

Genska struktura i raznolikost potočne mreže (Barbus balcanicus Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002; Actinopteri) u Hrvatskoj

Veble, Vatroslav

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:326416>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Vatroslav Veble

**Genska struktura i raznolikost potočne mreže (*Barbus balcanicus*
Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb i Berrebi, 2002; Actinopteri) u
Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za zoologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Buj. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Genska struktura i raznolikost potočne mreže (*Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb i Berrebi, 2002; Actinopteri) u Hrvatskoj

Vatroslav Veble

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Potočna mreža (*Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb i Berrebi, 2002) je slatkovodna riba iz porodice Cyprinidae čiji srodstveni odnosi među populacijama u Hrvatskoj nisu poznati, kao ni protok gena između tih populacija, niti je utvrđen čitav areal njene rasprostranjenosti u Hrvatskoj. Zbog onečišćenja vodotoka, nestajanja njenih prirodnih i mriješnih staništa i regulacije gornjih tokova rijeka, potočna mreža je na popisu osjetljivih vrsta slatkovodnih riba Hrvatske. Kako bih predložio prikladne mjere zaštite te pridonio istraživanju potočne mreže na području Hrvatske, proveo sam filogenetsku rekonstrukciju na temelju sekvenci mitohondrijskog gena za citokrom *b* pomoću metode najveće parsimonije, metode najveće vjerojatnosti i metode susjednog sparivanja. Pomoću programa DnaSP odredio sam mjere genskog polimorfizma, a stope migracija između populacija odredio sam pomoću programa Migrate. Rezultati filogenetske rekonstrukcije pokazali su da je potočna mreža dobro strukturirana vrsta te da postoje tri linije potočne mreže, od kojih je samo jedna s područja Hrvatske. Utvrđena je različita intrapopulacijska raznolikost, a migracije između populacija nisu recipročne.

(50 stranica, 12 slika, 7 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: slatkovodne ribe, filogenija, citokrom *b*, protok gena, zaštita

Voditeljica: dr. sc. Ivana Buj, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Buj, doc.

dr. sc. Ivan Radosavljević, doc.

dr. sc. Ivan Čanjevac, doc.

dr. sc. Blanka Cvetko Tešović, prof.

Rad prihvaćen: 19.02.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Genetic structure and variety of the danube barbel (*Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002; Actinopteri) in Croatia

Vatroslav Veble

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The Danube barbel (*Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002) is a freshwater fish from the Cyprinidae family, whose relationships between populations in Croatia are unknown, as well as gene flow between those population, and the entire range of its distribution in Croatia has not been established. Due to the pollution of watercourses, the disappearance of its natural and spawning habitats and the regulation of the upper river flows, the Danube barbel is listed as a vulnerable species of freshwater fish in Croatia. In order to propose suitable protection measures and to contribute to the study of the Danube barbel in Croatia, I performed phylogenetic reconstruction based on the cytochrome *b* mitochondrial gene sequences using the maximum parsimony method, the maximum likelihood method and the neighbor joining method. Using the DnaSP computer program, I determined the measures of gene polymorphism, and I determined the migration rates between populations using the Migrate program. The results of the phylogenetic reconstruction showed that the Danube barbel is a well structured species and that there are three lineages of the Danube barbel, only one of which is from the territory of Croatia. Different intrapopulation diversity was identified and migrations between populations were not reciprocal.

(50 pages, 12 figures, 7 tables, 57 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: freshwater fish, phylogeny, cytochrome *b*, gene flow, protection

Supervisor: Dr. Ivana Buj, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Ivan Radosavljević, Asst. Prof.

Dr. sc. Ivan Čanjevac, Asst. Prof.

Dr. sc. Blanka Cvetko Tešović, Prof.

Thesis accepted: 19.02.2020.

Zahvala

Najprije bih se želio zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Buj bez čijeg strpljenja i voditeljstva ovaj rad ne bi bio moguć. Također zahvaljujem se i asistenticama Luciji Ivić i Luciji Raguž za savjete i pomoć pri radu u laboratoriju i na računalu.

Veliko hvala mojim roditeljima Suzani i Krešimiru za ljubav, podršku i strpljenje tijekom svih mojih godina školovanja i studiranja. Nadam se da ću jednoga dana biti upola dobra i vrijedna osoba poput vas.

Želim se zahvaliti Bogu na svakom podarenom danu i dobrim ljudima s kojima me spojio tijekom ovih godina.

Na kraju ovaj rad posvećujem svojem djedu Nikoli i baki Nadi. Vi ste bili uz mene svaki dan mojeg školovanja i vaša požrtvornost, ljubav i savjeti su me učinili čovjekom kakav jesam danas. Vama posvećujem ovaj rad, a svojoj dragoj Ivani, koja je najbitnija osoba u mom životu posvećujem sve svoje dane nakon ovog rada. Volim vas sve od srca!

SADRŽAJ

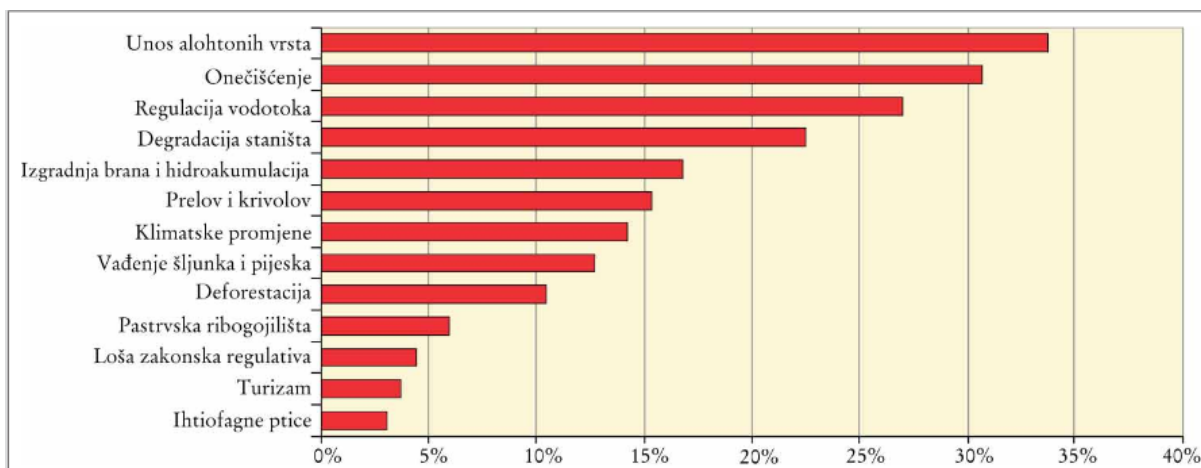
1. UVOD.....	7
1.1. Actinopteri	8
1.2. Cypriniformes.....	9
1.3. <i>Barbus balcanicus</i>	10
1.3.1. Morfologija	13
1.3.2. Ekološka obilježja	13
1.3.3. Status ugroženosti	14
1.4. Mitohondrijska DNA.....	14
1.5. Citokrom <i>b</i> kao genski marker	15
1.6. Polimorfizam DNA.....	15
1.7. Protok gena	16
1.8. Elektroribolov.....	16
1.9. Metoda najveće parsimonije (MP).....	17
1.10. Metoda najveće vjerodostojnosti (ML).....	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. Uzorci	20
3.2. Područje istraživanja	23
3.3. Opis lokaliteta gdje su prikupljeni uzorci	24
3.4. Izolacija genomske DNA.....	29
3.5. Lančana reakcija polimerazom	30
3.6. Elektroforeza u agaroznom gelu	32
3.7. Sekvenciranje	32
3.8. Računalne analize temeljene na nukleotidnim sekvencama	32
3.9. Protok gena	34
4. REZULTATI	34
4.1. Genski polimorfizam	34
4.2. Filogenetski odnosi	35
4.3. Protok gena.....	43
5. RASPRAVA.....	46
6. ZAKLJUČAK	49
7. LITERATURA	50
8. ŽIVOTOPIS.....	55

1. UVOD

Ribe su biološki najraznolikija i najmnogobrojnija skupina kralješnjaka. Procjenjuje se da u svijetu postoji između 25000 i 40000 vrsta riba (Kottelat i Freyhof, 2007). Od ukupne količine vode na Zemlji, samo 2,5 % je slatka voda (Riđanović, 1993). Unatoč tome, otprilike trećina ukupne brojnosti vrsta riba pripada u slatkovodne vrste. Do danas je opisano preko 14000 vrsta slatkovodnih riba, no one su i dalje jedna od najmanje istraženih skupina kralješnjaka (Kottelat i Freyhof, 2007). U slatkim vodama Europe nalazi se 546 autohtonih vrsta riba (Kottelat i Freyhof, 2007), a u slatkim vodama Republike Hrvatske nalazimo 150 vrsta od kojih je 17 stenoendema (Mrakovčić i sur., 2006) što je čini jednom od ihtiološki najraznolikijih europskih zemalja. Zoogeografska analiza hrvatske ihtiofaune je učinjena tek djelomično te veliki prostori nisu obuhvaćeni redovitim istraživanjima, mnoge vrste nemaju utvrđene stvarne areale rasprostranjenosti, a nekima manje poznatim vrstama i podvrstama još nije do kraja utvrđen taksonomski status.

Riblje zajednice u ekosustavu imaju regulacijske, povezujuće i informativne uloge; one povezuju hranidbene lance vodenog i kopnenog ekosustava, recikliraju nutrijente i sudjeluju u ciklusu ugljika, prestrukturiraju supstrat dna, održavaju raznolikost na razini genoma, vrsta i ekosustava, omogućuju procjenu stresa i stanja ekosustava, itd. (Holmlund i Hammer, 1999, Mrakovčić i sur., 2006).

Unatoč tome što su najraznolikija i najmnogobrojnija skupina kralješnjaka i što im je uloga u ekosustavima od iznimne važnosti, ribe predstavljaju najugroženiju skupinu kralješnjaka (Radović, 1999). Uzroci ugroženosti slatkovodnih riba i bioraznolikosti slatkovodnih staništa su modifikacije, fragmentacije i uništavanje vodenih staništa (izgradnja hidroelektrana, melioracija, itd.), unos invazivnih vrsta, pretjerani izlov riba, onečišćenje okoliša, deforestacija i klimatske promjene. Uzroci ugroženosti slatkovodnih riba Hrvatske prikazani su na slici 1.



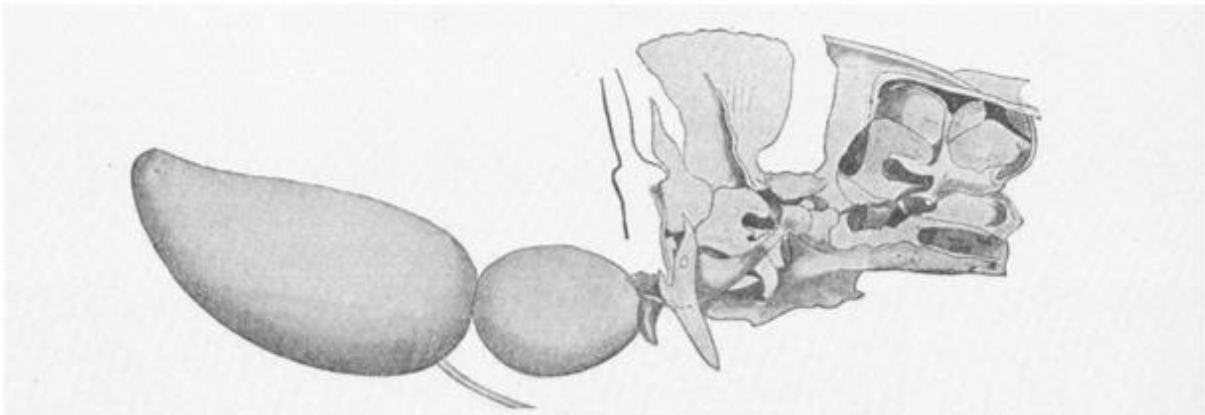
Slika 1. Najvažniji uzroci ugroženosti hrvatske ihtiofaune (preuzeto iz Mrakovčić i sur., 2006).

1.1. Actinopteri

Zrakoperke (Actinopteri, nekada Actinopterygii) dobile su ime po posebnom izgledu peraja koje su interno podržane brojnim endoskeletnim šipčicama (lepidotrichia) te čine krupan udio (cca 32000 vrsta) u raznolikosti živućih kralješnjaka po broju vrsta, ukupnoj biomasi i rasprostranjenosti (Kardong, 2011, Nelson, 2006). Zrakoperke nastanjuju sve vodene okoliše, od abisalnih ravnica do planinskih rijeka i do međuplinskih obala te konzumiraju resurse od mikroplanktona do sisavaca (Nelson, 2006). Neki biolozi koji proučavaju ribe dijele zrakoperke na Chondrostei (štitonoše), Holostei (cjelokoste) i Teleostei (prave koštunjače), od kojih svaka skupina predstavlja primitivne, srednje i napredne skupine zrakoperki, u skladu s porastom količine okoštavanja (Kardong, 2011). Teleostei obuhvaćaju više od 99% recentnih vrsta zrakoperki, dok su Holostei i Chondrostei predstavljeni s nekoliko rodova koji bi se mogli nazvati „živim fosilima“ (Nelson, 2006). Živim fosilima smatramo danas živuće vrste koje morfološki jako slične svojim izumrlim precima, odnosno njihovim fosilnim nalazima. Kao rezultat toga, biološka raznolikost zrakoperki postala je sinonim za prave koštunjače i stoga se većina hipoteza o podrijetlu i uzrocima dominacije zrakoperki bavi samo tom skupinom i njezinim filogenetskim odnosima (Sallan, 2014).

