsta isključivo na temelju morfoloških oznaka, a do tada je svrstavan u *Sq. squalus* (Bogutskaya i Zupančić, 2010) njegov taksonomski status nije razriješen. Samim time i njegova rasprostranjenost nije pouzdana.

Regionalni IUCN status: nije procijenjen (Mrakovčić i sur., 2006)

Globalni IUCN status: nije procijenjen (IUCN Red list ver. 3.1)



Slika 6. *Squalius janae*
(preuzeto iz www.fishbase.org)

1.5. Raznolikost i važnost ihtiofaune

U slatkim vodama u Hrvatskoj živi oko 150 vrsta riba (Mrakovčić i sur., 2006), od kojih 21 boravi i u boćatim i slanim vodama. Bogatstvo vrstama slatkovodnih riba (osobito razina endemizma), svrstava Hrvatsku na drugo mjesto u Europi. To je uvjetovano geografskim položajem naše zemlje koja pripada dvama sljevovima, crnomorskom (dunavskom) i jadranskom slijevu, ali i složenoj geološkoj prošlosti ovog područja. Jadranski slijev obuhvaća samo 38% teritorija Hrvatske, a nastanjuje ga čak 88 vrsta riba, od kojih su 74 autohtone i 14 je alohtonih vrsta (Mrakovčić i sur., 2006; Duplić, 2008).

Porodica Cyprinidae predstavlja najbrojniju porodicu slatkovodnih riba u koju se ubrajaju 3032 opisane vrste unutar 371 roda. Rod *Squalius* podrazumijeva 47 vrsta ograničenih samo da područje Europe za razliku od roda *Leuciscus* koji nastanjuje područje od Europe do Sibira i sadrži 17 priznatih vrsta (<http://www.fishbase.org>). U Hrvatskoj Cyprinidae su najzastupljenija porodica sa 67 vrsta. Rod *Squalius* pripada podporodici Leuciscinae te broji 8 vrsta od kojih je šest obrađeno u ovom radu (<http://www.ribe-hrvatske.com>).

Ihtiofauna je jedan od najboljih pokazatelja hidroloških promjena vodenih ekosustava. Neizostavan je dio biološke raznolikosti i nezamjenjiva karika u hranidbenim mrežama vodenog ekosustava, a ujedno poveznica s hranidbenim mrežama kopnenog ekosustava. Dodjeljuje joj se nekoliko uloga: regulativna, informativna te uloga u povezivanju trofičkih razina (Holmlund i Hammer, 1999). Ribe su važan čimbenik u ekonomiji mnogih zemalja i predmet brojnih međudržavnih sporazuma, dogovora i sporova, te osnovni izvor životinjskih proteina za ljudsku populaciju (Mrakovčić i sur., 2006; Duplić, 2008).

Ribe su najugroženija skupina kralješnjaka (Radović, 1999). Vrlo su osjetljive na degradaciju staništa poput promjena brzine toka, pregradnje rijeka, zagrijavanja i intenzivnog iskorištavanja vode (Descy i Empain, 1984).

Najveći utjecaj na riblje zajednice u Hrvatskoj ima unos alohtonih vrsta, onečišćenje, regulacija vodotoka i degradacija staništa (Mrakovčić i sur., 2006; Tutman i sur., 2008). Ostali čimbenici poput izgradnje brana i hidroakumulacija, melioracije, goleme potrebe za tehničkom i pitkom vodom te prelov, također vrlo značajno utječu na riblje zajednice, ne samo na području ovih prostora nego i cijele Europe (Cowx, 2002).

Izgradnja hidroelektrana ima velik utjecaj na riječne ekosustave te je njihov utjecaj na vrste i staništa većinom negativan (Bonacci, 2003). Posljednjih stotinjak godina čovjek

je svojim intenzivnim djelovanjem na vodena staništa uzrokovao velike promjene ihtiofaune pa su mnoge vrste gotovo nestale ili su se njihove populacije znatno smanjile (Jeppesen i sur., 2005; Hering i sur., 2006). Iz naših je voda izumrlo šest vrsta riba, od kojih su dvije vrste iz jadranskoga slijeva: atlantska jesetra (*Acipenser sturio* Linneaus, 1758) i gatačka gaovica (*Phoxinellus metohiensis* Steindachner, 1901).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- koristeći se izoliranim mitohondrijskim genom za citokrom b (*cyt-b*) kao molekularnim markerom, utvrditi filogenetske odnose roda *Squalius* s područja jadranskoga slijeva
- proučiti filogeografiju koja može pomoći u rješavanju taksonomskih pitanja
- utvrditi geografsku rasprostranjenost pojedinih haplotipova i mitohondrijskih filogenetskih linija te usporediti s postojećim podacima o rasprostranjenosti vrsta
- utvrditi eventualnu prisutnost neopisanih taksonomskih jedinica

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Za ovo istraživanje je prikupljeno 129 uzorka s 19 lokacija u jadranskom slijevu, i to tako da su jedinkama odrezani mali komadići tkiva peraja za uporabu u izolaciji genetskog materijala i daljnjoj analizi (Tablica 1.). Determinacija jedinki provedena je pomoću ključeva i priručnika (Kottelat i Freyhof, 2007; Bogutskaya i Zupančič, 1999; Bogutskaya i Zupančič, 2010).

Tablica 1. Popis vrsta po lokalitetima. Navedena je taksonomska pripadnost populacija prema literaturnim podacima i prema morfološkim obilježjima.

LOKALITET	VRSTA
Neretva	<i>Sq. svallize</i> , <i>Sq. squalus</i>
Raša	<i>Sq. janae</i> , <i>Sq. squalus</i>
Hutovo blato	<i>Sq. svallize</i>
Prološko blato	<i>Sq. microlepis</i>
Vrljika	<i>Sq. microlepis</i>
Vinalić	<i>Sq. illyricus</i>
Krka	<i>Sq. illyricus</i> , <i>Sq. squalus</i>
Visovac	<i>Sq. squalus</i>
Zrmanja	<i>Sq. zrmanjae</i>
Ričica	<i>Sq. zrmanjae</i>
Trebišnjica	<i>Sq. svallize</i>
Ljuta	<i>Sq. svallize</i>

Dragonja	<i>Sq. janae, Sq. squalus</i>
Boljunčica	<i>Sq. janae, Sq. squalus</i>
Pazinčica	<i>Sq. janae, Sq. squalus</i>
Mirna	<i>Sq. janae, Sq. squalus</i>
Ravno	<i>Sq. svallize</i>
Borutski potok	<i>Sq. janae, Sq. squalus</i>

3.1.2. Pribor i uređaji

- mikropipete

Pipetman, Gilson

- tubice (rabljene i kao tubice za sakupljanje)

Safe Lock Tubes, Eppendorf

- tubice za centrifugiranje

2mL DNeasy Mini spin column

QIAGEN DNeasy®

- PCR tubice

0,2mLPCR Tubes, Eppendorf

- vaga

KERN & Sohn GmbH, EW 150-3M

- vodena kupelj

SHEL LAB

- centrifuga

Mini Spin plus, Eppendorf

- vrtložna miješalica (vorteks)

BR-2000 Vortexer, BIO-RAD

- PCR uređaj

Mastercycler personal, Eppendorf

- kadice za elektroforezu

SUB-CELL GT, BIO-RAD

- uređaj za napajanje za elektroforezu

Power Pac 300, BIO-RAD

- UV- transiluminator

UV-Transilluminator 2000, BIO-RAD

- digitalni fotoaparati

OLYMPUS, CAMEDIA, Digital Camera, C4000 ZOOM

3.1.3. Pufferi i otopine

- komercijalni kompleti za izolaciju:

QIAGEN DNeasy® Blood&Tissue Kit

For molecular biology applications - komplet za izolaciju genomske materijale iz životinjskih tkiva i krvi

- mješavina za PCR 25 μ L (PCR, *polimerase chain reaction*)

AmpliTaq Gold 360 Master Mix

Početak VBC Biotech Services GmbH

Početak (engl. *primer*) jednolančane susekvence oligonukleotida dužine 14-40 nukleotida čije su sekvence komplementarne krajevima one DNK sekvence koja se želi umnožiti, u ovom slučaju mitohondrijski gen *cyt-b* koji sadržava 1140 parova baza.

- pripremljeni genski materijal (DNK) 4 μ L

- TAE pufer (1x) 100mL
(40mM Tris, 1mM EDTA)

- agarozna 1g

Agarose for the separation of GeneAmp™, PCR Products, Applied Biosystems Sigma, Life Science

- otopina etidij bromida

- marker za elektroforezu - *O'GeneRuler 50bp, DNA Ladder, Qiagen*

- boja za elektroforezu -*Coraload, Concentrate, 10x, Qiagen*

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija genomske DNK uporabom komercijalnog kompleta

QIAGEN DNeasy® Blood&Tissue Kit

For molecular biology applications -komplet za izolaciju genomskog materijala iz životinjskoga tkiva i krvi

Postupak

1. korak

Pripremljeni uzorci tkiva stavljaju se u tubice od 2mL i zatim se dodaje 180 μ L pufera ATL-a i 20 μ L proteinaze K. Sve se kratko promiješa na vrtložnoj miješalici i potom stavlja u vodenu kupelj na inkubaciju preko noći (pri 56 °C) da se tkivo potpuno razloži. Nakon inkubacije uzorke treba ponovo promiješati na vrtložnoj miješalici 15-ak sekundi.

2. korak

U svaku tubicu dodaje se po 200 μ L pufera AL-a, dobro promiješa na vrtložnoj miješalici a potom inkubira u vodenoj kupelji 10 minuta (na 56°C).

3. korak

U svaku tubicu dodaje se po 200 μ L etanola (96 – 100 %) i dobro promiješa na vrtložnoj miješalici.

4. korak

Smjese iz tubica prenose se pipetom u nove tubice za centrifugiranje (2mL) umetnute u tubice za sakupljanje. Centrifugirati jednu minutu pri $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Filtrate u tubicama za centrifugiranje prebaciti u nove tubice za sakupljanje.

5. korak

Dodaje se 500 μ L pufera AW1, centrifugirati jednu minutu pri $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Filtrate ponovo prebaciti u novu tubicu za sakupljanje.

6. korak

Dodaje se 500 μ L pufera AW2 i centrifugira tri minute pri 20 000 $\times g$ (14 000 rpm).