1.2. Cypriniformes

Uz skupinu Perciformes, šaranke (Cypriniformes) su vrstama najbrojniji red unutar razreda zrakoperki u koji je svrstano oko 6000 ribljih vrsta (Bogut i sur., 2006). Šaranke imaju cikloidne ili okruglaste koštane ljuske, a većina vrsta nema ljusaka na području glave. Većinom nemaju masnu peraju, a u leđnoj i podreпноj peraji obično imaju bodljaste šipčice (Nelson, 2006). Šaranke karakteriziraju ždrijelni zubi za usitnjavanje hrane, nedostatak čeljusnih zuba te prisutnost Weberovog aparata (Kottelat i Freyhof, 2007). Weberov aparat (Slika 2) nastao je iz koštanih elemenata prva četiri kralješka te služi za prijenos zvučnih signala iz plivaćeg mjehura preko Weberovih koščica sve do labirintne strukture unutarnjeg uha (Alexander, 1962).



Slika 2. Crtež Weberovog aparata i plivaćeg mjehura u šaranki (preuzeto iz Banke slatkovodnih i morskih slika, <https://digitalcollections.lib.washington.edu/digital/collection/fishimages/id/51826/rec/1> , pristupljeno 15.10.2019.)

1.3. *Barbus balcanicus*

Potočna mrena, *Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb i Berrebi, 2002, je slatkovodna riba koju taksonomski svrstavamo u sljedeće kategorije:

Carstvo: ANIMALIA - životinje

Koljeno: CHORDATA - svitkovci

Potkoljeno: VERTEBRATA - kralješnjaci

Nadrazred: GNATHOSTOMATA - čeljustousti

Razred: ACTINOPTERI - zrakoperke

Nadred: TELEOSTEI - prave koštunjače

Red: CYPRINIFORMES - šaranke

Porodica: CYPRINIDAE - šarani

Potporodica: BARBINAЕ

Rod: *Barbus*

Vrsta: *Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb i Berrebi, 2002 – potočna mrena

Rod *Barbus* predstavlja jedan od vrstama najbogatijih rodova unutar pravih koštunjača, s više od 800 vrsta rasprostranjenih u Europi, Aziji i Africi te fosilnim nalazima još iz geološkog razdoblja oligocena (Tsigenopoulos i Berrebi, 1999, Tsigenopoulos i sur., 2002). Ovaj je rod poznat po svojoj taksonomskoj kompleksnosti zbog široke rasprostranjenosti, morfološke plastičnosti vrsta (koja otežava taksonomsku identifikaciju) i po tome što su unutar roda prisutni različiti stupnjevi ploidije (Machodrom i Doadrio, 2001). Ime roda (lat. *barbus*= brada) potječe od struktura nalik na brkove koje se nalaze na uglovima usta i koje služe kao osjetilo za lociranje hrane (Sofradžija, 2009). Unutar roda *Barbus* mogu se naći diploidne, tetraploidne i heksaploidne vrste, a učestala je i pojava hibridizacije među vrstama roda *Barbus* (Buonerba, 2010). Sve europske vrste koje pripadaju rodu *Barbus* su tetraploidne (Berrebi, 1995). Genetska istraživanja su otkrila da se unutar opisane vrste *Barbus petenyi* Heckel, 1852 zapravo nalazi skup od najmanje tri vrste koje su se razdvojile tijekom pliocena (Kotlík i sur., 2002). Jedna od tih vrsta je i potočna mrena, odnosno *Barbus balcanicus* koja je opisana na temelju svojih jedinstvenih morfoloških (tupo zašiljena njuška, velike smeđo-crne mrlje na glavi, leđima i bokovima koje se na glavi protežu prema obrazima; sve peraje imaju velike tamne mrlje koje su obično raspoređene u redove na leđnoj i repnoj peraji, a na trbušnim perajama su raspoređene u trake) i genetskih karakteristika (Buonerba, 2010).

Barbus balcanicus (Slika 3) je mala reofilna vrsta sa širokom rasprostranjenošću u planinskom području porječja Dunava (rijeke Sava, Drina, Archar, Krupaja, Nera i Vlašinsko jezero), jadranskog slijeva (rijeka Soča) i egejskog slijeva (rijeke Gallikos, Vardar, Loudias i Aliakmon) (Tsigenopoulos i sur., 2002, Kottelat i Freyhof, 2007, Marić i sur., 2012, Žutinić i sur., 2014). Živi u potocima i plićim rječicama na kamenitom i šljunkovitom dnu. Hrani se faunom dna, ikrom, mlađi drugih riba, algama i višim biljem (Žutinić i sur., 2014).



A



B



C

Slika 3. Morfološka plastičnost potočne mreine; A) Primjer vrste *Barbus balcanicus* ulovljene u rijeci Kupa na granici sa Slovenijom; standardne dužine (SL) 130 mm. B) Primjer vrste *Barbus balcanicus* ulovljene u rijeci Vardar u Grčkoj; SL 92 mm. (preuzeto iz Kottelat i Freyhof, 2007). C) Holotip vrste *Barbus balcanicus* ulovljene u potoku Krupaja u Milanovcu, Srbija, SL 130 mm; nedostaje gornji režanj repne peraje (preuzeto iz Simonović i Nikolić., 1996).

1.3.1. Morfologija

Barbus balcanicus ima jako izduženo i gotovo valjkasto tijelo. Odmah iza glave leđna strana tijela je umjereno lučno povijena. Na glavi se nalaze dva para brkova. Jedan par se nalazi na prednjem dijelu gornje čeljusti i proteže se do zadnjeg dijela nosnih otvora. Drugi par je smješten iznad početka usta, a ispružen doseže do sredine ili kraja oka. Repna peraja je tanja i manje urezana nego u obične mreke. U leđnoj peraji prisutne su 4 nerazgranate i 8 razgranatih šipčica, a u podrepnoj 3 nerazgranate i 5 razgranatih šipčica. Duž bočne pruge je 48 do 60 ljusaka. Zadnja nerazgranata šipčica u leđnoj peraji nije zadebljala, a njezin stražnji dio nije nazubljen. Ždrijelni zubi su u tri reda, a zubna formula je 2.3.5-5.3.2. Osnovna boja dorzalnog dijela tijela je tamna sivo-smeđa. Trbušna strana je bijela sa žutim preljevom. Po bočnom dijelu tijela, iznad bočne pruge jednakomjerno su raspoređene sitne tamne mrlje, koje u nekih jedinki mogu potpuno nedostajati. Podrepna, prsne i trbušne peraje su žućkaste boje. Na leđnoj i repnoj peraji nalaze se izdužene tamne mrlje (Kotlik i sur., 2002, Kottelat i Freyhof, 2007, Jakšić, 2018).

1.3.2. Ekološka obilježja

Na temelju sklonosti prema brzini vodotoka koji preferira, potočna mrena spada u reofilne vrste. Reofilne vrste preferiraju brzi vodeni tok, niže temperature i visoke koncentracije otopljenog kisika. Potočna mrena je pridnena vrsta koja nastanjuje gornje tokove rijeka i potoka u zoni mreke, a ulazi i u zonu lipljena (Mrakovčić i sur., 2006). Mrijesti se od svibnja do srpnja i u to vrijeme jedinke migriraju u gornje tokove u potrazi za slapovima i bržim tokovima bogatim otopljenim kisikom (Žutinić i sur., 2014, Miloš, 2002). U kasnu jesen jedinke odlaze u dublja područja ili depresije u kojima prezimljuju, a u proljeće se vraćaju u brže tokove gdje ima hrane (Miloš, 2002). Mužjaci i ženke podjednako su zastupljeni u populacijama (Žutinić i sur., 2014), no brojnost mužjaka opada sa starošću i većinom ne doživljavaju više od 3 godine (Economidis i sur., 2003, Žutinić i sur., 2014., Šorić i Janković, 1989). Mužjaci brže spolno sazrijevaju, između prve i druge godine života, dok ženke najčešće sazrijevaju između treće i četvrte godine života (ženke u prve dvije godine života više ulažu u rast te su veće od mužjaka) (Economidis i sur., 2003, Žutinić i sur., 2014, Miloš, 2002). Potočna mrena uglavnom se hrani životinjskim materijalom, ali je i potvrđena prisutnost biljne komponente (Miloš, 2002). Odrasle jedinke hrane se ikrom i mlađi drugih riba te bentičkim beskralješnjacima, najčešće ličinkama kukaca, dok ličinke i juvenilni oblici

imaju omnivorni tip ishrane u kojem su zastupljeni beskralješnjaci, zooplankton i fitoplankton (Economidis i sur., 2003, Mrakovčić i sur., 2006).

1.3.3. Status ugroženosti

Potočna mrena 2008. godine je uvrštena na Crveni popis IUCN-a u kategoriju najmanje zabrinjavajućih vrsta (LC). Međunarodno je zaštićena Bernskom konvencijom (Dodatak III) i Europskom direktivom o zaštiti staništa (Dodaci II i V). Potočnu mrenu ugrožavaju onečišćenja vodotoka, nestajanje prirodnih i mrijesnih staništa, pregradnja rijeka i regulacija gornjih tokova rijeka, a u Hrvatskoj je na Crvenom popisu slatkovodnih riba kao osjetljiva vrsta (VU) (Mrakovčić i sur., 2006).

1.4. Mitohondrijska DNA

Svaka eukariotska stanica sadrži barem jednu kopiju cjelokupnog nuklearnog genoma smještenog u njenom nukleusu (jezgri). Suprotno tome, svaka stanica sadrži čak nekoliko tisuća mitohondrija. Stanice sadrže različit broj mitohondrija ovisno o energetske potrebama te stanice. Mitohondriji sadrže mali, ali bitan dio eukariotskog genetskog materijala. Mitohondriji su poluautonomni i posjeduju vlastiti genom i mehanizme za umnožavanje, transkripciju i sintezu proteina (Saccone i sur., 2000). Postoji šest glavnih vrsta genoma unutar mitohondrijskih genoma, koje klasificiramo prema njihovoj strukturi (npr. kružni, linearan), veličini, prisutnosti introna ili struktura sličnih plazmidima i prema tome je li genetski materijal singularna molekula ili skup homogenih ili heterogenih molekula (Kolesnikov i sur., 2012). U životinjskim stanicama postoji samo jedan tip mitohondrijskog genoma. Ovaj genom obično sadrži jednu kružnu molekulu DNA s između 11–28 kpb genetskog materijala (Kolesnikov i sur., 2012). Za razliku od nuklearne DNA, koja se nasljeđuje od oba roditelja i u kojoj su geni preuređeni u procesu rekombinacije, mitohondrijska DNA (mtDNA) obično se ne mijenja od roditelja do potomstva. Iako se mtDNA također rekombinira, to čini s kopijom sebe unutar istog mitohondrija. Zbog toga i zato što je stopa mutacije životinjske mtDNA veća od stope mutacije nuklearne DNA, mtDNA je moćan alat za praćenje podrijetla preko majčinske linije i u toj se ulozi koristi za praćenje podrijetla mnogih vrsta unutar stotina generacija (Brown i sur., 1979).

1.5. Citokrom *b* kao genski marker

Citokrom *b* (*cyt b*) smatra se jednim od najkorisnijih gena za filogenetska istraživanja i vjerojatno je najpoznatiji mitohondrijski gen s obzirom na strukturu i funkciju njegovog proteinskog proizvoda (Esposti i sur., 1993). *Cyt b* gen sadrži i sporo i brzo razvijajuće kodonske položaje, kao i konzervativne i promjenjive regije i zbog toga ovaj gen se koristi u taksonomskim analizama, filogenetici i populacijskoj genetici (Farias i sur., 2001). *Cyt b* gen vrlo često se koristi u istraživanjima strukture i porijekla ribljih populacija (Buj i sur., 2017, Buj i sur., 2014, Tsigenopoulos i Berrebi, 1999, Tsigenopoulos i sur., 2002, Kotlik i sur., 2002, Farias i sur., 2001). Taksonomski status i evolucija riba temeljeni su većinom na morfološkoj raznolikosti (Lauer i Liem, 1983) što kod vrsta i rodova riba s morfološkom plastičnošću može dovesti do pogrešnih zaključaka. Mogućnost izoliranja mtDNA iz bilo kojeg dijela tkiva, brzo i sporo razvijajući kodonski položaji *cyt b* gena te jednostavnost amplifikacije *cyt b* gena pomoću lančane reakcije polimerazom omogućuju proučavanje veza između porodica, rodova i vrsta riba te nam pružaju uvid u populacijske fenomene poput efekta uskog grla i hibridizacije (Okumus i Ciftci, 2003).

1.6. Polimorfizam DNA

Polimorfizam DNA odnosi se na varijabilnost u DNA sekvencama među pojedinim organizmima, skupinama ili populacijama. Polimorfizmi na razini DNA uključuju širok raspon različitosti od promjene jednog para nukleotidnih baza, više parova baza te promjene ponavljajućih nizova. Genomska varijabilnost na razini DNA može biti prisutna u mnogim oblicima, uključujući: polimorfizme jednog nukleotida, promjenjivi broj tandemskih ponavljanja (npr. mini i mikrosateliti), prijenosne elemente (npr. Alu ponavljanja), strukturne promjene i varijacije broja kopija. Genomska varijabilnost može se pojaviti i u jezgri i u mitohondrijima. Dva su glavna izvora polimorfizama u DNA: (1) mutacije koje mogu biti rezultat slučajnosti ili su potaknute vanjskim uzročnicima poput zračenja i (2) rekombinacija. Nakon nastanka mutacije, ona se može i naslijediti te se tako može pratiti nasljedstvo od roditelja do potomka (Ismail i Essawi, 2012).

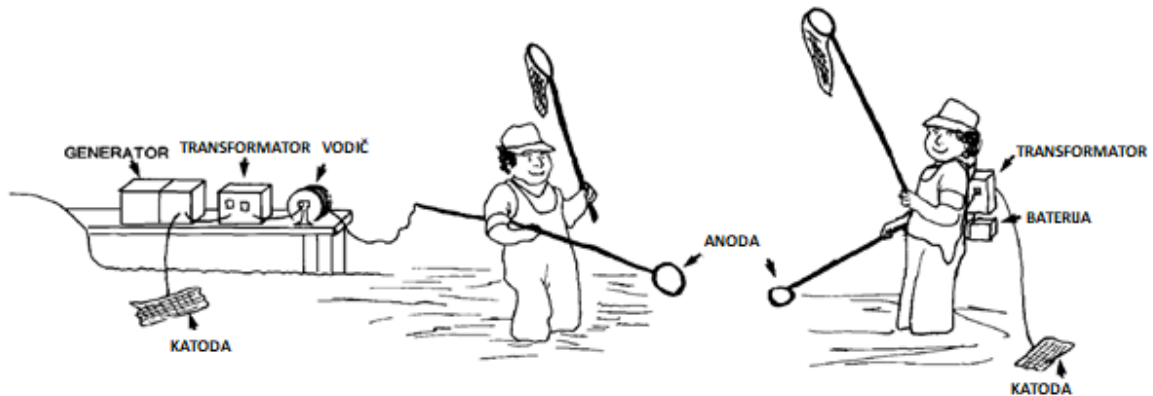
1.7. Protok gena

U populacijskoj genetici protok gena je prijenos genetske varijacije iz jedne populacije u drugu. Visoki protok gena između populacija može dovesti do smanjenja genske varijacije između populacija i utječe negativno na specijaciju. Najveći faktor koji utječe na stopu protoka gena između ribljih populacija je mobilnost vrste te povezanost vodotokova između populacija. Za sprječavanje divergiranja populacija zbog genskog pomaka dovoljan je samo jedan migrant po generaciji (Frankham i sur., 2002).

1.8. Elektroribolov

Otkriće metode elektroribolova sredinom prošlog stoljeća otvorilo je nove mogućnosti u ribolovu i ihtiologiji. Prije pojave elektroribolova bilo je gotovo nezamislivo kvantitativno istražiti populacije riba u rijekama i potocima. Korištenje elektroribolova je također omogućilo siguran ulov riba kod eksperimenata kod kojih bi se jedinke kasnije pustile nazad u vodotok, kod obilježavanja jedinki te kod ulova jedinki za uzgoj riba. Oprema za elektroribolov (Slika 4) sastoji se uglavnom od tri glavna dijela – jedinice za napajanje (generator ili baterija), transformatora i elektroda. Jedinica za napajanje proizvodi većinom izmjeničnu električnu struju i njena jačina utječe na voltažu u vodi. Transformator pretvara izmjeničnu električnu struju u istosmjernu drugačije voltaže te proizvodi oblik, dužinu i frekvenciju električnog pulsa. Oblik elektroda određuje jačinu električnog polja. Jedinica za napajanje proizvodi potrebnu energiju koja raste s povećanjem električne provodljivosti vode. Dva faktora najviše utječu na učinkovitost elektroribolova – električna provodljivost vode i električna provodljivost ribe. Električna provodljivost vode ovisna je o količini otopljenih soli i minerala u vodi, dok na električnu provodljivost riba najviše utječe njihova veličina. Kod vodotokova s nižom električnom provodljivošću (do 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$), i korištenja uobičajenih voltaža (100–1100 V) neće biti dovoljno jakog električnog polja za omamljivanje ribe. Takav problem se može riješiti na dva načina, ili s povećanjem voltaže ili s povećanjem veličine katoda. Povećanje voltaže nije uvijek najsigurniji izbor za osobu koja upravlja s uređajem za elektroribolov, a povećanje katode ima svojih ograničenja zbog same težine katoda. Kod vodotokova s visokom električnom provodljivošću (više od 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$) potrebno je koristiti niže voltaže i višu jakost električne struje. Pri korištenju viših voltaža u vodotocima s visokom električnom provodljivošću, električna struja će teći linijom najmanjeg otpora te zaobići samo tijelo ribe. Što je veća električna provodljivost vode, to su manje iskoristivi

mobilni sustavi za elektroribolov jer se brzo prazne te je potrebna upotreba stacionarnih generatora (Bohlin i sur., 1989, www.smith-root.com/support/kb/how-do-i-select-the-right-electrofisher/)



Slika 4. Oprema koja se koristi kod elektroribolova. *Lijevo* je primjer stacionarnog sustava, a *desno* je primjer mobilnog sustava za elektroribolov (preuzeto iz Bohlin i sur., 1989).

1.9. Metoda najveće parsimonije (MP)

Metoda najveće parsimonije je filogenetska metoda kojom se određuje jedno ili više filogenetskih stabala za koje je potreban najmanji broj evolucijskih promjena za prikazivanje primijećenih razlika u sekvencama. Za opisivanje MP stabla koriste se indeks konzistencije (CI), indeks retencije (RI), indeks homoplazije (HI) i indeks reskalirane konzistencije (RC). 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). Filogenetsko stablo dobiveno ovom metodom predstavlja matematički najmanji broj promjena (mutacija) za njen nastanak. Parsimonijski značajna mjesta su ona koja u setu sekvenci imaju barem dva različita nukleotidna mjesta (mutacija) koja se pojavljuju u barem dvije sekvence.

1.10. Metoda najveće vjerodostojnosti (ML)

Metoda najveće vjerodostojnosti je filogenetska metoda koja procjenjuje vjerojatnost da je izabrani evolucijski model doveo do nastanka skupa sekvenci koje se analiziraju. Ovom metodom se računa vjerojatnost za svako nukleotidno mjesto kao suma vjerojatnosti svih

mogućih rekonstrukcija ancestralnih stanja u okviru određenog modela supstitucija baza, a vjerojatnost čitavog stabla predstavlja umnožak vjerojatnosti svakog nukleotidnog mjesta.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su sljedeći:

1. Utvrditi srodstvene odnose između populacija vrste *Barbus balcanicus* u Hrvatskoj, kao i u odnosu na ostale europske populacije
2. Opisat filogeografski uzorak vrste *Barbus balcanicus* u Hrvatskoj
3. Utvrditi stupanj intraspecijske i intrapopulacijske raznolikosti potočne mreže u Hrvatskoj
4. Procijeniti razinu protoka gena među populacijama potočne mreže

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Za potrebe ovog istraživanja djelatnici Zoologijskog zavoda s Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu prikupili su uzorke jedinki potočne mreke tijekom 2018. i 2019. godine. Ulovili su 96 jedinki potočne mreke na 19 različitih lokacija (Tablica 1, Slike 5 i 6) korištenjem metode elektroribolova. Sa svake jedinke odrezali su komadić trbušne peraje i pohranili ga u epruvetu s 96%-tnim etanolom, a nakon toga jedinku su vratili u vodotok. Svaki uzorak označili su jedinstvenim kodom od četiri slova i broja.

Tablica 1. Popis prikupljenih uzoraka vrste *Barbus balcanicus* s odgovarajućim dodijeljenim kodom, mjestom i vremenom uzorkovanja

Regija	Vodotok	Geografske koordinate	Datum	Kod
Zagorje i Medvednica	Ušće Suhopoda i Šokota u Kašinu	X=469458 Y=5089331	25.09.2018.	MRKA1 MRKA2 MRKA3 MRKA4 MRKA5 MRKA6 MRKA7 MRKA8
Zagorje i Medvednica	Burnjak	X=462750 Y=5093534	25.09.2018.	MRBU1 MRBU2 MRBU3 MRBU4 MRBU5 MRBU6
Zagorje i Medvednica	Vidovec	X=464231 Y=5085538	25.09.2018.	MRVI1 MRVI2 MRVI3 MRVI4 MRVI5 MRVI6
Banovina	Stupnica	X=480677 Y=5003484	12.10.2018.	MRST1

Tablica 1. Nastavak

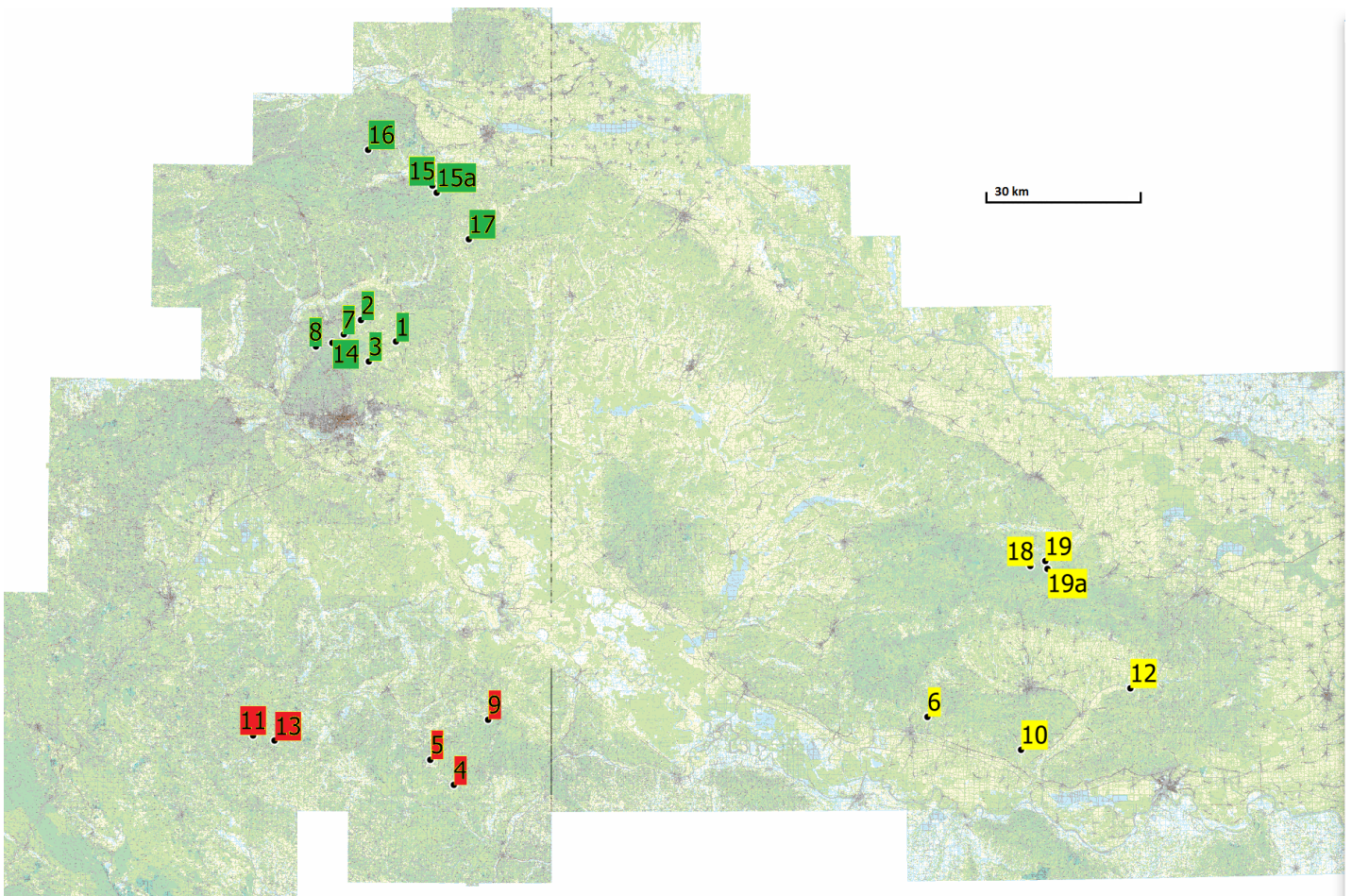
Banovina	Listovački potok	X=476195 Y=5008444	11.10.2018.	MRLP1 MRLP2 MRLP3
Slavonija	Putnjak	X=572543 Y=5016736	05.10.2018.	MRPU1 MRPU2 MRPU3 MRPU4 MRPU5 MRPU6 MRPU7 MRPU8 MRPU9 MRPU10
Zagorje i Medvednica	Rijeka	X=459352 Y=5090772	22.10.2018.	MRRM1 MRRM2 MRRM3 MRRM4 MRRM5 MRRM6 MRRM7 MRRM8
Zagorje i Medvednica	Sarni potok	X=453935 Y=5088416	22.10.2018.	MRSA1 MRSA2 MRSA3 MRSA4 MRSA5 MRSA6
Banovina	Sunja	X=487309 Y=5016198	12.10.2018.	MRSU1 MRSU2 MRSU3 MRSU4 MRSU5 MRSU6
Slavonija	Rinovica, ušće Rijeke u Rinovac	X=590648 Y=5010354	05.10.2018.	MRR11 MRR12
Petrova gora	Brusovača	X=441826 Y=5013147	11.10.2018.	MRBR1 MRBR2 MRBR3 MRBR4 MRBR5 MRBR6
Slavonija	Londža	X=611792	04.10.2018.	MRLN1