7. korak

Prebaciti tubice za centrifugiranje u nove tubice.

8. korak

S 200 μ L pufera AE-a eluirati DNK iz tubica za centrifugiranje, izvaditi tubice za centrifugiranje iz tubica za sakupljanje i baciti.

Preostale tubice za sakupljanje potom staviti na inkubiranje jednu minutu pri sobnoj temperaturi (15-25°C).

Zadnji put centrifugirati jednu minutu pri $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm).

3.2.2. Umnažanje mitohondrijskog gena *cyt-b* lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Izolirani genski materijal pripremljen u prethodno opisanom protokolu, stavlja se u tubice za PCR i započinje postupak umnažanja mitohondrijskog gena *cyt-b* lančanom reakcijom polimerazom.

Protokol PCR-ciklusa

94°C	3 min	}	35 x
92°C	45 s		
48°C	90 s		
72°C	01:45 min		
72°C	7 min		

Lančana reakcija polimerazom omogućuje umnažanje određenog dijela DNK kalupa *in vitro* (Alberts i sur., 2002; Brown i sur., 2002). Poznajući nukleotidni slijed u blizini 5' i 3'- dijela DNK koji se želi umnožiti, konstruiraju se oligonukleotidne početnice (*forward* i *reverse* početnica). PCR se sastoji od više ciklusa, a svaki se ciklus sastoji od denaturacije, prijanjanja početnica i produljivanja lanaca

Svaki lanac denaturirane DNK služio je kao kalup za reakciju pa se tijekom jednog ciklusa broj kopija željenog dijela DNK udvostruči sve dok se jedan od sastojaka reakcije ne iscrpi. Broj se kopija umnoženih fragmenta povećava eksponencijalno, a nakon 20 ciklusa dobiva se oko milijun kopija. Dobivene PCR-fragmente provjerila sam elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu.

3.2.3. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza je proces kojim se mogu razdvojiti fragmenti DNK i utvrditi njihove veličine prema veličinama fragmenata koje su već poznate. Radi na principu električnog polja u kojemu se molekule DNK kreću od katode (negativan pol) prema anodi (pozitivan pol), gdje će kraći i manji fragmenti putovati brže (npr. spiralno uvijeni fragmenti DNK), a duži lančasti i linearni fragmenti DNK kretat će se sporije kroz agarozni gel. Sama koncentracija agaroze te jačina električnog polja utječu na brzinu kretanja fragmenata.

Gel za elektroforezu pripremila sam otapanjem 1g agaroze u 100mL TAE-puferu, smjesu sam izlila u kalup i postavila tzv. češljic koji oblikuje jažice u koje se nanose uzorci. Kada se gel dovoljno stvrdnuo, nanosila sam u svaku jažicu po 4 μ L uzorka i 2 μ L boje, a u posljednju jažicu sam nanijela molekularni marker kako bi se moglo pratiti kretanje fragmenata. Tako pripremljeni gel prenijela sam u kadicu za elektroforezu. Elektroforeza se također provodila u istom TAE-puferu pri konstantnom naponu od 110V na 30 minuta. Nakon završetka gel je stavljen u otopinu etidij bromida na 20minuta, potom izvađen i stavljen na transiluminator te sam ga fotografirala.

3.2.4. Određivanje primarne strukture molekule DNK (sekvenciranje)

Umnoženi fragmenti gena *cyt-b* dobiveni iz prikupljenih uzoraka poslani su na određivanje primarne strukture molekula DNK u *Macrogen Inc.* (Amsterdam, Nizozemska <https://dna.macrogen.com/>).

3.2.5. Računalne analize nukleotidnih sljedova

Nakon što je određena primarna struktura molekule DNK, dobivene sam nukleotidne sljedove sastavila i sravnila pomoću računalnoga programa *BioEdit* v7.2.5 (Hall, T.A., 1999) (<http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Sekvence su pregledane vizualno kako bi provjerili da nema insercija, delecija ni stop kodona. Dobivene su sekvence potom filogenetski analizirane primjenom programa *PAUP 4.0.10* („pop star“, phylogenetic analysis using parsimony) (Swofford, 1998). Taj program omogućuje provođenje filogenetskih analiza na temelju triju metoda: *maximum parsimony* („maksimalna parsimonija“), *distance* („udaljenost“) i *maximum likelihood* („najveća vjerojatnost“) (Mount, 2001). Važno je napomenuti da svaki program ima karakterističan format u kojemu sravnjene sekvence moraju biti. Za PAUP* je to NEXUS format. Za

potrebe ovog rada korištene su metode maksimalne parsimonije i najveće vjerojatnosti. Bayesova analiza provedena je koristeći program MrBayes 3.2. U filogenetske analize uključena su tri haplotipa vrste *Sq. squalus* iz rijeka Vipava (Slovenija) i Arno (Italija) preuzeta iz banke gena (*Squalius squalus* Vipava i *Squalius squalus* Arno) dok vanjsku grupu (eng. out group) čine *Leuciscus cephalus* (Linnaeus, 1758), *Rutilus basak* (Heckel, 1843) i *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758).

Pristupni kod za *Sq. squalus* Vipava je HM560204, a za *Sq. squalus* Arno HM560205 (Perea i sur., 2010).

Metoda maksimalne parsimonije (eng. *maximum parsimony*)

(MP)(Mount, 2001)

Tom se metodom određuje evolucijsko stablo za koje je potreban najmanji broj koraka potrebnih za prikazivanje uočenih razlika u sekvencama. Stoga se ona još i naziva *minimum evolution method* (Mount, 2001). Izračunava se najmanji broj nukleotidnih supstitucija kojima se objašnjava cjelokupni evolucijski proces (Nei, 1996). Ova metoda se najčešće upotrebljava kada su sekvence međusobno vrlo slične ili se uspoređuje mali broj sekvenci (potrebno je dosta vremena za obradu podataka). Parsimonijsko stablo se opisuje indeksom konzistencije (CI), indeksom retencije (RI) i indeksom homoplazije (HI). Sva tri indeksa spadaju u statističke mjere homoplazije. Kada taksoni imaju isto svojstvo koje ne potječe od zajedničkog pretka, već su posljedica konvergentne ili reverzne evolucije, govorimo o homoplaziji (West-Eberhard, 2003). Dakle, kada je $CI = 1$ tada je svojstvo evoluiralo savršeno parsimonično, odnosno bez homoplazije (Kluge i Farris, 1969). Vrijednost ovog indeksa se približava nuli (0), kada se broj homoplazija povećava. RI indeks mjeri stupanj potencijalne sinapomorfности. Sinapomorfna svojstva su izvedena svojstva u odnosu na početno stanje, ali slična kod različitih taksona iz grupe i spadaju u informativna svojstva. Vrijednost $RI = 1$ govori da je svojstvo potpuno u skladu sa filogenijom, a $RI = 0$ predstavlja maksimalni iznos homoplazije. Stupanj homoplazije također se može predstaviti pomoću HI indeksa, koji se dobije oduzimanjem $1 - CI$ (Farris, 1989).

- **Metoda maksimalne vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*)**

(ML)(Mount, 2001)

Upotrebljava se u filogenetskim istraživanjima za nalaženje optimalnog seta parametara za stablo i optimalnog modela koji najbolje opisuje postojeće podatke. Filogenetsko stablo opisuje topologiju evolucijskih odnosa između sekvenci, a set grana različite duljine opisuje koliko se evolucijskih događaja odigralo u različitim dijelovima stabla. Model sadržava set parametara koji opisuju evolucijske promjene, npr. stopu tranzicijskih mutacija. U filogenetskim analizama, evolucijsko stablo, tj. njegov oblik, grane i mnogi drugi parametri evolucijskog modela čine hipoteze. ML vrednuje hipoteze (stabla i parametre) selektiranjem onih koji imaju najveću vjerojatnost.

- **Bayesova analiza (eng. *Bayesian analysis*)**

(BA)(Mau i sur., 1999)

Bayesovaje analiza relativno nova metoda stanja karaktera, a temelji se na spoznaji o tzv. naknadnim vjerojatnostima (eng. *posterior probabilities*), tj. vjerojatnostima koje su procijenjene na osnovi nekog evolucijskog modela (eng. *prior expectation*). Koristi evolucijski model, koji se temelji na prijašnjim vjerojatnostima, kako bi napravio najvjerojatnije filogenetsko stablo za dobivene podatke. Stablo koje ima najveće vrijednosti „naknadnih vjerojatnosti“ je ono koje je najvjerojatnije i takvo stablo će biti izdvojeno kao najtočnije.

Program MrBayes (MrBayes 3.2, Buckley i sur., 2002; Ronquist i Huelsenbeck, 2003) koristi Markov Chain Monte Carlo (MCMC) pristup za traženje stabala. Sastoji se od dviju faza. Prva faza pod nazivom *burn-in*obično je heurističko pretraživanje u kojemu program istražuje parametar i pronalazi hipoteze (stabla i parametre) koje su najbliže najvjerojatnijim rezultatima (*maximum likelihood*). Tijekom te faze vjerojatnost pronalaska odgovarajućih stabala se povećava. U drugoj fazi, pod nazivom „stacionarna faza“, program istražuje parametar i pronalazi hipoteze oko najvjerojatnijih rezultata. Tijekom te faze vrijednosti vjerojatnosti pronalaska odgovarajućih hipoteza (stabala) varira oko srednje vrijednosti.

Statistička testiranja filogenetskih stabala–određivanje podržanosti (*bootstrapping*)

Statistički testovi za filogenetska stabla se mogu podijeliti u dvije grupe: testovi pouzdanosti dobivenog stabla i testovi razlika u topologiji između dva ili više različitih stabala dobivenih iz istog seta podataka; tj. provodi se testiranje modela (Nei, 1996).

Bootstrapping spada u najjednostavniji test za filogenetska stabla. Ovom se metodom testira da li cijeli set podataka podupire stablo ili je dobiveno stablo krajnji izabranik između većega broja gotovo jednakih alternativnih stabala. To se postiže uzimanjem nasumičnih poduzoraka iz seta podataka, izradom stabala na osnovi svakog od ovih nasumičnih poduzoraka i izračunavanjem učestalosti s kojom se različiti dijelovi stabla reproduciraju u svakom od nasumičnih poduzoraka (Baldauf, 2003). Visoke vrijednosti dobivene metodom podržanosti znače da je stablo pouzdano.