Tablica 1. Nastavak

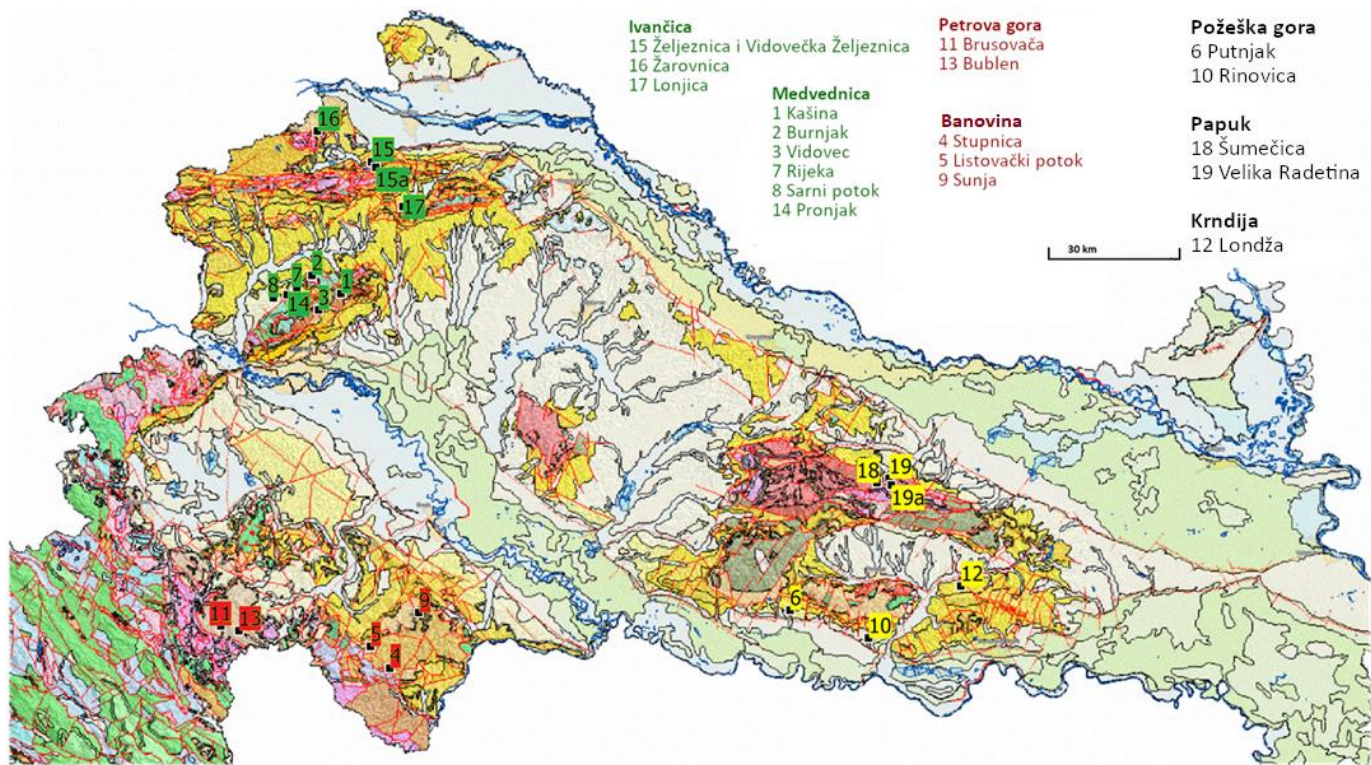
		Y=5022274		MRLN2 MRLN3
Petrova gora	Bublen	X=445984 Y=5012051	11.10.2018.	MRBB1 MRBB2 MRBB3 MRBB4
Zagorje Medvednica	Pronjak	X=457126 Y=5089078	22.10.2018.	MRPR1
Zagorje Medvednica	Željeznica, Vidovečka Željeznica	X=476508 Y=5119574 X=477380 Y=5118251	09.07.2018	MRŽE1 MRŽE2 MRŽE3 MRŽE4
Zagorje Medvednica	Žarovnica	X=464064 Y=5126570	09.07.2018.	MRŽA1 MRŽA2 MRŽA3 MRŽA4 MRŽA5 MRŽA6
Zagorje Medvednica	Lonjica, izvorište Curek	X=483612 Y=5109232	09.07.2018.	MRLO1 MRLO2 MRLO3 MRLO4 MRLO5 MRLO6
Slavonija	Šumečica	X=592487 Y=5045907	07.12.2018.	MRŠU1 MRŠU2 MRŠU3 MRŠU4 MRŠU5 MRŠU6
Slavonija	Velika Radetina	X=595330 Y=5046874 X=595791 Y=5045368	06.12.2018. 07.12.2018.	MRVR1 MRVR2 MRVR3 MRVR4 MRVR5

3.2. Područje istraživanja

Ovim istraživanjem pokušalo se obuhvatiti što šire geografsko područje unutar granica Republike Hrvatske u kojem obitavaju populacije potočne mreže. Uzorci su prikupljeni s četiri lokaliteta s planine Ivančice (potoci Žarovnica, Lonjica, Željeznica i Vidovečka Željeznica), šest lokaliteta na Medvednici (potoci Kašina, Vidovec, Rijeka, Sarni potok i Pronjak), dva lokaliteta s Petrove gore (potoci Bubljen i Brusovača), tri lokaliteta iz Banovine (potoci Stupnica, Sunja i Listovački potok), dva lokaliteta s Požeške gore (potoci Rinovica i Putnjak), tri lokaliteta s Papuka (dva na potoku Velika Radetina i potok Šumečica) i s potoka Londže na Krndiji (Slike 5 i 6).



Slika 5. Pregledna topografska karta središnje Hrvatske s označenim lokacijama populacija potočne mreže iz područja istraživanja. Kao oznake su korištene boje i brojevi. Lokaliteti s Petrove gore i Banovine su pobjani crveno (11- Brusovača, 13- Bubljen, 4 - Stupnica, 5- Listovački potok, 9- Sunja); lokaliteti s Papuka, Krndije i Požeške gore su pobjani žuto (6- Putnjak, 10-Rinovica, 12-Londža, 18-Šumečica, 19-Velika Radetina 1, 19a-Velika Radetina 2); lokaliteti s Ivančice i Medvednice su pobjani zeleno (1- Kašina, 2- Burnjak, 3-Vidovec, 7-Rijeka, 8-Sarni potok, 14-Pronjak, 15-Željeznica, 15a-Vidovečka Željeznica, 16-Žarovnica, 17-Lonjica).



Slika 6. Geološka karta Republike Hrvatske mjerila 1:300 000 (preuzeta s <http://webgis.hgi-cgs.hr/gk300/default.aspx>) s označenim mjestima uzorkovanja populacija potočne mreže. Kao oznake su korištene boje i brojevi. Lokaliteti s Petrove gore i Banovine su pobjavani crveno (11- Brusovača, 13 – Bubljen, 4-Stupnica, 5-Listovački potok, 9-Sunja); lokaliteti s Papuka, Krndije i Požeške gore su pobjavani crno (6-Putnjak, 10-Rinovica, 12-Londža, 18-Šumečica, 19-Velika Radetina 1, 19a-Velika Radetina 2); lokaliteti s Ivančice i Medvednice su pobjavani zeleno (1- Kašina, 2- Burnjak, 3-Vidovec, 7-Rijeka, 8-Sarni potok, 14-Pronjak, 15-Željeznica, 15a-Vidovečka Željeznica, 16-Žarovnica, 17-Lonjica). Označene lokacije uzorkovanja na geološkoj karti su georeferencirane što smanjuje preciznost prikaza točne lokacije.

Svi istraživani potoci nalaze se u krškom području ili u području gdje se pojavljuju stijene koje sadrže vapnenac ili dolomit izuzev potoka Londže na Krndiji gdje dominiraju kopnene naslage lesa.

3.3. Opis lokaliteta gdje su prikupljeni uzorci

Potok Velika Radetina

Potok se nalazi na Papuku, teče kroz šumu. Na lokaciji prvog uzorkovanja voda potoka je prozirna i brzo otječe. Širina potoka je oko 2,5 m, dno je šljunkovito i pretežno pjeskovito. Prisutan je listinac. Elektroribolovom ulovljene su 4 potočne mreže, 2 pijora i 2 dvoprugaste uklje.

Na lokaciji drugog uzorkovanja voda potoka teče kroz šumu, prozirna je i brzo otječe. Lokalitet uzorkovanja nalazi se uzvodnije od lokacije prvog uzorkovanja. Korito je prirodno, nema utvrđenosti korita. Korito je prekriveno listincem i ima dosta srušenih stabala koje čine prirodne pregrade na potoku. Dno potoka sastoji se od šljunka, pijeska i krupnijeg kamenja. U neposrednoj blizini korita rastu mahovine, a drveće raste otprilike 1 metar od potoka. Elektroribolovom je ulovljeno 6 pastrva i 1 potočna mrena.

Potok Šumečica

Potok se nalazi na Papuku, teče kroz šumu, a voda je prozirna je i brzo otječe. Korito je prirodno te sadrži puno listinca. Srušena debla čine prirodne pregrade u potoku. Dno potoka je pjeskovito s malo šljunka i kamenja. Prisutni su slapići i bazeni s dubljom vodom. Oko potoka raste grmlje i drveće. Elektroribolovom je ulovljeno 8 potočnih mrena i 5 pastrva.

Potok Londža

Potok se nalazi u mjestu Draganlug na Krndiji, mutne je vode, smečkastog obojenja i bez mirisa. Korito je utvrđeno, prisutan je velik utjecaj čovjeka i poljoprivrede. Dno je od betona, a prisutno je malo mulja i detritusa. Obala je dijelom betonizirana, ali većinom zemljana. Okolnu vegetaciju čine većinom trava, malo grmlja i malo drveća. Elektroribolovom ulovljene su 3 potočne mrene.

Potok Rinovica

Potok se nalazi u blizini mjesta Lužani na Požeškoj gori, djelomično je zasjenjen. Dno potoka je pjeskovito i šljunkovito te su prisutne alge. Obala je zemljana, prekrivena travom, grmljem i drvećem. Elektroribolovom su ulovljene dvije potočne mrene. Pronađene su i brkice, obični vijun, krkuša i klen.

Potok Putnjak

Potok se nalazi na Požeškoj gori u blizini utvrde Gračanica, siječe cestu kroz šumu. Voda je prozirna i bez mirisa. Prisutan je utjecaj čovjeka. Dno je većinom šljunkovito, a u manjem dijelu muljevito i pjeskovito. Obala potoka je zemljana te prekrivena travom i grmljem. Elektroribolovom je ulovljeno 10 potočnih mrena, te primjerci brkice, klena i dvoprugaste uklije.

Potok Lonjica, izvorište Curek

Potok se nalazi na Ivančici, bistre je i prozirne vode. Na mjestu uzorkovanja, dno je stjenovito te nekoliko stijena viri iznad površine potoka. Širina potoka je oko 1,5 metara. Potok uzvodnije brže otječe te teče preko malih kaskada, a nizvodnije je mirnijeg toka. Potok je okružen šumom. Elektroribolovom je ulovljeno 6 potočnih mrena. Od ostalih vrsta, prisutni su klenovi, brkice, krkušice te veliki broj dvoprugastih uklija.

Potok Željeznica i potok Vidovečka Željeznica

Potok Željeznica nalazi se na Požeškoj gori. Voda je mutna; dno je stjenovito i šljunkovito. Širina korita je 2 metra, a potok je dubok 15-20 cm. Na mjestu uzorkovanja nije bila prisutna ni obalna ni vodena vegetacija.

Potok Vidovečka Željeznica prolazi kroz naselje te nastavlja svoj tok kroz šumu. Voda je mutna. Dno potoka je šljunkovito i pjeskovito te bez vegetacije. Dubine je do 10 cm, a širina korita iznosi do 1,5 metara. Elektroribolovom su ulovljene potočne mrene i peševi.

Potok Žarovnica

Potok Žarovnica nalazi se na Požeškoj gori, teče kroz šumu, a voda je mutna i slabo prozirna. Dno potoka je šljunkovito, korito je širine od 1 m do 1,5 m. U potoku nije prisutna vodena vegetacija. Prisutan je negativan utjecaj čovjeka (u potoku se nalaze plastične vrećice, boce i kruti otpad). Elektroribolovom su ulovljene potočne mrene i brkice.

Potok Vidovec

Potok se nalazi na Medvednici i prolazi kroz naselje. Voda je sivkastog obojenja, relativno prozirna te neugodnog mirisa. Nizvodno je skoro cijelim tokom utvrđeno korito te se u potok ispuštaju otpadne vode iz kanalizacije. Na betonskom dnu prisutan je šljunak, pijesak i mulj nastao od otpadnih voda. Elektroribolovom je ulovljeno 6 potočnih mrena.

Sarni potok

Sarni potok nalazi se na Medvednici, okružen je šumom, a voda je prozirna i bez mirisa. Dno potoka je šljunkovito. Na potoku su izgrađene drvene pregrade koje tvore kaskade. Elektroribolovom je ulovljeno 10 potočnih mrena, potočne pastrve te veliki broj klenova.

Potok Pronjak

Potok Pronjak nalazi se na Medvednici, teče kroz manju šumu. Na nekoliko mjesta srušena stabla čine prirodne pregrade. Dno potoka je kamenito i pjeskovito. Obala je zemljana. Elektroribolovom su ulovljene pastrve i 1 potočna mrena.

Potok Rijeka

Potok Rijeka nalazi se na Medvednici, teče kroz šumu, voda je prozirna i brzo otječe. Dno potoka je kamenito i pjeskovito. U koritu su prisutna srušena stabla, a zemljana obala je okružena gustim grmljem i drvećem. Elektroribolovom je ulovljeno 10 potočnih mrena te nekoliko pastrva.

Ušće potoka Suhopoda i Šokota u potok Kašinu

Lokacija uzorkovanja nalazi se na Medvednici. Voda sporije otječe. Potok Kašina prolazi velikim dijelom kroz šumu koja ga zasjenjuje, a dijelovi su mu zarasli s grmljem. Dno

potoka Kašine je šljunkovito i kamenito, a obala je prekrivena kamenjem. Na kamenju u potoku su prisutne alge. Elektroribolovom je ulovljeno 8 potočnih mrena i nekoliko klenova.

Potok Burnjak

Potok Burnjak nalazi se na Medvednici te teče na granici između šume i polja. Voda mu je prozirna, dok se za vrijeme oborina zamuti. Dno potoka je šljunkovito, pjeskovito i muljevito s nekoliko većih kamenja obraslih algama i mahovinama. Korito potoka je većim dijelom prirodno i obraslo travom, a malim dijelom je utvrđeno (ispod mosta). Elektroribolovom ulovljene su potočne mreže, dvoprugaste uklije, klenovi, obične mreže i brkice.

Listovački potok

Listovački potok teče kroz naselje Brestik na Zrinskoj gori uz cestu i djelomično je zasjenjen. Dno mu je kamenito i pjeskovito, obala je zemljana, a u riparijskoj zoni raste drveće i grmlje. Elektroribolovom su ulovljene potočne mreže i brkice.

Potok Stupnica

Potok Stupnica teče blizu naselja Ljeskovac na Zrinskoj gori te je jako zasjenjen. Dno mu je prekriveno kamenjem, šljunkom, detritusom i s malo pijeska. Obala mu je zemljana i obrasla grmljem i drvećem. Uzorkovanje je provedeno ispod betonskog mosta. Elektroribolovom je ulovljen veliki broj pijora te mali broj peševa, brkica, dvoprugastih uklija, krkušica te samo jedna potočna mreža. Uočeni su riječni rakovi.

Potok Sunja

Potok Sunja teče u blizini naselja Begovići na Zrinskoj gori, kroz šumu koja je otvoreno lovište. Tok mu je jako spor, a dno je većinom prekriveno kamenjem te manjim dijelom šljunkom i pijeskom. Obala je zemljana, obrasla grmljem i drvećem.

Elektroribolovom je ulovljen veliki broj dvoprugastih uklija i klenova, te manji broj potočnih mrena, pijora, krkuša i brkica.

Potok Bubljen

Potok Bubljen teče uz cestu kroz šumu u blizini naselja Selakova poljana na Petrovoj gori. Voda je bistra, prozirna i bez mirisa. Okolnu vegetaciju čini gusto raslinje od drveća, grmlja i trave koje zasjenjuje potok. Obala je zemljana. Elektroribolovom su ulovljene 4 potočne mreže, veliki broj pijora te manji broj peševa i brkica.

Potok Brusovača

Potok Brusovača teče uz cestu blizu naselja Selakova poljana na Petrovoj gori. Dno potoka prekriveno je šljunkom i kamenjem, a obala mu je zemljana i obrasla travom i drvećem. Elektroribolovom je ulovljeno 5 potočnih mreža, veliki broj pijora te manji broj brkica, krkuša i klenova.

3.4. Izolacija genomske DNA

Ukupnu genomsku DNA iz trbušnih peraja izolirao sam pomoću kompleta kemikalija za izolaciju QIAGEN DNeasy Blood and Tissue na sljedeći način:

1. Svaki uzorak trbušne peraje usitnio sam škarcicama do veličine 0,1–0,2 cm te prenio usitnjeni materijal u zasebne epruvete kojima sam dodijelio kod.
2. U epruvete s usitnjenim uzorcima i kodom ispipetirao sam 180 μ L pufera ATL (pufer za lizu tkiva) koji služi za razaranje tkiva uzorka.
3. Dodao sam 20 μ L proteinaze K koja služi za razaranje staničnih membrana u epruvete s uzorcima i ATL puferom te sam nakon toga epruvete promiješao miješalicom Vortex desetak sekundi i stavio ih u vodenu kupelj na 56 °C preko noći.
4. Naredni dan izvadio sam uzorke u epruvetama iz vodene kupelji te ih promiješao miješalicom Vortex desetak sekundi i dodao 200 μ L pufera AL (pufer za lizu).
5. Uzorke sam opet promiješao miješalicom Vortex desetak sekundi i dodao 200 μ L etanola te ih opet promiješao miješalicom Vortex desetak sekundi.

6. Iz epruveta sam ispipetirao 650 μL uzorka (samo izolat, komadiće tkiva sam bacio) i stavio sadržaj u nove epruvete s membranom iz kompleta kemikalija QIAGEN DNeasy Blood and Tissue.
7. Epruvete s membranom sam stavio u centrifugu na 8000 okretaja u minuti (rpm) i 60 sekundi.
8. Donji dio epruvete s membranom sam bacio, a membranu prenio u novi donji dio iz kompleta kemikalija QIAGEN DNeasy Blood and Tissue. U tako pripremljenu novu epruvetu sam ispipetirao 500 μL pufera AW1 (pufer za ispiranje).
9. Epruvete s membranom sam stavio u centrifugu na 8000 rpm i 60 sekundi.
10. Donji dio epruvete s membranom sam bacio, a membranu prenio u novi donji dio iz kompleta kemikalija QIAGEN DNeasy Blood and Tissue. U tako pripremljenu novu epruvetu ispipetirao sam 500 μL pufera AW2 (pufer za ispiranje).
11. Epruvete s membranom stavio sam u centrifugu na 14000 rpm i 180 sekundi.
12. Donji dio epruvete s membranom sam bacio, a membranu prenio u novu Eppendorf epruvetu (ne iz kompleta kemikalija QIAGEN). Ispipetirao sam 150 μL pufera AE (pufer za eluciju) u novu epruvetu s membranom.
13. Nove epruvete s membranom stavio sam u centrifugu na 8000 rpm i 60 sekundi. Membrane sam nakon toga bacio. Epruvete s izolatom sam zatvorio i stavio na čuvanje u zamrzivač.

3.5. Lančana reakcija polimerazom

Početnica (Tablica 2) je kratka jednolančana nukleinska kiselina koju koriste svi živi organizmi za pokretanje sinteze DNA. Enzimi odgovorni za replikaciju DNA (DNA polimeraze) mogu dodavati nukleotide samo na 3' kraj postojeće nukleinske kiseline pa je potrebna početnica koja se veže za uzorak koji se replicira kako bi DNA polimeraza mogla započeti komplementarni lanac. Živi organizmi koriste isključivo RNA početnice, dok se u laboratoriju pri *in vitro* sintezama DNA (poput DNA sekvenciranja i lančane reakcije polimerazom) uobičajeno koriste DNA početnice koje su stabilnije na promjene temperature (Cox i sur., 2015).

Tablica 2. Popis korištenih oligonukleotidnih početnica za umnažanje mitohondrijskog *cyt b* gena.

IME POČETNICE	SEKVENCA POČETNICE (5'→3')	PROIZVOĐAČ
GluF	GAA GAA CCA CCG TTG TTA TTC (21mer)	Macrogen Inc.
ThrR	GAT CTT CGG ATT ACA AGA CC (20mer)	Macrogen Inc.

Napravio sam lančano umnažanje polimerazom mitohondrijskog gena za *cyt b*. Lančana reakcija polimeraze (PCR reakcija) je metoda kojom se sekvenca nukleinske kiseline može eksponencijalno umnožiti u *in vitro* uvjetima. Nužno je poznavati krajeve sekvence u dovoljnom detalju da se mogu sintetizirati oligonukleotidne početnice koje će se hibridizirati na njih.

U epruvetu za PCR stavio sam:

-12,5 µL mješavine kemikalija za PCR - smjesa tvari od proizvođača

-8,5 µL mješavine početnica - dvije oligonukleotidne početnice (Tablica 2) – uzvodna (engl. *reverse*) i nizvodna (engl. *forward*), boja, voda

-4 µL izolata DNA

Tako pripremljene epruvete stavio sam u uređaj za umnažanje PCR reakcijom (Tablica 3). Reakcija se odvijala u 35 ciklusa.

Tablica 3. Uvjeti korišteni za umnažanje mitohondrijskog gena za *cyt b* PCR reakcijom.

KORAK PCR REAKCIJE	TRAJANJE (min)	TEMPERATURA (°C)
Preddenaturacija	10:00	95,0
Denaturacija	35x00:45	92,0
Vežanje početnica	01:30	48,0
Produljenje lanca DNA	01:45	72,0
Finalno produljenje lanca DNA	7:00	72,0

3.6. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza je metoda kojom se mogu razdvojiti fragmenti molekula DNA, RNA i proteina i utvrditi njihove veličine prema veličinama fragmenata koje su već poznate. DNA molekula je električki negativno nabijena zbog fosfata. Zbog toga u električnom polju DNA molekula i njeni fragmenti putuju prema pozitivno nabijenoj anodi. Brzina putovanja fragmenata DNA ovisi o njihovoj veličini; kraći fragmenti putuju brže, dok veći fragmenti putuju sporije.

Pufer TAE je po svom sastavu tris (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Agarozni gel za elektroforezu pripremio sam otapanjem 1 g agaroze u 100 mL TAE pufera. Izlio sam smjesu u kalup te postavio u nju „češljice“ pomoću kojih se oblikuju jažice. Kada se gel skrutio, u svaku jažicu stavio sam 4 μ L uzorka iz PCR reakcije, a u posljednju jažicu 4 μ L genskog biljega (engl. *gene ruler*). Gel s uzorcima stavio sam u kadu za elektroforezu. Uvjeti pri kojima se odvijala elektroforeza bili su 120 V, 400 mA i 30 minuta. Kada je elektroforeza završila, stavio sam gel u otopinu etidij bromida na 30 minuta. Gel sam zatim izvadio i stavio ga u transiluminator gdje sam ga fotografirao pod UV svjetlom. Pregledom fotografija utvrdio sam uspješnost PCR reakcije.

3.7. Sekvenciranje

Uzorci s uspješno umnoženim *cyt b* genom poslani su u MacroGen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) na pročišćavanje i određivanje primarne strukture molekule DNA (sekvenciranje).

3.8. Računalne analize temeljene na nukleotidnim sekvencama

Dobivene sekvence sravnio sam i uredio u programu BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Prilikom sravnjivanja sekvenci uklonio sam loše očitane dijelove prije početka i nakon završetka odabranog gena te pregledao kromatograme radi mogućih pogrešaka pri očitavanju signala baze i preklapanju signala. Sve uočene pogreške ručno sam ispravio.

Od 96 analiziranih sekvenci, njih 9 je bilo neuspješno te sam ih izbacio iz daljnjih analiza. Osim 87 eksperimentalno dobivenih uspješnih sekvenci, za filogenetske analize koristio sam i sve sekvence vrste *Barbus balcanicus* dostupne u Banci gena (Tablica 4, www.ncbi.nlm.nih.gov). Za sekvence preuzete iz Banke gena nisu navedene geografske koordinate prikupljenih uzoraka, ali je poznato iz kojeg su vodotoka uzorkovane.

Tablica 4. Popis sekvenci gena za cyt *b* vrste *Barbus balcanicus* preuzetih iz Banke gena koje su korištene u računalnim analizama.

Ime sekvence	Pristupni kod	Referenca	Lokacija
S_DZEPSKA1	GQ302791	Markova i sur., 2010	Džepska rijeka, Srbija
S_DZEPSKA2	GQ302790	Markova i sur., 2010	Džepska rijeka, Srbija
S_TIMOK1	GQ302798	Markova i sur., 2010	Timok, Srbija
S_JADAR1	GQ302797	Markova i sur., 2010	Jadar, Srbija
BIH_VRBAS1	GQ302796	Markova i sur., 2010	Vrbas, Bosna i Hercegovina
HR_RIJEKA1	GQ302795	Markova i sur., 2010	Rijeka, Hrvatska
M_LEPENAC1	GQ302794	Markova i sur., 2010	Lepenac, Makedonija
M_LEPENAC2	GQ302793	Markova i sur., 2010	Lepenac, Makedonija
M_LEPENAC3	GQ302792	Markova i sur., 2010	Lepenac, Makedonija

Korištenjem računalnog programa DNAsp 6.12.03 (Rozas i sur., 2017) izračunao sam broj sekvenci (N), broj haplotipova (h), broj polimorfni mjesta (S), ukupan broj mutacija (η), raznolikost haplotipova (Hd), varijancu raznolikosti haplotipova (hd_var), nukleotidnu raznolikost (π) i prosječan broj nukleotidnih razlika (k).

Da bih utvrdio srodstvene odnose između populacija vrste *Barbus balcanicus* u Hrvatskoj i u odnosu na ostale europske populacije proveo sam filogenetske analize na sekvencama cyt *b* gena korištenjem metode najveće parsimonije (MP) i metode najveće vjerodostojnosti (ML) pomoću kojih sam dobio filogenetska stabla. Metodu susjednog sparivanja koristio sam za dobivanje filogenetske mreže.