4. REZULTATI

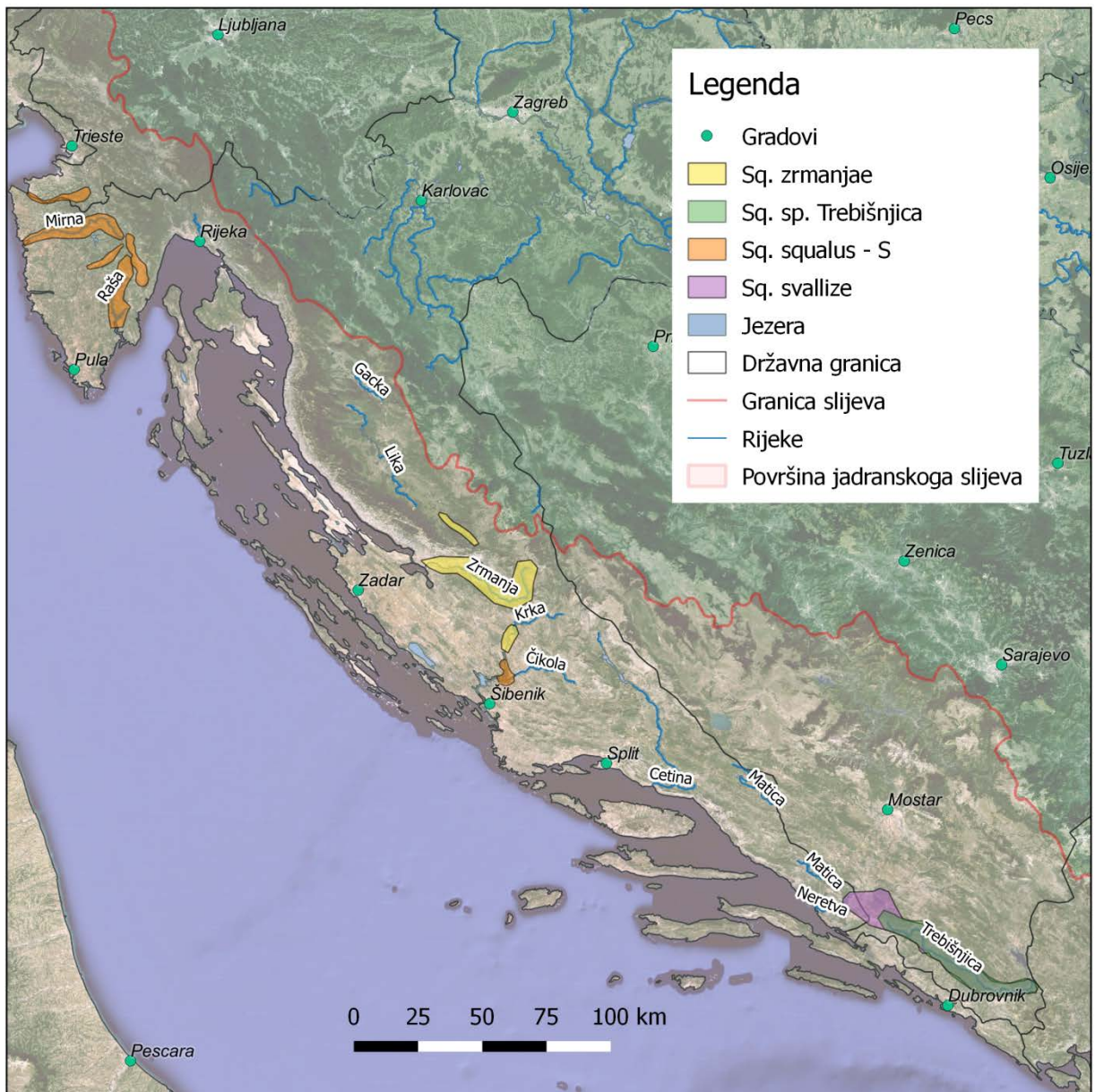
4.1. Broj i rasprostranjenost haplotipova

U ukupnom uzorku od 129 sekvenci dobivenih iz uzoraka sa 19 lokaliteta pronađen je 31 haplotip. Uz ove haplotipove u filogenetske analize uključena su i tri haplotipa vrste *Sq. squalus* preuzeta iz banke gena (*Squalius squalus* Vipava i *Squalius squalus* Arno) dok vanjsku grupu (eng. out group) čine *Leuciscus cephalus* (Linnaeus, 1758), *Rutilus basak* (Heckel, 1843), *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). U tablici 2. dan je prikaz kodova haplotipova nađenih u uzorcima pojedine vrste te područja na kojima su rasprostranjeni.

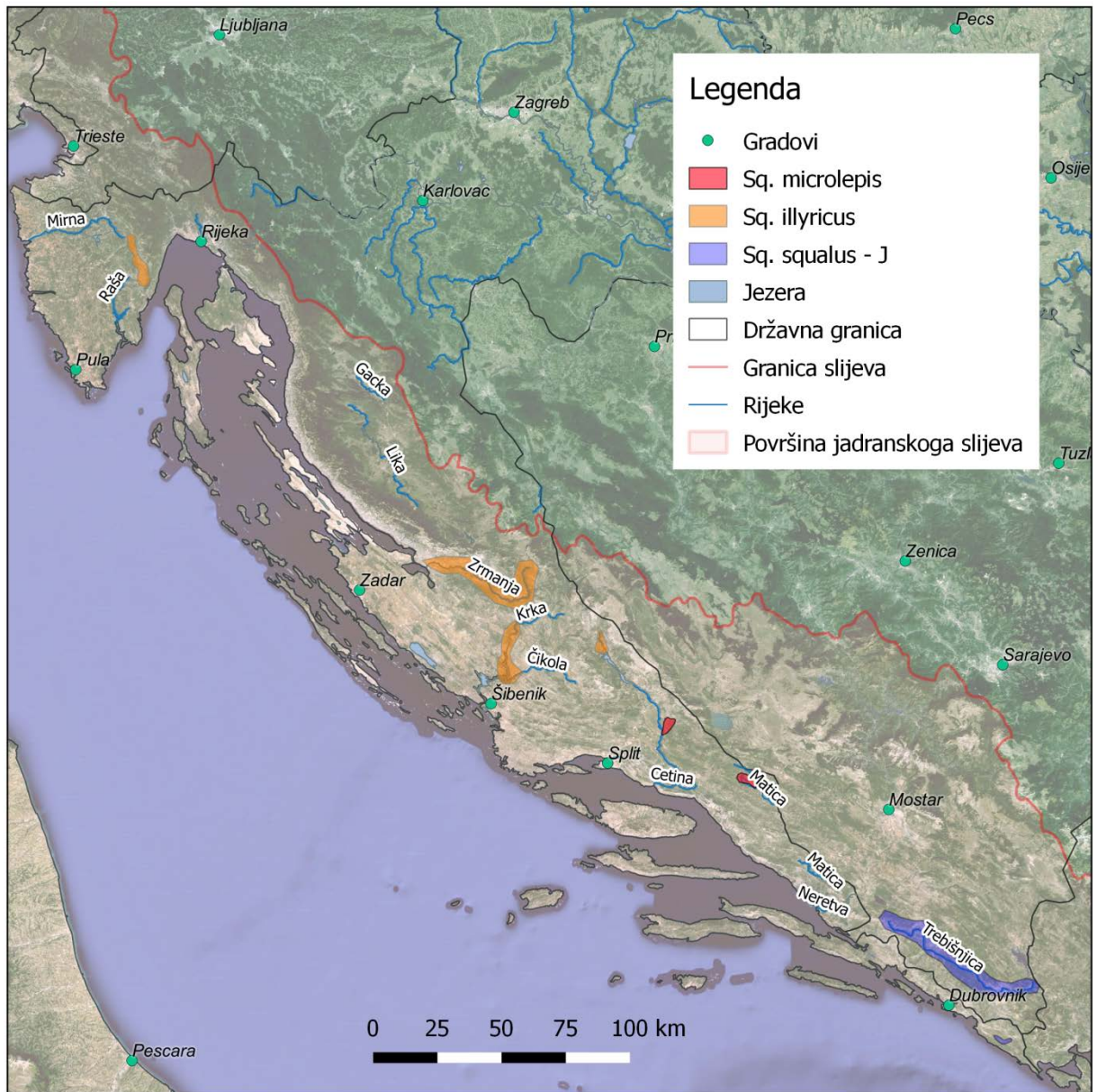
Tablica 2. Prikaz kodova haplotipova *Squalius* po vrstama, broju uzoraka u kojim su haplotipovi pronađeni i području rasprostranjenosti

VRSTA	KODOVI HAPLOTIPOVA	BROJ UZORAKA U KOJIMA SU PRONAĐENI HAPLOTIPOVI	PODRUČJE RASPROSTRANJENOSTI HAPLOTIPOVA
<i>Sq. svallize</i>	SVA1, SVA2, SVA3, SVA4, SVA5	22	Neretva (Metković), Hutovo blato, Trebišnjica, Ravno
<i>Sq. zrmanjae</i>	ILI4, ZRM1	5	Zrmanja, Ričica (Lika), Krka (Arhandelovac)
<i>Sq. illyricus</i>	ILI1, ILI2, ILI6, ILI7 ILI3, ILI5	25	Vinalić, Krka (Visovac), Krka (Arhandelovac), Zrmanja, Boljunčica
<i>Sq. microlepis</i>	MIC1, MIC3, MIC2, MIC4	5	Vrljika, Prološko blato, Ruda
<i>Sq. squalus</i> – sjever	VIS1, VIS2, VIS3, IST1, IST2, IST3, IST4, IST5	41	Visovac, Raša, Pazinčica, Mirna, Dragonja, Boljunčica, Borutski potok

<i>Sq. squalus</i> –jug	LJUT1, LJUT2, LJUT3, TRE3	26	Ravno, Trebišnjica, Ljuta
<i>Sq.sp.</i> Trebišnjica	TRE2, TRE1	5	Trebišnjica, Ravno



Slika 7. Prikaz geografske rasprostranjenosti haplotipova vrsta *Sq. zrmanjae*, *Sq. sp. Trebišnjica*, *Sq. squalus*- s i *Sq. svallize* (preuzeto sa www.google.hr/maps i doradeno uz pomoć programskog paketa Qgis 2.14.)



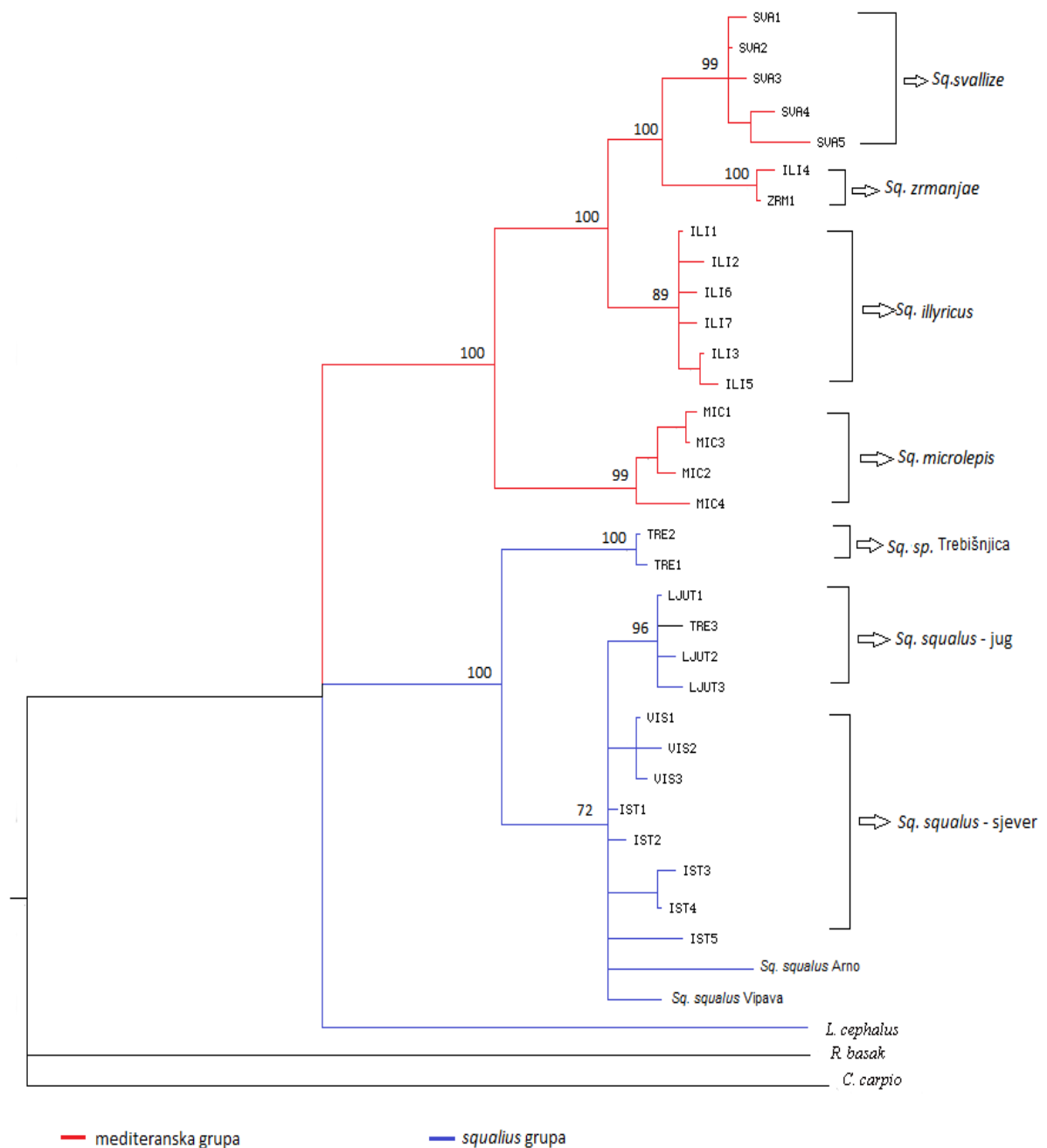
Slika 8. Prikaz geografske rasprostranjenosti haplotipova vrsta *Sq. microlepis*, *Sq. illyricus* i *Sq. squalus-j* (preuzeto sa www.google.hr/maps i doradeno uz pomoć programskog paketa Qgis 2.14.)

Haplotipovi vrste *Sq. svallize* rasprostranjeni su na području rijeka Neretve, Hutovog blata, Trebišnjice i Ravnog (Slika 7.). U 22 uzorka pronađeno je 5 haplotipova (Tablica 2.) čiji su kodovi SVA1, SVA2, SVA3, SVA4 i SVA5. Haplotipovi vrste *Sq. zrmanjae* rasprostranjeni su na području rijeka Zrmanje, Ričice (Lika) i Krke (Slika 7.), prisutna su 2 haplotipa označena kodovima ILI4 i ZRM1 (Tablica 2.) koji su pronađeni u 5 uzoraka. *Sq. illyricus* čijih je 6 haplotipova (ILI1, ILI2, ILI6, ILI7, ILI3, ILI5) (Tablica 2.) pronađeno u 25 uzoraka riba, rasprostranjen je na području Vinalića, Krke (Visovac i Arhandelovac), Zrmanje i Boljunčice (Slika 8.). U 5 uzoraka pronađena su 4 haplotipa vrste *Sq. microlepis* (MIC1, MIC2, MIC3, MIC4) (Tablica 2.) koji nastanjuje vodotoke Vrljike, Prološkog blata i Ruda (Slika 8.).

Sq. squalus zastupljen je sa najviše haplotipova i to njih 8 koji pripadaju *Sq. squalus*- sjever (čiji su kodovi VIS1, VIS2, VIS3, IST1, IST2, IST3, IST4 i IST5) (Tablica 2.) i nastanjuju područja Visovca, Raše, Dragonje, Pazinčice, Mirne i Boljunčice (Slika 7.). Četiri haplotipa vrste *Sq. squalus*- jug čiji su kodovi LJUT1, LJUT2, LJUT3 i TRE3 (Tablica 2.) pronađeni su u 26 uzoraka riba koje nastanjuju područja Ravnog, Trebišnjice i Ljute (Slika 8.). Dva haplotipa TRE1 i TRE2 (Tablica 2.) koji do sada nisu bili primijećeni pronađeni su na području Trebišnjice i Ravnog (Slika 7.).

U rijekama koje su u literaturi navedene kao područje rasprostranjenosti nedavno opisane vrste *Sq. janae* (Dragonja, Pazinčica, Boljunčica, Mirna, Raša (Zupančić i sur., 2010)) nisu nađeni posebni haplotipovi, već se radi o šire rasprostranjenim haplotipovima vrste *Sq. squalus*.

4.2. Rezultati filogenetske rekonstrukcije metodom maksimalne parsimonije (MP)



Slika 9. Filogenetsko stablo haplotipova dobiveno metodom maksimalne parsimonije. Brojevi pokraj čvorova pokazuju vrijednosti podržanosti.

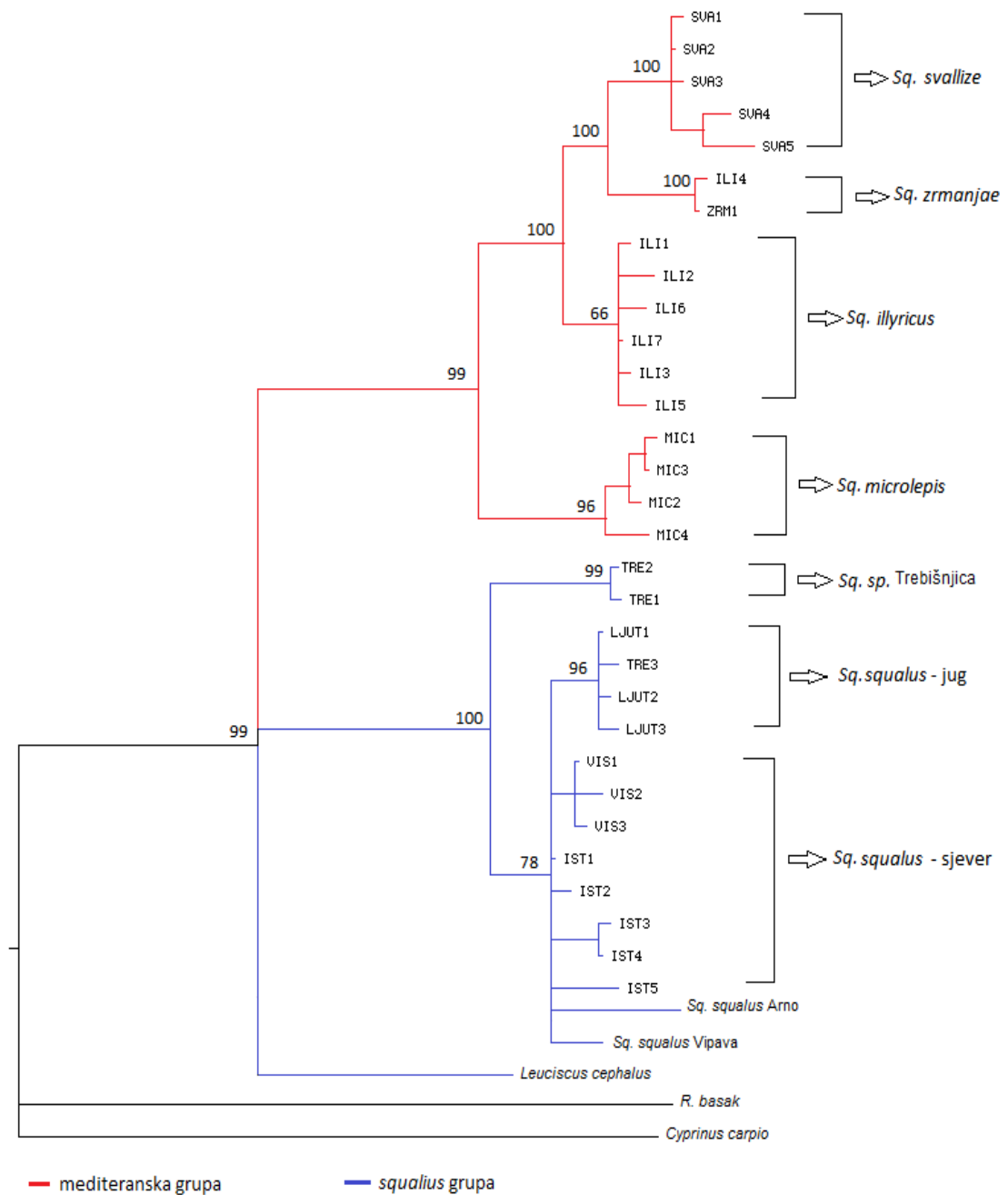
Metodom najveće parsimonije dobiveno je filogenetsko stablo (Slika 9.) duljine 523, indeksa konzistencije (CI) 0,7208, indeksa homoplazije (HI) 0,2792 i indeksa retencije (RI) 0,9042.