Filogenetsku rekonstrukciju proveo sam pomoću računalnog programa MEGA 10.0.5 (Kumar i sur., 2018) i PAUP 4.0a166 (Swofford, 2002) korištenjem haplotipova iz ovog istraživanja, kao i onih preuzetih iz Banke gena. Analize metodama najveće parsimonije i najveće vjerodostojnosti proveo sam pod heurističkim modelom uz 100 ponavljanja,

nasumičnim unošenjem taksona te preklapanjem grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem (engl. *tree bisection-reconnection*, Nei i Kumar, 2000). Sva mjesta kodona i sve nukleotidne supstitucije imali su jednaku težinu. Podržanost grananja utvrdio sam analizom podržanosti (engl. *bootstrap analysis*) uz 1000 ponavljanja (Felsenstein, 1985) i 10 replika dodatnih sekvenci. Za ukorjenjenje stabla koristio sam sekvencu vrste *Barbus plebejus*, Bonaparte 1839 koja pripada u isti rod kao i vrsta *Barbus balcanicus*.

Analizu metodom susjednog sparivanja proveo sam pomoću računalnog programa Network 5.0.1.1. (Fluxus Technology Ltd.).

3.9. Protok gena

Analizom protoka gena pomoću programa Migrate dobio sam koeficijente migracije između populacija potočne mreže u Republici Hrvatskoj i Θ parametre. Stope migracije izračunao sam isključivo među populacijama unutar istih regija pomoću formule:

$$N_{x \rightarrow y} = M_{x \rightarrow y} \cdot \Theta_y$$

($N_{x \rightarrow y}$ – stopa migracije iz populacije x u populaciju y; $M_{x \rightarrow y}$ – koeficijent migracije, broj koji predstavlja koliko je imigracija u neku populaciju važnija u unošenju varijabilnosti u tu populaciju od mutacija, Θ_y – Theta parametar), a koeficijent migracije i Θ parametar sam dobio pomoću programa Migrate (Beerli, 2009).

4. REZULTATI

4.1. Genski polimorfizam

Genski polimorfizam potočne mreže prikazan je u tablici 5. Najveći broj haplotipova uočen je kod populacije iz potoka Kašine, dok je najmanji broj haplotipova utvrđen kod populacija iz potoka Željeznice i Listovačkog potoka. Najveći broj mutacija je prisutan kod populacije iz potoka Kašine. Uz populaciju iz potoka Kašine, jednak broj mutacija imaju i populacije iz potoka Sunje, Sarnog potoka, Žarovnice i Lonjice. Kod svih populacija broj polimorfničkih mjesta jednak je ukupnom broju mutacija. Najveća raznolikost haplotipova je uočena kod populacije iz potoka Rinovice, a zatim kod populacija iz potoka Velike Radetine,

Kašine i Sunje. Kod jedinki ulovljenih u potocima Stupnica i Pronjak nije bilo moguće odrediti mjere polimorfizma pošto nije bilo više od jedne sekvence za analizu.

Tablica 5. Genski polimorfizam potočne mreže u Hrvatskoj (N-broj sekvenci, h-broj haplotipova, S-broj polimorfni mjesta, η -ukupan broj mutacija, Hd-raznolikost haplotipova, hd_var-varijanca raznolikosti haplotipova, π -nukleotidna raznolikost, k-prosječan broj nukleotidnih razlika)

Lokalitet	N	h	S	η	Hd	Hd_var	π	k
Kašina	6	4	3	3	0,800	0,02963	0,00111	1,267
Burnjak	6	3	2	2	0,733	0,02407	0,00082	0,933
Vidovec	6	2	1	1	0,333	0,04630	0,00029	0,333
Stupnica	1	1	-	-	-	-	-	-
Listovački potok	3	1	0	0	0	0	0	0
Putnjak	9	3	2	2	0,750	0,00617	0,00088	1,000
Rijeka	8	3	2	2	0,679	0,01489	0,00097	1,107
Sarni potok	6	3	3	3	0,600	0,04630	0,00088	1,000
Sunja	5	3	3	3	0,800	0,02688	0,00140	1,600
Rinovica	2	2	1	1	1,000	0,25000	0,00088	1,000
Brusovača	5	2	2	2	0,400	0,05632	0,00070	0,800
Londža	3	2	2	2	0,667	0,09877	0,00117	1,333
Bublen	3	2	2	2	0,667	0,09877	0,00117	1,333
Pronjak	1	1	-	-	-	-	-	-
Željeznica	2	1	0	0	0	0	0	0
Žarovnica	5	2	3	3	0,400	0,05632	0,00105	1,200
Lonjica	6	2	3	3	0,533	0,02963	0,00140	1,600
Šumečica	6	2	1	1	0,533	0,02963	0,00047	0,533
Velika Radetina	4	3	2	2	0,833	0,04948	0,00088	1,000

4.2. Filogenetski odnosi

Metodama najveće vjerojatnosti (ML) i najveće parsimonije (MP) dobivena su dva filogenetska stabla (Slike 7 i 8) slične topologije, podržanosti i duljine grana. Filogenetska rekonstrukcija temeljena je na sekvencama gena *cyt b* dugim 1141 pb, od kojih je 1020 mjesta konstantno, a 121 varijabilno. Parsimonijski značajnih mjesta je 22, dok ostalih 99 varijabilnih mjesta nije informativno.

Utvrđena su ukupno 23 haplotipa vrste *Barbus balcanicus* (Tablice 6 i 7). Stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (Slika 8) ima nešto manju podržanost grananja od stabla dobivenog metodom najveće vjerojatnosti. Vidljiva je intraspecijska strukturiranost potočne mreže te prisutnost tri filogenetske linije među istraživanim sekvencama. Prvoj liniji pripadaju svi haplotipovi iz područja istraživanja (njih 15) te jedan haplotip s područja Republike Srbije (S_JADAR1) te jedan haplotip iz Bosne i Hercegovine (BIH_VRBAS1) iz prethodnih istraživanja. Drugoj liniji, koja je najbolje podržana, pripadaju haplotipovi preuzeti iz Banke gena s područja Republike Sjeverne Makedonije (M_LEPENAC1, M_LEPENAC2 i M_LEPENAC3). Haplotipovi iz druge linije imaju sestrinski položaj u odnosu na prvu liniju. Treća linija odnosi se na haplotipove iz Republike Srbije (S_DZEPSKA1, S_DZEPSKA2 i S_TIMOK1) koji su preuzeti iz Banke gena.

Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije opisano je sljedećim parametrima: duljina 133 koraka, CI: 0,9173, HI: 0,0827, RI: 0,8036 te RC: 0,7371.

Tablica 6. Prikazani su haplotipovi iz područja istraživanja (HAP1 – HAP15) i haplotipovi preuzeti iz Banke gena te njihove razlike u bazama gena za *cyt b* na određenim nukleotidnim mjestima. Sekvenca haplotipa HAP1 korištena je kao referentna sekvenca, a prazna polja označavaju istu nukleotidnu bazu kao kod referentne sekvence. Korištene su kratice za nukleotidne baze: C – citozin, G – gvanin, A – adenin, T – timin.

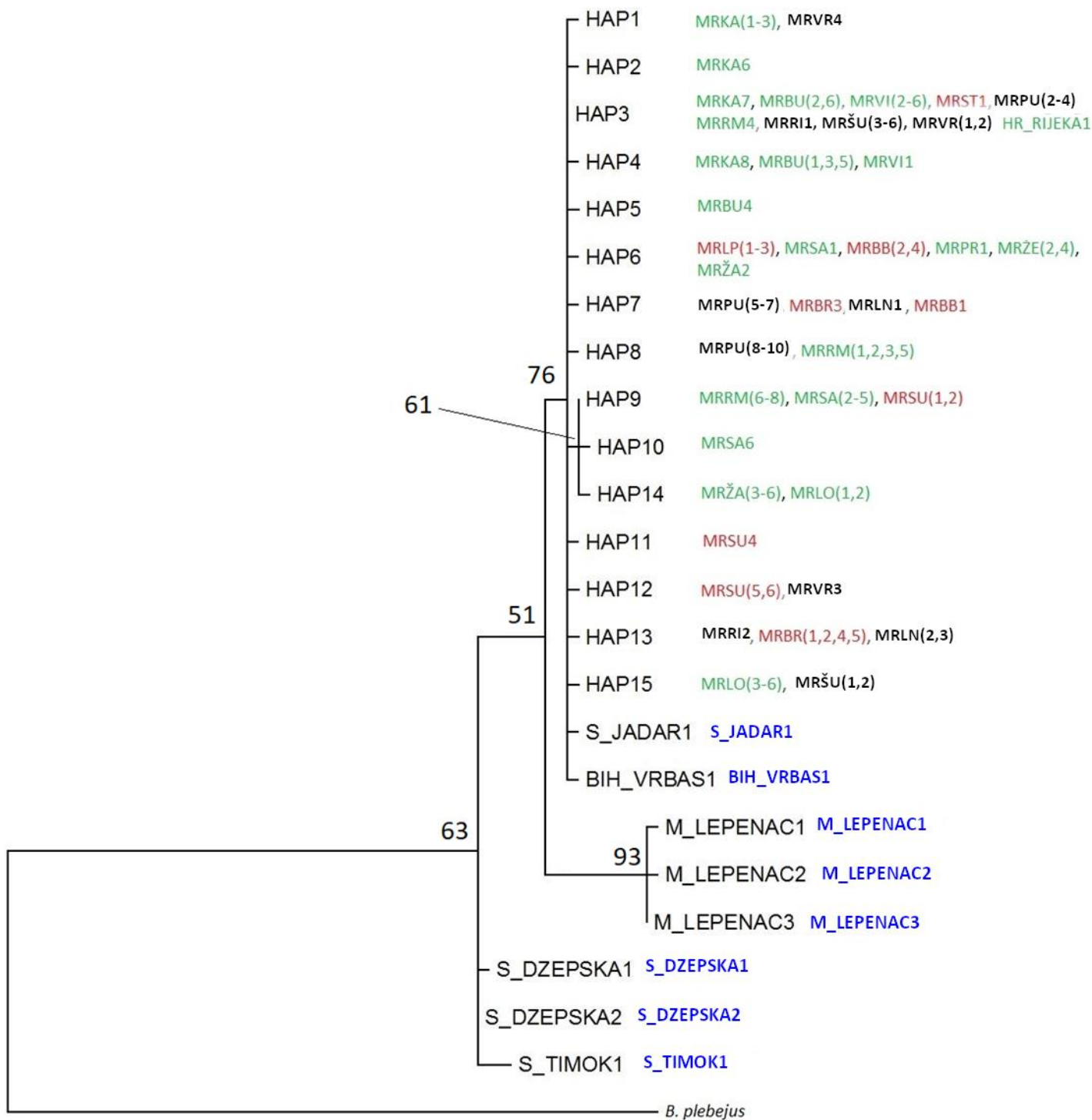
Haplotip	Pozicija																																									
	18	78	84	159	213	219	244	330	339	351	352	360	396	465	468	485	528	531	562	576	597	648	687	693	727	789	804	846	909	930	998	999	1062	1080	1096	1119	1140					
HAP1	G	T	A	G	A	G	A	G	A	G	G	G	T	A	A	G	A	G	C	C	A	A	A	G	T	C	A	T	A	T	C	G	A	G	A	T						
HAP2																		A																				C				
HAP3																		A																								
HAP4																		A																								
HAP5																		A																								
HAP6											A							A																								
HAP7																		A																								
HAP8																		A																								
HAP9																		A																								
HAP10																G		A																								
HAP11																G		A																								
HAP12																		A																								
HAP13																		A																								
HAP14																		A																								
HAP15																		A																								
S_DZEPSKA1	A	C		A														A																								
S_DZEPSKA2	A	C		A														A																								
S_TIMOK1	A	C		A														A																								
S_JADAR1																		A																								
BIH_VRBAS1																		A																								
M_LEPENAC1	A			A	G													A	G	A																						
M_LEPENAC2	A			A	G													A	G	A																						
M_LEPENAC3	A			A	G													A	G	A																						

Tablica 7. Popis utvrđenih haplotipova vrste *Barbus balcanicus* i njihova frekvencija