Od sveukupnih 1140 baza 816 je stalno (isto u svim haplotipovima), ostale 324 su varijabilne. Pri tome je 177 parsimonijski informativnih mjesta, a 147 parsimonijski neinformativnih.

Na osnovi dobivenoga stabla (Slika 9.) vidljivo je da su haplotipovi klenova iz istraživanih područja grupirani u dvije glavne grupe: *Sq. svallize*, *Sq. zrmanjae*, *Sq. illyricus*, *S. microlepis* koje čine mediteransku grupu i *Sq. squalus* (*Sq. squalus*-jug i *Sq. squalus*-sjever koji podrazumijeva vrste *Squalius squalus* i *Squalius janae*) koji čine *squalus* grupu. Mediteranska grupa je podijeljena u četiri linije: *Sq. svallize*, *Sq. zrmanjae*, *Sq. illyricus* i *Sq. microlepis*. *Squalus* grupu čini jedna linija: *Sq. squalus*-jug i *Sq. squalus*-sjever. Haplotip *Sq. sp.* Trebišnjica naveden je kao posebna linija premda do sada nije bio zabilježen na tom području, s obzirom da je ovo prvo detaljno molekularno istraživanje na klenovima tog područja takav rezultat i nije neočekivan. Bilo bi potrebno i poželjno provesti posebno istraživanje na tu temu. Iz filogenetskog stabla je vidljiva najveća srodnost između vrsta *Sq. svallize* i *Sq. zrmanjae* koje predstavljaju sestrinske vrste.

Prikazani brojevi na čvorištima stabla predočuju postotke „bootstrapping“ vrijednosti ponavljanja grana u 100 ponavljanja. Vrijednosti pokazuju veliku podržajnost stabla.

4.3. Rezultati filogenetske rekonstrukcije metodom maksimalne vjerojatnosti (ML)

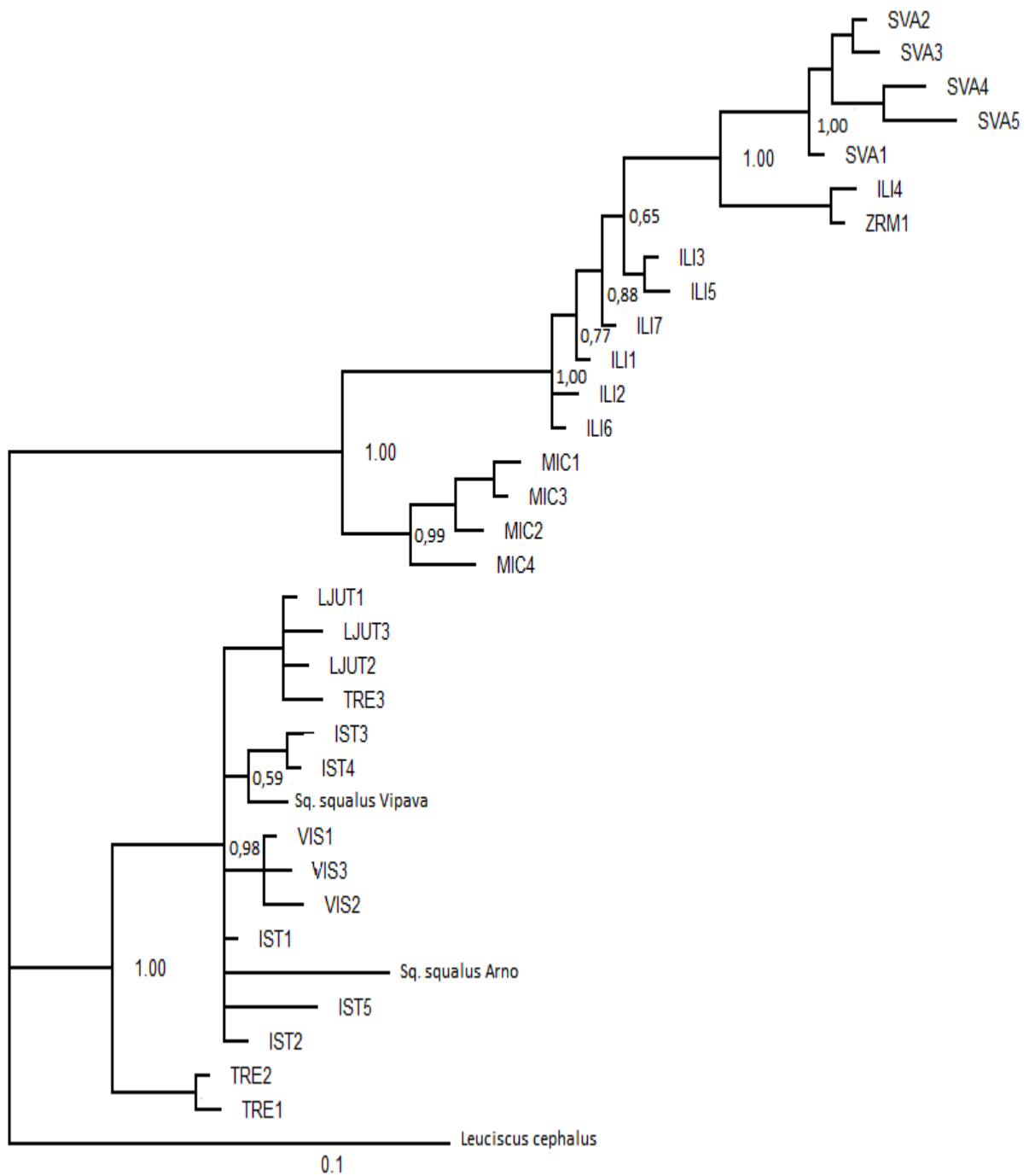


Slika 10. Filogenetsko stablo haplotipova dobiveno metodom maksimalne vjerojatnosti. Brojevi pokraj čvorova pokazuju vrijednosti podržanosti.

Metodom maksimalne vjerojatnosti dobiveno je filogenetsko stablo (Slika 10.), duljina stabla je 4179.87159. Od sveukupnih 1400 baza 816 je stalno (isto u svim haplotipovima). Tristo dvadeset i četiri baze su varijabilne, od čega 147 parsimonijski neinformativnih, a 177 parsimonijski informativnih.

Dobiveni rezultati (Slika 10.) jednaki su rezultatima metode maksimalne parsimonije, brojevi na čvorištima grana (prikazuju podržanost stabla) nešto su manji nego kod stabla dobivenog ML metodom ali unatoč tome vrijednosti upućuju nato kako je većina grananja vrlo vjerojatna.

4.4. Rezultati bayesove analize



Slika 11. Filogenetsko stablo haplotipova dobiveno bayesovom analizom. Brojevi pokraj čvorova pokazuju vrijednosti podržanosti.

Rezultati dobiveni bayesovom analizom (Slika 11.) potvrđuju prethodno dobivene rezultate metodama maksimalne podržanosti i maksimalne vjerojatnosti. Prikazani brojevi na čvorištima stabla predočuju postotke „bootstrapping“ vrijednosti ponavljanja grana u 100 ponavljanja.

4.5. Genska udaljenost

Tablica 3. Prikaz vrijednosti genske udaljenosti između pojedinih vrsta i linija, broj ispred zgrade prikazuje srednju vrijednost (podatci u zagradama prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti)

Interspecijska	<i>Sq. svallize</i>	<i>Sq.zrmanjae</i>	<i>Sq.illyricus</i>	<i>Sq.microlepis</i>	<i>Sq. squalus-S</i>	<i>Sq. squalus-J</i>
<i>Sq. svallize</i>						
<i>Sq.zrmanjae</i>	1,5 (1,1-1,8)					
<i>Sq.illyricus</i>	2,3 (1,8-2,6)	2,2 (2,0-2,4)				
<i>Sq.microlepis</i>	4,9 (4,5-5,4)	4,9 (4,7-5,1)	3,9 (3,7-4,2)			
<i>Sq. squalus-S</i>	8,6 (8,2-9,1)	8,4 (8,2-8,6)	8,1 (7,7-8,4)	6,5 (6,1-6,9)		
<i>Sq. squalus-J</i>	8,7 (8,3-9,0)	8,5 (8,3-8,6)	8 (7,8-8,2)	6,5 (6,3-6,7)	0,8 (0,4-1,6)	
<i>Sq.sp. trebišnjica</i>	8,6 (8,3-9,0)	8,3 (8,2-8,3)	8,2 (8,1-8,3)	7 (6,8-7,1)	2 (1,7-2,5)	2,2 (2,0-2,4)

Iz podataka (Tablica 3.) vidljivo je da je najveća genska udaljenost između filogenetske linije *Sq. squalus-J* i *Sq. svallize* (8,7(8,3-9,0)), što nam govori da je njihova srodnost najmanja, gotovo jednak je odnos genske udaljenosti između *Sq. squalus-S* i *Sq. svallize* (8,6(8,2-9,1)).

Najmanja je genska udaljenost (0,8(0,4-1,6)) između *Sq.squalus-J* i *Sq.squalus-S*, a rezultat je očekivan s obzirom na to da je riječ o istoj vrsti koja je na različitim geografskim lokacijama. Grananja filogenetskih stabala također upućuju na ove rezultate. Osim tih podataka, s obzirom na to da je riječ o istoj vrsti, najmanja je genska udaljenost (1,5(1,1-1,8)) među vrstama *Sq. zrmanjae* i *Sq. svallize*.

Iz ovih rezultata (Tablica 3.) kao i iz stabala jasno je vidljivo da se vrsta *Sq. squalus* genetski veoma razlikuje od vrsta mediteranske grupe, dok su unutar mediteranske grupe genetski najbliži *Sq. zrmanjae* i *Sq. svallize*, a najviše se razlikuje *Sq. microlepis*.

Tablica 4. Prikaz vrijednosti intraspecijske genetičke udaljenosti, broj ispred zagrade označuje srednju vrijednost (brojevi u zagradama prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti).

Intraspecijska	
<i>Sq.svallize</i>	0,5(0,1-0,8)
<i>Sq.zrmanjae</i>	0,1
<i>Sq.illyricus</i>	0,2(0,1-0,4)
<i>Sq.microlepis</i>	0,5(0,1-0,8)
<i>Sq. squalus-S</i>	0,6(0,1-0,7)
<i>Sq. squalus-J</i>	0,2(0,1-0,4)
<i>Sq. sp.</i> Trebišnjica	0,1

Gledajući rezultate intraspecijske genetske udaljenosti navedene u tablici 4. najveća raznolikost je unutar linije *Sq. squalus-S* koja iznosi 0,6(0,1-0,7) dok vrste unutar mediteranske filogenetske grupe pokazuju manje vrijednosti (*Sq. zrmanjae* (0,1)) to jest niži stupanj intraspecijske raznolikosti. Intraspecijska raznolikost unutar svih vrsta, kao i ona unutar linija vrste *Sq. squalus* znatno je manja od njihove interspecijske raznolikosti.

5. RASPRAVA

5.1. Rasprostranjenost haplotipova

Rasprostranjenost haplotipova koji pripadaju pojedinoj vrsti roda *Squalius* utvrđena ovim istraživanjem ne poklapa se u potpunosti s literaturnim podacima o arealima pojedinih vrsta, što ima veliku važnost za točno utvrđivanje rizika od izumiranja pojedinih vrsta te predlaganje adekvatnih konzervacijskih programa, ali i ukazuje na važnost molekularnih metoda za rješavanje taksonomskih nedoumica.

U dosadašnjim je istraživanjima vrsta *Sq. svallize* smještena na područje Neretve, Hutova blata, Trebišnjice, rijeke Matice (Bogutskaya i Zupančić, 1999), rijeke Ljute (Kosić, 1903) te na području istarskog poluotoka (Mirna, Raša, Boljunčica, Pazinčica, Rakov potok) (Leiner i sur., 1995) međutim s obzirom na taksonomske nedoumice, odnosno vrste koje su zabilježene na području Istre su također determinirane i kao *Sq. zrmanjae*, *Sq. illyricus* i *Sq. svallize* (Leiner i Popović, 1984; Leiner i sur., 1995) pa prema tome podatak da vrsta *Sq. svallize* nastanjuje područje istarskog poluotoka nije pouzdan (Bogutskaya i sur. 1999). Rezultati ovog istraživanja ne odgovaraju u potpunosti prethodno navedenim podacima. Svi haplotipovi sakupljeni na području rijeke Ljute pripadaju vrsti *Sq. squalus*-J, taj rezultat je neočekivan s obzirom da se rijeka Ljuta navodi kao stanište vrste *Sq. svallize* (Kosić, 1903). Moguće je da je došlo do krive identifikacije ali je vjerojatnije da je došlo do hibridizacije i introgresije. Fenomeni hibridizacije i introgresije već su zabilježeni unutar potporodice Leuciscinae (Durand i sur., 2000) te se navode kao važan evolucijski proces koji omogućuje bolju prilagodbu vrsta na stanište kao i bogatstvo raznolikosti i endemizma. Djelomično preklapanje staništa *Sq. svallize* i *Sq. squalus*- J (Tablica 1.) idu u prilog tome a također navodi na mogućnost da je došlo do parapatrijske specijacije s obzirom na prisutnost više različitih evolucijskih jedinica na istom lokalitetu. Rezultati potvrđuju prisutnost *Sq. svallize* na području Neretve, Hutova blata, Ravnog i rijeke Trebišnjice. U Neretvi i Hutovu blatu *Sq. svallize* je jedina vrsta klena tamo prisutna, dok u Trebišnjici i Ravnom kohabitira s vrstom *Sq. squalus*-J.

Osim u Zrmanji i Krki vrsta *Sq. zrmanjae* također je pronađena na području Like (rijeka Ričica). Međutim, malo je vjerojatno da je rijeka Ričica prirodno stanište zrmanjskoga klena jer nikad prije nije tamo zabilježen. Mogući uzrok tomu jest da je došao na područje Ričice preko voda s hidroelektrane Obrovca. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pobijaju podatke da je *Sq. zrmanjae* jedina vrsta klena koja naseljava

područje rijeke Zrmanje (Bogutskaya i Zupančić, 1999) jer je na tom području pronađen također i haplotip *Sq. illyricus*. Više autora (Kolombatović, 1907; Vuković i Ivanović, 1982; Vuković, 1982) navode rijeku Krupu koja je pritoka Zrmanje, kao stanište ilirskog klena. Ti podaci su opovrgnuti s obzirom da u novije vrijeme nije potvrđena prisutnost ilirskog klena u rijeci Zrmanji niti u Krupi. Ono što je moguća teorija je da je došlo do hibridizacije ili introgresije pa je prema tome *Sq. zrmanjae* doista jedini klen u rijeci Zrmanji s tim da pojedine jedinke imaju mitohondrijsku DNK ilirskog klena.

Squalius illyricus prema dosadašnjim podacima naseljava rijeke Cetinu i Krku (Kottelat i Freyhof, 2007; Mrakovčić i Mišetić, 1989). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju te podatke. Osim u navedenim rijekama, ilirski klen navodno je pronađen i u Zrmanji i Boljunčici (Vuković i Ivanović, 1971; Vuković, 1982), međutim ti navodi nisu pouzdani s obzirom da u novije vrijeme u rijeci Zrmanji nije zabilježena ni jedna jedinka vrste *Sq. illyricus*. U rijeci Cetini *Sq. illyricus* je jedina vrsta klena tamo prisutna (što odgovara podacima Bogutskaya i Zupančić, 1999). Haplotipovi s područja rijeke Boljunčice zabilježeni u ovom radu nisu očekivani, međutim moguće je da, ukoliko ih ima, potječu od vrsta ilirskog klena koje su primijećene u rijeci Soči u Sloveniji prije 150 godina (Heckel i Kner, 1858), mnogi drugi autori (Gunter, 1868; Seeley 1886; Munda, 1926; Gridelli, 1936; Taler, 1953; Vuković i Ivanović, 1971; Ristić, 1977) navode da je *L. illyricus* prisutan u rijeci Soči ali su se vjerojatno oslanjali na podatke Hackela i Knera (1858) koji nisu pouzdani. Ti podatci upućuju na to da je ili rasprostranjenost ilirskoga klena nekada bila mnogo veća ili su pak taksonomska nepotpunost i nepouzdanost navele na krivu identifikaciju vrste. Također su degradacija staništa i unos alohtonih vrsta mogli odigrati veliku ulogu u smanjenju rasprostranjenosti.

Squalius microlepis pronađen je na području jezera Prološko blato i u rijekama Vrljika i Ruda. Unatoč starijim podacima koji navode prisutnost *Sq. microlepis* u Neretvi (Kottelat i Freyhof, 2007; Mrakovčić i sur., 2006) ovim istraživanjem to nije potvrđeno. Možda je to puka slučajnost jer se navodi kao česta vrsta (Mrakovčić i sur., 2006), vjerojatno je razlog to što sama Neretva za ovo istraživanje nije detaljnije uzrokovana. Također onečišćenje, izlov i unos alohtonih vrsta pridonose smanjenju broja jedinki na tom području.

Rasprostranjenost klena vrste *Sq. squalus*, kao i njegov taksonomski status i danas nisu posve jasni. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem potvrđuju njegovu prisutnost u rijekama istarskog poluotoka (Dragonja, Raša, Pazinčica, Borutski potok - gdje je jedina prisutna vrsta klena, Mirna i Boljunčica), rijekama Krki (Visovac), Trebišnjici, Ravno i

Ljutoj (haplotipovi vrste *Sq. squalus* pronađeni u rijeci Ljutoj vjerojatno su posljedica hibridizacije i introgresije s obzirom da je rijeka Ljuta inače prirodno stanište vrste *Sq. svallize*). Nije pronađen u rijekama Zrmanji, Cetini, Vrljiki i Prološkom blatu. Također nije pronađen u glavnim tokovima Neretve i Krke, nego samo u Visovcu, Trebišnjici i Ravnom.

Ovim je istraživanjem utvrđena prisutnost još jedne filogenetske linije u Trebišnjici i Ravnom (*Sq.sp.* Trebišnjica) osim vrste *Sq. svallize* i *Sq. squalus*. Dva nova haplotipa TRE1 i TRE2 (Tablica 2.) sa područja rijeke Trebišnjice i Ravnog čine odvojenu liniju (Slika 9., Slika 10.) koja možebitno predstavlja zasebnu taksnonomsku jedinicu. Vjerojatno je da su ti haplotipovi i prije bili prisutni na tom području ali nisu zabilježeni. Samim time potrebno je naglasiti važnost molekularnih metoda i filogenetskih analiza u istraživanjima flore i faune te očuvanju bioraznolikosti.

Geografske karakteristike jadranskoga slijeva, koje podrazumijevaju krš i nepremostive barijere između sljevova upućuju na alopatrijsku fragmentaciju staništa, odnosno na alopatrijsku specijaciju većine klenova opisanih u ovom radu. Također alopatrijska fragmentacija pogodovala je visokom stupnju endemizma na području jadranskoga slijeva. U prilog tome idu podatci o rasprostranjenosti vrste *Sq. illyricus* koji je jedina vrsta klena prisutna u rijeci Cetini (Bogutskaya i Zupančić, 1999), također rasprostranjenost *Sq. microlepis* je ograničena na rijeke Vrljiku, Maticu i Prološko blato. Najvjerojatniji razlog tome je geografija jadranskoga slijeva bogatog kršom koji tvori fizičke barijere i omogućava prostornu razdvojenost vrsta. Ipak, prisutnost različitih evolucijskih jedinica na istom lokalitetu ukazuje na to da se vjerojatno dogodila i parapatrijska specijacija na području slijeva rijeke Neretve, koja je uzrokovala nejednak protok gena te porast dimorfizma između populacija. Djelomično preklapanje staništa vrsta *Sq. svallize* i *Sq. squalus*-J upućuje na mogućnost parapatrijske specijacije popraćene hibridizacijom i introgresijom što objašnjava haplotipove vrste *Sq. squalus*-J u rijeci Ljutoj premda je ta rijeka prirodno stanište vrsti *Sq. svallize*.