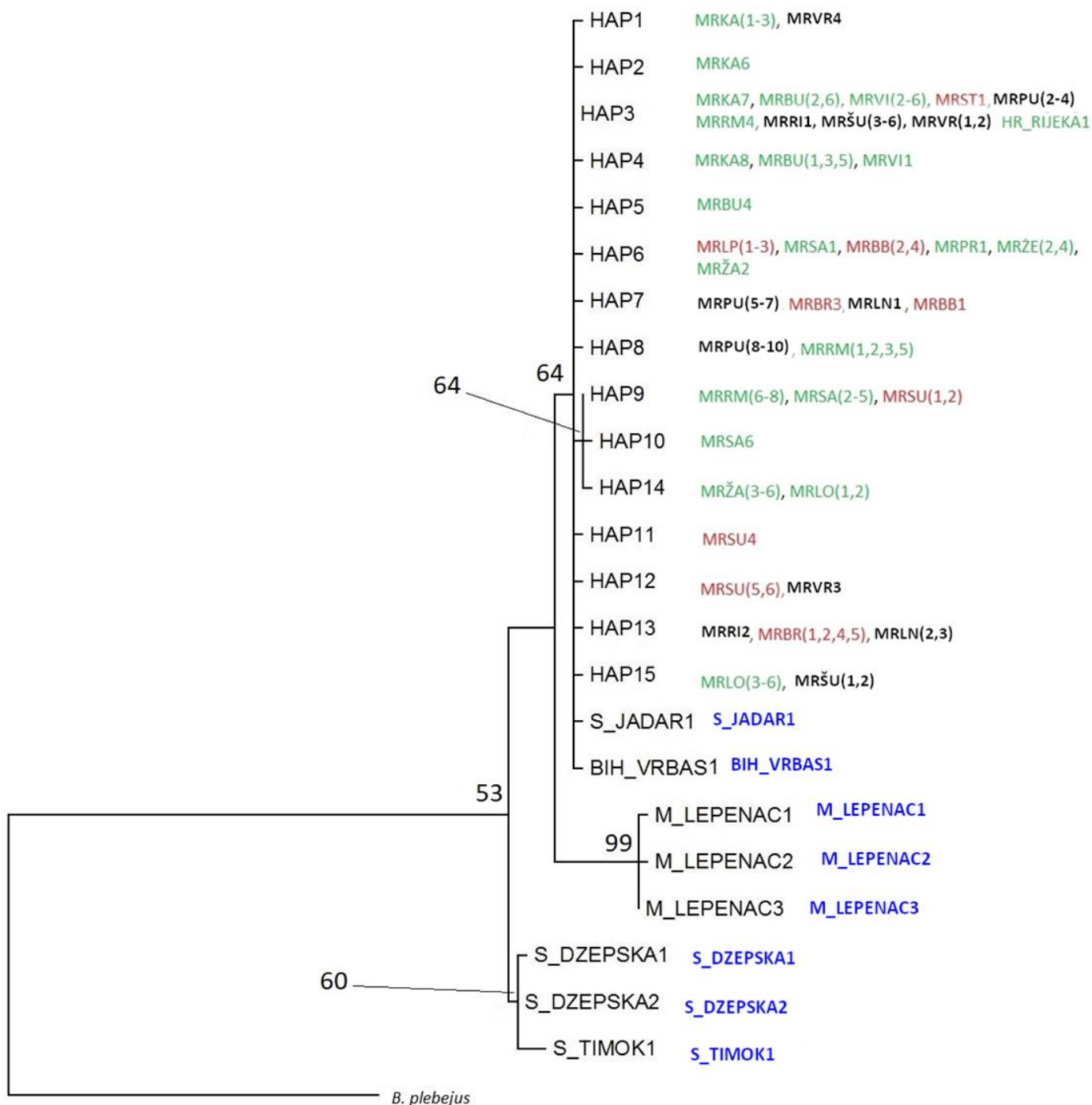
Ime haplotipa	Sekvence	Frekvencija haplotipa izražena u postotku jedinki u kojima je prisutan neki haplotip u odnosu na ukupni broj ulovljenih jedinki
HAP1	MRKA1, MRKA2, MRKA3, MRVR4	4,16
HAP2	MRKA6	1,04
HAP3	MRKA7, MRBU2, MRBU6, MRVI2, MRVI3, MRVI4, MRVI5, MRVI6, MRST1, MRPU2, MRPU3, MRPU4, MRRM4, MRRI1, MRŠU3, MRŠU4, MRŠU5, MRŠU6, MRVR1, MRVR2, HR_RIJEKA1	21,87
HAP4	MRKA8, MRBU1, MRBU3, MRBU5, MRVI1	5,2
HAP5	MRBU4	1,04
HAP6	MRLP1, MRLP2, MRLP3, MRSA1, MRBB2, MRBB4, MRPR1, MRŽE2, MRŽE4, MRŽA2	10,42
HAP7	MRPU5, MRPU6, MRPU7, MRBR3, MRLN1, MRBB1	6,25
HAP8	MRPU8, MRPU9, MRPU10, MRRM1, MRRM2, MRRM3, MRRM5	7,29
HAP9	MRRM6, MRRM7, MRRM8, MRSA2, MRSA3, MRSA4, MRSA5, MRSU1, MRSU2	9,37
HAP10	MRSA6	1,04
HAP11	MRSU4	1,04

Tablica 7. Nastavak

HAP12	MRSU5, MRSU6, MRVR3	3,12
HAP13	MRRI2, MRBR1, MRBR2, MRBR4, MRBR5, MRLN2, MRLN3	7,29
HAP14	MRŽA3, MRŽA4, MRŽA5, MRŽA6, MRLO1, MRLO2	6,25
HAP15	MRLO3, MRLO4, MRLO5, MRLO6, MRŠU1, MRŠU2	6,25
S_DZEPSKA1	S_DZEPSKA1	1,04
S_DZEPSKA2	S_DZEPSKA2	1,04
S_TIMOK1	S_TIMOK1	1,04
S_JADAR1	S_JADAR1	1,04
BIH_VRBAS1	BIH_VRBAS1	1,04
M_LEPENAC1	M_LEPENAC1	1,04
M_LEPENAC2	M_LEPENAC2	1,04
M_LEPENAC3	M_LEPENAC3	1,04

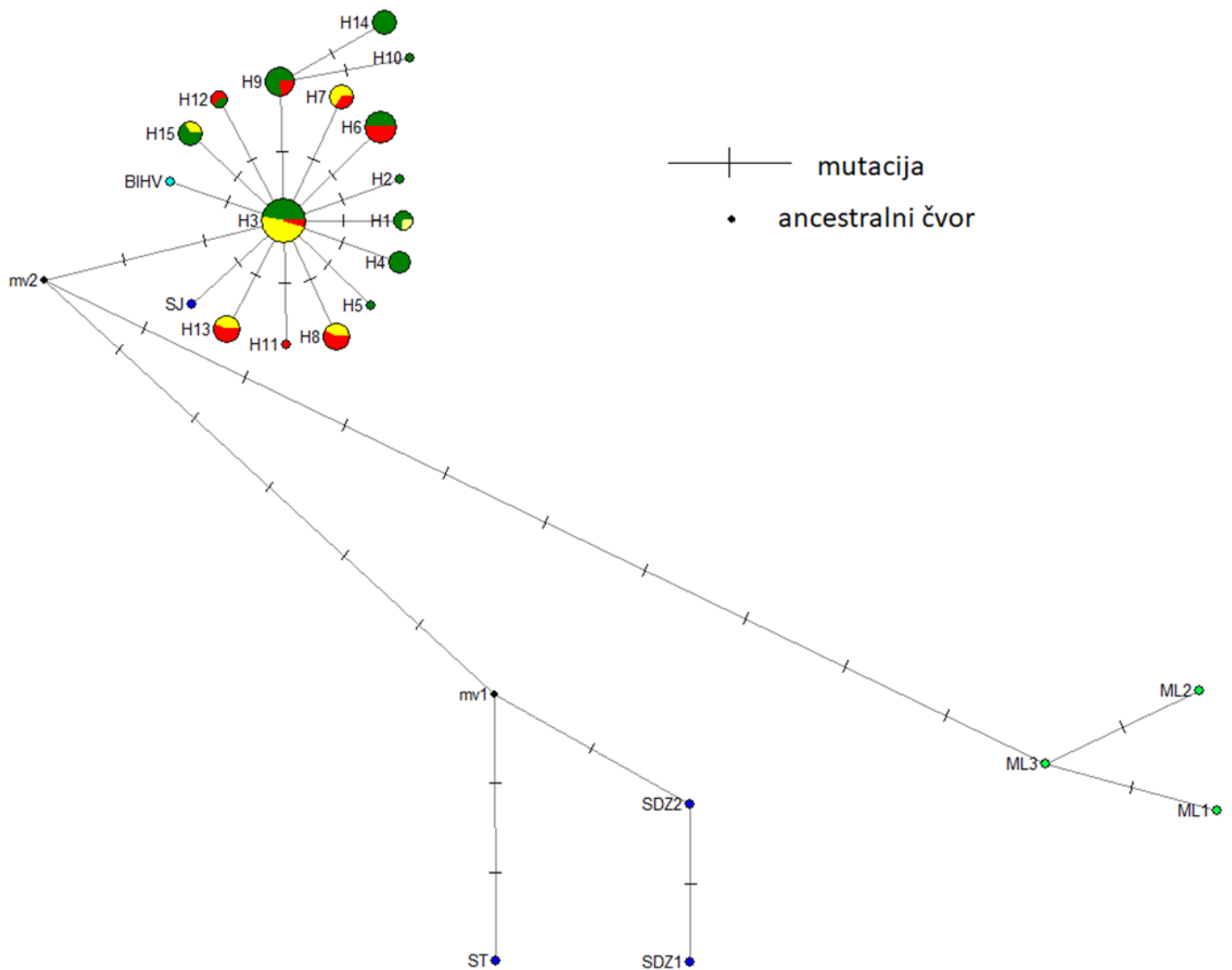


Slika 7. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju mitohondrijskog gena *cyt b*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Pored naziva haplotipa navedene su i sekvence koje sadrže taj haplotip. Bojom su označene regije iz koje potječu sekvence (crveno – Banovina i Petrova gora, crno – Slavonija, zeleno – Medvednica i Zagorje, plavo – sekvence iz Banke gena).



Slika 8. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju mitohondrijskog gena *cyt b*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Pored naziva haplotipa navedene su i sekvence koje sadrže taj haplotip. Bojom su označene regije iz koje potječu sekvence (crveno – Banovina i Petrova gora, crno – Slavonija, zeleno – Medvednica i Zagorje, plavo – sekvence iz Banke gena)

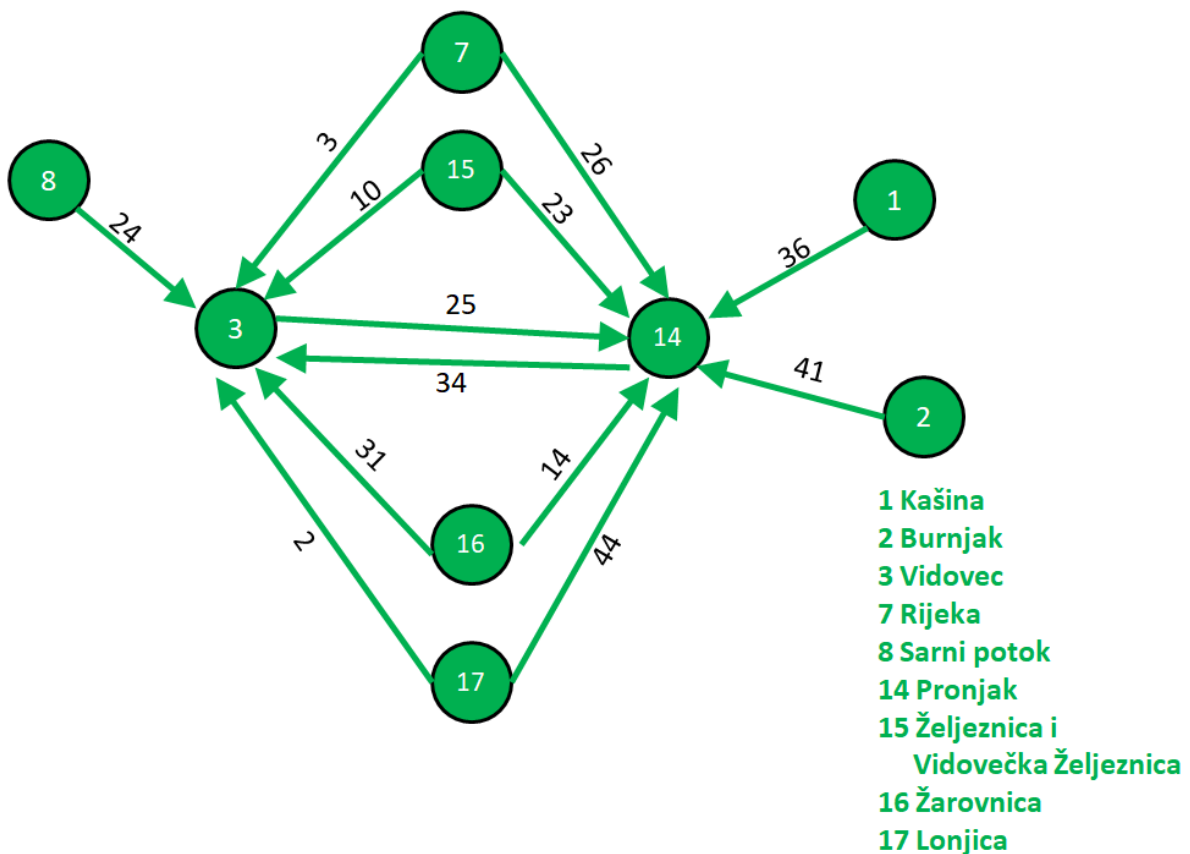
Dobivena filogeografska mreža (Slika 9) poput filogenetskih stabala pokazuje tri grupe haplotipova. Grupa haplotipova iz područja istraživanja ima karakterističan zvjezdoliki oblik u čijem se centru nalazi haplotip HAP3 koji predstavlja pretka iz kojeg su nastali ostali haplotipovi iz područja istraživanja kao i haplotip S_JADAR1 te haplotip BIH_VRBAS1. Haplotip HAP3 zastupljen je u sve tri regije iz područja istraživanja, a najviše se pojavljuje kod jedinki ulovljenih u regijama Zagorje i Medvednica te u regiji Slavonija.



Slika 9. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog sparivanja. Promjer krugova proporcionalan je s frekvencijom haplotipa. Haplotipovi su isti kao i na filogenetskim stablima samo sa skraćenim nazivom (H umjesto HAP, ML umjesto M_LEPENAC1, BIHV umjesto BIH_VRBAS1, SJ umjesto S_JADAR1, ST umjesto S_TIMOK1, SJ umjesto S_JADAR1, SDZ umjesto S_DZEPSKA). Bojom su označene regije iz kojih potječu sekvence te njihov udio u haplotipovima (crveno – Banovina i Petrova gora, žuto – Slavonija, zeleno – Medvednica i Zagorje). Haplotipovi BIHV, SJ, ST, SDZ1, SDZ2, ML1, ML2 i ML3 su iz Banke gena.