5.2. Filogenija

Filogenetskom analizom 129 haplotipova dobivenih iz uzoraka riba roda *Squalius* dobivena su filogenetska stabla koja pokazuju grupiranje uzoraka u dvije grupe: mediteransku i *squalius* grupu te šest linija (Slika 9., Slika 10.). Raščlamba na dvije grupe u skladu je sa rezultatima drugih autora (Perea i sur., 2010) koji navode tri grupe unutar roda *Squalius*: mediteransku (obuhvaća vrste iz Španjolske, središnje Italije, Balkana i južne Grčke), euroazijsku (rasprostranjena u srednjoistočnoj Europi, Aziji i sjevernom Mediteranu) i crnomorsku grupu (Crno more i Anatolija). S obzirom da je ovo istraživanje ograničeno na područje jadranskoga slijeva osim mediteranske grupe uvedena je i *squalius* grupa kako bi se dobili precizniji rezultati.

S obzirom na podrijetlo klenova na području jadranskoga slijeva, rezultati ove filogenetske analize ukazuju na to da klenovi ovog područja ne predstavljaju monofiletsku grupu. Dvije odvojene grupe (mediteranska i *squalius*) upućuju na to da je područje jadranskoga slijeva kolonizirano barem dva puta kroz prošlost, što je u skladu sa podacima drugih autora (Perea i sur., 2010) koji predlažu parafiletsko podrijetlo klenova sa područja jadranskoga slijeva. Sanjur i suradnici (2003) opisali su sličnu situaciju na području Pirenejskog poluotoka gdje su također primijetili grupiranje vrsta roda *Squalius* u dvije skupine parafiletskog podrijetla te su također zaključili da se najvjerojatnije dogodila dvostruka kolonizacija. Mogućnost dvostruke kolonizacije zahtjeva daljnja ekološka istraživanja, pogotovo na područjima simpatrije. Mediteranske vrste većinom su rasprostranjene alopatrijski ali vjerojatno je da su u prošlosti dolazile u kontakt što je moglo biti uzrok mogućih hibridizacija i introgresija (pogotovo na području rijeke Ljute, Krke i Zrmanje). Međutim, postoje iznimke u toj alopatriji. Osobito je zanimljivo područje slijeva rijeke Neretve, rijeka Trebišnjica posebno se izdvaja zbog prisutnosti tri skupine haplotipova. Haplotipovi vrsta *Sq. squalus*-J i *Sq. svallize* na istom području, s obzirom da pripadaju dvjema genetski i evolucijski različitim grupama, posebno su zanimljivi u pogledu parapatrijske specijacije. Također prisutnost nove filogenetske linije u Trebišnjici (*Sq.sp.* Trebišnjica) koja do sada nije evidentirana, može upućivati na postojanje još jedne taksonomske jedinice na tom području. S obzirom na navedenu prisutnost različitih evolucijskih jedinica na istom lokalitetu slijev Neretve otvara mogućnost parapatrijske specijacije što svakako zahtjeva detaljnije istraživanje.

5.3. Interspecijska i intraspecijska genska raznolikost

Raspon vrijednosti ukupne interspecijske genske udaljenosti kreće se između vrijednosti 0,8% i 8,7 % (Tablica 3.). Najmanja interspecijska genska udaljenost primijećena je među vrstama *Sq. squalus*-J i *Sq. squalus*-S (0,8(0,4-1,6)) rezultat je očekivan jer se radi o istoj vrsti koja naseljava različite lokacije pa je prema tome i srodnija. Najveću interspecijsku udaljenost pokazuju vrste *Sq. squalus*-J i *Sq. svallize* (8,7(8,3-9,0)) (Tablica3.) s obzirom da je i inače najveća različitost među vrstama koje pripadaju dvjema filogenetskim grupama, a *Sq. squalus* pripada *squalus* grupi a *Sq. svallize* mediteranskoj grupi, ovakav rezultat je očekivan. Vrijednosti intraspecijske genske udaljenosti kreću se u rasponu od 0,1 do 0,6%. najmanja je kod vrste *Sq. zrmanjae* (0,1%) a najveća kod vrste *Sq. squalus* (0,6%) (Tablica 4).

Prema dobivenim rezultatima stupanj genskog polimorfizma, koji je potreban za opstanak svake vrste, nije visok ni kod jedne vrste što je suprotno dosadašnjim podacima o visokom stupnju genskog polimorfizma (Durand i sur., 1999). Genski polimorfizam vrsta *Sq. zrmanjae* i *Sq. microlepis* trebalo bi dodatno provjeriti i potvrditi s obzirom na mali broj uzoraka prikupljenih za ovo istraživanje.

Niska je genska raznolikost *Sq. svallize* (unatoč dovoljnom broju uzoraka) iznenađujuća. Vrsta je rasprostranjena na nekoliko lokaliteta u području koje nije bilo pod utjecajem glacijacije ili drugih nepovoljnih ekoloških uvjeta tako da je moguće da je njegova genska raznolikost u ovom arealu smanjena zbog čovjekova utjecaja. Posljednja su istraživanja otkrila visoku gensku raznolikost drugih vrsta ciprinida rasprostranjenih na istom području. Ovaj rezultat pokazuje mogućnost da su klenovi osjetljiviji na antropološke čimbenike koji utječu na to područje.

Intraspecijska raznolikost vrste *Sq. illyricus*, iako je mnogo veća od raznolikosti vrste *Sq. svallize*, još je uvijek mnogo manja od očekivane s obzirom na šire područje rasprostranjenosti.

Squalius squalus pokazuje umjerenu gensku raznolikost, ali to je najvjerojatnije posljedica intraspecijskog strukturiranja te vrste. Važno je primijetiti da, iako je razina genskog polimorfizma *Sq. squalus* duž istočne obale Jadrana umjerena, genska raznolikost populacija mnogo je manja.

6. ZAKLJUČAK

- Filogenetskom analizom utvrđene su dvije evolucijski neovisne grupe klenova roda *Squalius* u Jadranskom slijevu Hrvatske i Bosne i Hercegovine. Prva grupa - mediteranska, obuhvaća četiri linije, koje odgovaraju vrstama. Prva linijao buhvaća uzorke vrste *Sq. svallize*, druga *Sq. microlepis*, treća *Sq. illyricus* i četvrta *Sq. zrmanjae*. Drugu grupu - *squalus*, čine linije *Sq. squalus-J* i *Sq. squalus-S* koji podrazumijeva vrste *Squalius squalus* i *Squalius janae*. Najveću srodnost među vrstama pokazuju vrste *Sq. zrmanjae* i *Sq. svallizae* koje imaju najmanje vrijednosti interspecijske genetske udaljenosti i nalaze se na sestrijskoj grani filogenetskog stabla. Najmanju srodnost pokazuju vrste *Sq. squalus* i *Sq. svallize* s najvećim vrijednostima interspecijske genetske udaljenosti. Prisutnost dviju genetski i evolucijski različitih grupa na području jadranskoga slijeva ukazuje na mogućnost dvostruke kolonizacije tog područja te na parafiletsko podrijetlo roda *Squalius*.
- Dobiveni podatci upućuju na to da je alopatrijska fragmentacija imala veliku ulogu u ograničenoj rasprostranjenosti vrsta roda *Squalius* i visok stupanj endemizma na području jadranskoga slijeva. U području slijeva Neretve postoji mogućnost i parapatijske specijacije, s obzirom na prisutnost različitih evolucijskih jedinica na istom lokalitetu.
- Rezultati upućuju na nešto drugačiju geografsku rasprostranjenost od očekivane. Primjerice *Sq. zrmanjae* je pronađen u Lici (rijeka Ričica), gdje prije nije bio zabilježen (treba pretpostaviti da mu to nije prirodno stanište). Također se smatralo da je *Sq. zrmanjae* jedini klen prisutan u rijeci Zrmanji, ali je ta pretpostavka dovedena u pitanje jer je pronađen haplotip *Sq. illyricus*. Prisutnost haplotipa *Sq. illyricus* na području rijeke Zrmanje moguća je zbog fenomena hibridizacije ili introgresije pa je prema tome *Sq. zrmanjae* doista jedini klen u rijeci Zrmanji s tim da pojedine jedinice imaju mitohondrijsku DNK ilirskog klena. Osim toga prisutnost *Sq. illyricus* u Boljunčici je neočekivana, ali je moguće da potječe od vrsta *Sq. illyricus* koje su nekada nastanjivale područje Slovenije (rijeka Soča). Kao jedno od staništa *Sq. microlepis* do sad je navođena i rijeka Neretva, međutim, ovim istraživanjem to nije potvrđeno jer nije pronađen ni jedna jedinka. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem potvrđuju prisutnost

vrste *Sq. squalus* u rijekama istarskog poluotoka (Dragonja, Raša, Pazinčica, Borutski potok - gdje je jedina prisutna vrsta klena i Mirna), rijekama Krki (Visovac), Trebišnjici, Ravno i Ljutoj (rijeka Ljuta prirodno je stanište vrste *Sq. svallize* pa se prisutnost haplotipa *Sq. squalus* može opravdati mogućom hibridizacijom ili introgresijom). Nije pronađen u rijekama Zrmanji, Cetini, Vrljiki i Prološkom blatu. Također nije pronađen u glavnim tokovima Neretve i Krke, nego samo u Visovcu, Trebišnjici i Ravnom.

- Ovim je istraživanjem utvrđena prisutnost još jedne filogenetske linije u Trebišnjici i Ravnom (*Sq. sp. Trebišnjica*) osim vrste *S. svallize* i *Sq. squalus*. Dva nova haplotipa s područja rijeke Trebišnjice i Ravnog čine odvojenu liniju koja možebitno predstavlja zasebnu taksnonomsku jedinicu. Vjerojatno je da su ti haplotipovi i prije bili prisutni na tom području ali nisu zabilježeni. S obzirom da je ovo prvo molekularno istraživanje klenova na tom području taj rezultat nije neočekivan.

7. LITERATURA

Almaca C., (1976): Zoogeografia e especiacao dos ciprinideos da Peninsula Iberica. Rev. Soc. Port. Ci. Nat. 4, 1–28.

Baldauf S.L., (2003): Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. Trends in Genet 19 (6): 345-351.

Banarescu P., (1964): Fauna Republicii Populare Romine: PiscesOsteichthyes 13. A.E.R.P.R., Bucuresti.

Banarescu P., (1989): Zoogeography and history of the freshwater fish fauna of Europe. In: Holcik, J. (Ed.), The Freshwater Fishes of Europe, 1. Aula-Verlag, Wiesbaden, 88–107.

Banarescu P., (1992): Distributon and dispersal of freshwater animals in north America and Eurasia. Zoogeography of freshwaters, vol.2, Aula-Verlag, Wiesbaden, 88-107.

Bianco P., (1990): Potential role of the paleohistory of the Mediterranean and Paratethys basin on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. Ichtyol.Explor. Freshwaters 1: 167-184.

Bianco P., Knežević B. (1987): The *Leuciscus cephalus* complex (Pisces: Cyprinidae) in the western Balkan area. Proc.V. Congr. Europ.Ichtyol., Stocholm, 1985: 49-55.

Bogutskaya N.G., Zupančič P. (1999): A re-description of *Leuciscuszrmanjae* (Karaman, 1928) and new data on the taxonomy of *Leuciscusillyricus*, *L. svallize* and *L. cephalus* (Pisces: Cyprinidae) in the West Balkans. Ann. Naturhist. Mus. Wien 101 B: 509-529.

Bogutskaya N.G., Zupančič P. (2010): *Squalius Janae*, a new species of fish from the Adriatic Sea basin in Slovenia (Actinopterygii: Cyprinidae). Zootaxa 2536: 53-68.

Bonacci O. (2003): Ekohidrologija vodenih resursa i otvorenih vodotoka. Građevinsko Arhitektonski fakultet Sveučilišta u Splitu, Institut Građevinarstva Hrvatske, Zagreb.

Briolay J., Galtier N., Brito R.M., Bouvet Y., (1998): Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9, 100–108.

Cabrera L., Gaudant J., (1985): Los ciprinidos (Pisces) del sistema lacustre Oligoceno-Mioceno de los Monegros (Sector SE de la cuenca del Ebro, provincia de Lleida, Tarragona, Huesca y Zaragoza). *Acta Geol. Hispanica* 20, 210–226.

Cavender T.M., Coburn M., (1992): Phylogenetic relationships of North American Cyprinidae. In: Mayden, R. (Ed.), *Systematics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes*. Stanford University Press, Stanford, CA, 293–327.

Chen X.L., Yue, P.Q., Lin, R.D., (1984): Major groups within the family Cyprinidae and their phylogenetic relationships. *Acta Zootaxon Sin* 9, 424–440.

Cowx I.G. (2002): Analysis of threats to freshwater fish conservation: past and present challenges. U: Collares-Pereira M.J. i sur. (ur.): *Conservation of freshwater fishes: options for the future*. Blackwell Science, Oxford, 201–221.

Descy J.P., Empain A. (1984): *Meuse. Ecology of European Rivers*. Blackwell Scientific, Oxford.

Doadrio I., Carmona, J.A., (1998): Genetic divergence in Greek populations of the genus *Leuciscus* and its evolutionary and biogeographical implications. *J. Fish Biol.* 53, 591–613.

Doadrio I., (1990): Phylogenetic relationships and classification of west Palearctic species of the genus *Barbus* (Osteichthyes: Cyprinidae). *Aq. Liv. Res.* 3, 265–282.

Duplić A. (2008): *Slatkovodne ribe, priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja*. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

Durand J.D., Persat H., Bouvet Y.,(1999): Phylogeography and postglacial dispersion of the chub (*Leuciscus cephalus*) in Europe. *Mol. Ecol.* 8: 989-997.

Durand J.D., Unlu E., Doadrio I., Pipoyan S., Templeton A.R., (2000): Origin, radiation, dispersion and allopatric hybridization in the chub *Leuciscus cephalus*. *Evolution of Leuciscus cephalus*. *Proc. R. Soc. Lond. B* (2000) 267, 1687-1697.

Farris J.S., (1989): "The retention index and the rescaled consistency index". *Cladistics* 5: 417–419.

Gaudant J., (1977): Nouvelles observations sur l'ichthyofaune stampienne d'Oberdorf (Canton de Soleure). *Ecol. Geol. Helv.* 70, 789– 809.

Gilles A., Lecointre G., Faure E., Chappaz R., Brun G., (1998): Mitochondrial phylogeny of European cyprinids. Implications for their systematics, reticulate evolution and colonization time. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10, 130–143.

Heckel J., Kner R. (1858): Die Süßwasserfische der Osterreichischen Monarchie mit Rücksicht auf der angrenzen Länder, Leipzig, W. Engelmann, 388 S.

Helland-Hansen E., Holtedahl T., Liye K. A. (1995): Environmental Effects Volume 3 of Hydropower development. Norwegian Institute of Technology, Division of Hydraulic Engineering.

Hering D., Johnson R. K., Kramm S., Schmutz S., Szoszkiewicz K., Verdonschot P. F. M. (2006): Assessment of European streams with diatoms, macrophytes, macroinvertebrates and 47 fish: a comparative metric-based analysis of organism response to stress. *Freshwater Biology* 51 (9): 1757-1785.

Holmlund C. M., Hammer M. (1999): Ecosystem services generated by fish populations. *Ecological Economics* 29 (2): 253-268.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2003) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 14: 817-818.

Hsü K., Montadert L., Bernouilli D., Cita M. B., Erikson A., Garrison R. E., Kidd R. B., Melieres F., Müller C., Wright R., (1977): History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature*, 267: 399-403.

Jeppesen E., Jensen J. P., Søndergaard M., Lauridsen T. L. (2005): Response of fish and plankton to nutrient loading reduction in eight shallow Danish lakes with special emphasis on seasonal dynamics. *Freshwater Biology* 50 (10): 1616-1627.

Karaman S. (1928): Beiträge zur Ichthyologie von Jugoslavien I, *Glasnik Skopskog Naučnog Društva* 6: 147-176.

Kluge A.G., Farris J. S. (1969). "Quantitative Phyletics and the Evolution of Anurans". *Systematic Zoology* 18: 1-32.

Kolombatović J. (1886): Imenik kraljevske Dalmacije II Dio: Dvoživci, Gmazovi i Ribe, Split, Godišnje izvešće e. k. velikerealka, 32.

Kosić B. (1903): Ribe Dubrovačke. Tisak dioničke tiskare, Zagreb, 48.

Kottelat M., Freyhof J. (2007): Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.

Leiner S., Povž M., Mrakovčić M. (1995): Freshwater fish in Istrian Peninsula. *Annales* 7, 215-222.

Mau B., Newton M., Larget B., (1999): Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte carlo methods. *Biometrics*, 55, 1-12.

Mount D.W., (2001): *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, 564.

- Mrakovčić M., Brigić A., Buj I., Čaleta M., Mustafić P., Zanella D. (2006): Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb
- Mrakovčić M., Čaleta M. (2011): Endemične ribe cetinskog slijeva. Prirodoslovlje, časopis Odjela za prirodoslovlje i matematiku Matice hrvatske 11 (1): 3-18.
- Nei M., (1996): Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu Rev Genet* 30:371-403.
- Perea S., Bohme M., Zupančić P., Freyhof J., Sanda R., Ozulug M., Abdoli A., Doadrio I. (2010): Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean Subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *BMC Evolutionary Biology* 10: 265 doi: 10.1186/1471-2148-10-265.
- Radović J. (1999): Pregled stanja biološke i krajobrazne raznolikosti Hrvatske sa strategijom i akcijskim planovima zaštite. Državna uprava za zaštitu prirode i okoliša, Zagreb.
- Rögl F., Steininger F. F. (1983): Vom Zerfall der Tethys zu Mediterran und Paratethys. Die neogene Paläogeographie und Palinspastik der zirkum - mediterranen Raumes. *Annalen des Naturhistorischen Museum Wien A* 85, 135-163.
- Saboncello I., (1967): Sistematika slatkovodnih riba u Livojević Z., Bojčić C.: Priručnik za slatkovodno ribarstvo. Posebna izdanja Agronomskog glasnika: 21-90.
- Sanjur O.I., Carmona J.A., Doario I., (2003): Evolutionary and biogeographical patterns within Iberian populations of the genus *Squalius* inferred from molecular data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 20-30.
- Sket B., (1967): Ključi za določevanje živali. I. slatkovodne ribe. Ljubljana, Institut za biologiju, Univerze v Ljubljani, 89.
- Swofford D.L. (2002) PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version 4 [Computer software and manual]. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Taler Z., (1953): Rasprostranjenje i popis slatkovodnih riba Jugoslavije. Glasnik prirode, Muzej srpske zemlje, ser.B 5-6: 423-455.

Tutman P., Glamuzina B., Dulčić J. (2008): Threatened fishes of the world: *Salmo dentex* (Heckel 1852) (Salmonidae). Environmental Biology of Fishes 82 (2): 175-176.

Vuković T., Ivanović B. (1971): SladkovodneribeJugoslavije. Sarajevo, ZemaljskiMuzej, 268.

West-Eberhard M.J. (2003): Developmental Plasticity and Evolution. Oxford Univ. Press.353-376.

Zardoya R., Doadrio I., (1998): Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: Systematic and biogeographical implications. Proc. R. Soc. Lond. 265, 1365–1372.

Zupančić P., Mrakovčić M., Marčić Z., Naseka A.M., Bogutskaya N.G., (2010): Identity of *Squalius* (Actinopterygii, Cyprinidae) from Istra Peninsula in Croatia (Adriatic Sea basin). Zookeys 53:45-58.

<http://www.qiagen.com/hr/resources/resurcedetail?id=21b-4aaa-470a-a141-191ed91c54be&lang=en>

<http://www.ribe-hrvatske.com>

<http://www.new.ribe-hrvatske.com/index.php/popisvrsta/49-cyprinidae/168-leuciscus-illyricus?lang=hr>

<http://www.new.ribe-hrvatske.com/index.php/popisvrsta/49-cyprinidae/170-leuciscus-microlepis-?lang=hr>

<http://www.new.ribe-hrvatske.com/index.php/popisvrsta/49-cyprinidae/173-leuciscus-svallize?lang=hr>

<http://www.new.ribe-hrvatske.com/index.php/popisvrsta/49-cyprinidae/176-squalius-zrmanjae?lang=hr>

<http://www.ittiofauna.org>

<http://www.fishbase.org>

https://www.dropbox.com/s/982ksxcvhtbvp43/Crvena_knjiga_slatkovodnih_riba-final_WEB.pdf?dl=0