4.3. Protok gena

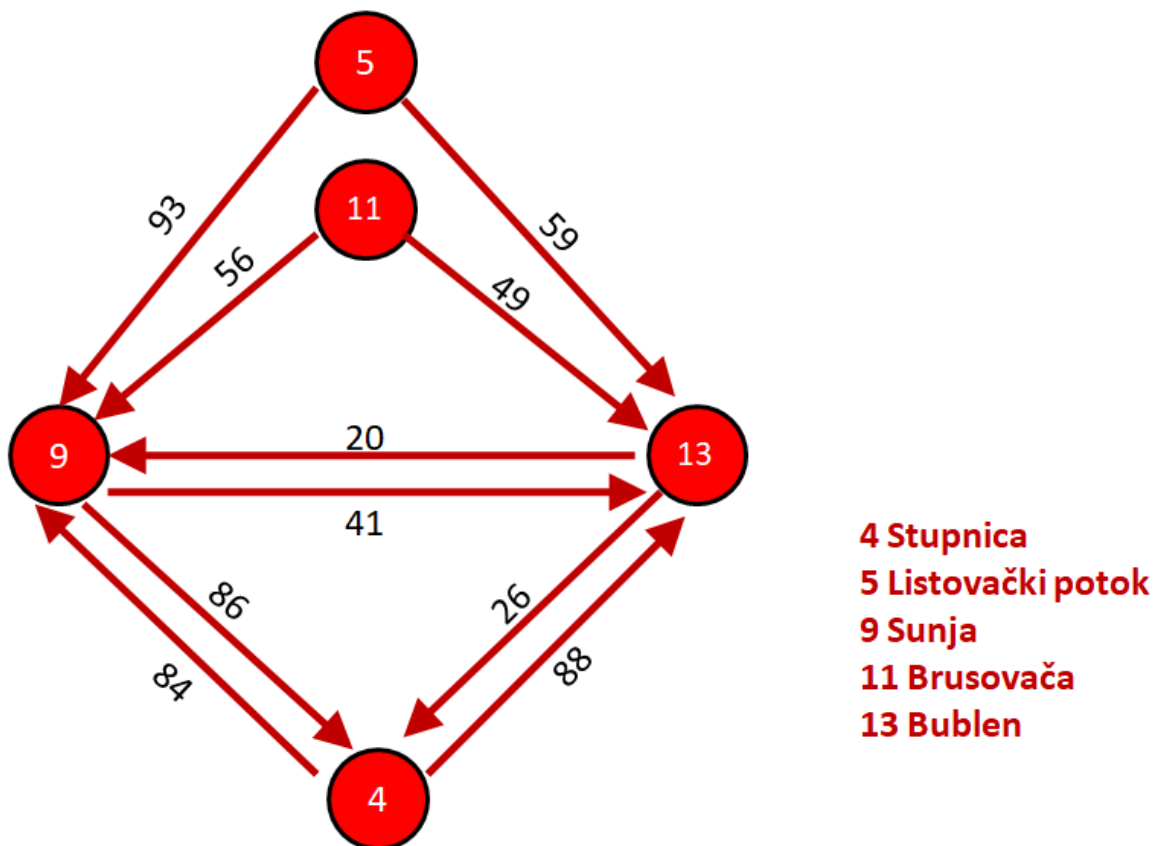
Izračunom stopa migracija pomoću Bayesove metode dobivene su prosječne vrijednosti broja migranata koji migriraju između populacija po generaciji, a odnose se na razdoblje tijekom evolucijske povijesti koje završava s recentnim razdobljem. Između određenih populacija broj migranata je blizu vrijednosti nule što može biti posljedica sličnosti među sekvencama iz tih populacija.



Slika 10. Shematski prikaz protoka gena između populacija unutar regije Zagorje i Medvednica. Unutar krugova su brojeke koje reprezentiraju populacije. Imena potoka u kojima su te populacije su napisana sa strane s njihovim pripadajućim brojem. Strelice označavaju smjer migracije, a broj pored strelice predstavlja broj jedinki koji migrira.

Kod populacija iz regija Zagorje i Medvednica (Slika 10) može se primijetiti struktura metapopulacije. Populacije iz potoka Kašine, Burnjaka, Rijeke, Sarnog potoka,

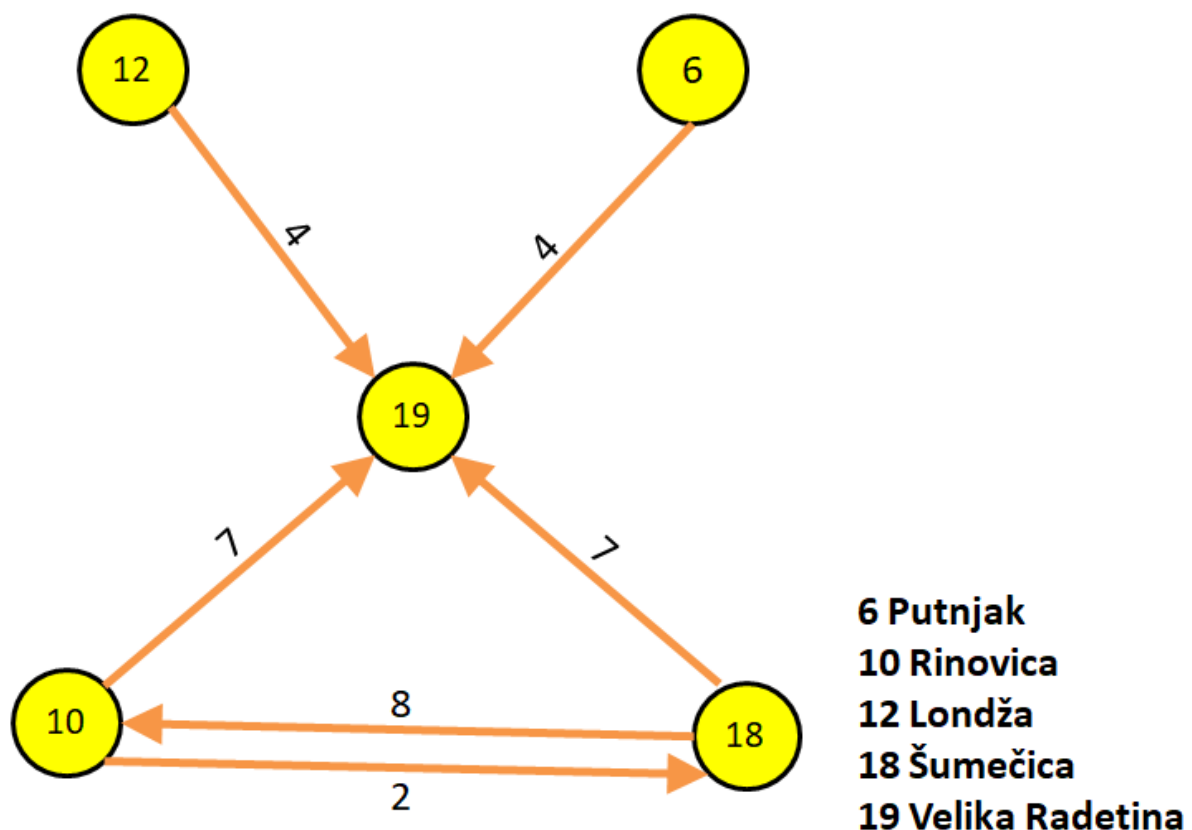
Željeznice i Vidovečke Željeznice, Žarovnice i Lonjice isključivo su izvorišne populacije, odnosno iz njih jedinke emigriraju u populacije u potocima Vidovec i Pronjak. U populacije iz potoka Vidovca i Pronjaka uglavnom imigriraju jedinke iz ostalih populacija. Populacije iz potoka Pronjaka i Vidovca međusobno razmjenjuju jedinke u skoro podjednakom broju. Najveći broj jedinki koji imigrira primijećen je kod populacije iz potoka Lonjice, gdje 44 jedinke po generaciji imigriraju u populaciju iz potoka Pronjaka. Primijećeno je da veći broj jedinki imigrira u populaciju iz potoka Pronjaka, nego što ih imigrira u populaciju iz potoka Vidovca.



Slika 11. Shematski prikaz protoka gena između populacija unutar regija Petrova gora i Banovina. Unutar krugova su brojevi koje reprezentiraju populacije. Imena potoka u kojima su te populacije su napisana sa strane s njihovim pripadajućim brojem. Strelice označavaju smjer migracije, a broj pored strelice predstavlja broj jedinki koji migrira.

Populacije u regijama Petrova gora i Banovina (Slika 11) također imaju strukturu metapopulacije. Populacije iz Listovačkog potoka i Brusovače pripadaju izvorišnim populacijama i iz njih jedinke isključivo imigriraju u populacije iz Sunje i Bublenu. Populacije iz potoka Stupnice, Sunje i Bublenu su mješovitog tipa, odnosno pripadaju i

prihvatnim i izvorišnim populacijama. Stopa migracija između populacija iz potoka Sunje i Stupnice je podjednaka, tj. podjednak broj jedinki emigrira iz potoka Sunje u potok Stupnicu, kao i iz potoka Stupnice u potok Sunju. Otprilike dvostruko više jedinki imigrira iz Sunje u Bublenu nego što ih imigrira iz Bublenu u Sunju, dok je broj jedinki koje imigriraju iz Bublenu u Stupnicu otprilike četverostruko veći nego što ih imigrira iz Stupnice u Bublenu. Najveći brojevi jedinki koje imigriraju primijećeni su kod sljedećih migracija: 88 jedinki iz populacije u potoku Bublenu imigrira u populaciju iz potoka Stupnice, 86 jedinki iz populacije u potoku Stupnica imigrira u populaciju iz potoka Sunjete 84 jedinke iz populacije iz potoka Sunje u potok Stupnicu.



Slika 12. Shematski prikaz protoka gena između populacija unutar regije Slavonija. Unutar krugova su brojke koje reprezentiraju populacije. Imena potoka u kojima su te populacije su napisana sa strane s njihovim pripadajućim brojem. Strelice označavaju smjer migracije, a broj pored strelice predstavlja broj jedinki koji migrira.

Kod populacija u Slavoniji (Slika 12) primijećena je najjednostavnija struktura metapopulacije. Broj jedinki koje su migrirale iz jedne populacije u drugu nije veći od 8. Populacije iz potoka Londže i Putnjaka pripadaju isključivo izvorišnim populacijama. Populacija iz potoka Velike Radetine je isključivo prihvatna populacija. Populacije iz potoka

Rinovice i Šumečice pripadaju mješovitim populacijama, odnosno populacijama koje su ujedno i prihvatne i izvorišne. Populacije iz potoka Rinovice i Šumečice jedine međusobno izmjenjuju jedinke i to populacija iz potoka Šumečice prima četverostruko više jedinki nego što ih emigrira iz nje u populaciju iz potoka Rinovice.

5. RASPRAVA

S obzirom na to da se prvi put istražuje genska struktura i raznolikost potočne mreže u Hrvatskoj, literatura je ograničena. Filogenetskim stablima i mrežom dobivenima analizom sekvenci mitohondrijskog gena za *cyt b* potočne mreže utvrđeno je da je vrsta dobro strukturirana. Rezultati ukazuju na postojanje tri filogenetski različite i evolucijski odvojene grupe haplotipova: hrvatsku, makedonsku i srpsku. Utvrđen je i veliki broj haplotipova za relativno malo geografsko područje te broj nastalih mutacija nije veći od tri. Dobivena filogenetska mreža pokazuje da svi haplotipovi iz područja istraživanja potječu od jednog ancestralnog haplotipa. Grupa haplotipova iz područja istraživanja na filogenetskoj mreži je zvjezdolikog oblika što je vjerojatno posljedica nedavne i brze kolonizacije, vjerojatno nakon završetka glacijacija.

Na filogenetskim stablima uočena je recipročna monofilija potočne mreže koja sugerira relativno dugotrajnu restrikciju protoka gena između populacija iz različitih grupa haplotipova (Avice i Wollenberg, 1997). Dobivena stabla pokazala su srednju podržanost zbog toga što je analiza rađena na sekvencama male raznolikosti, odnosno sekvencama iste vrste pa je njihova rezolucija slabija.

Analizom genske raznolikosti potočne mreže uočena je različita nukleotidna raznolikost (0,00029 – 0,00140). Raznolikost haplotipova je umjerena do visoka, a najviša je ona iz potoka Velike Radetine, Kašine i Sunje. Najniža raznolikost haplotipova prisutna je kod populacija iz Listovačkog potoka i Željeznice gdje je u čitavom uzorku i jednog i drugog potoka prisutan samo jedan haplotip. Niska nukleotidna raznolikost i mala raznolikost haplotipova vjerojatno je posljedica negativnog utjecaja klimatskih promjena tijekom pleistocena te ograničenja dostupnosti staništa vrste i njihove mogućnosti za migriranjem (Dynesius i Jansson, 2000). Kod populacije iz potoka Željeznice moguće da je razlog niske genske raznolikosti izgradnja retencije za obranu od poplava. Populacije potočne mreže iz područja istraživanja pokazuju dosta visoku genetsku homogenost što je moguće rezultat

efekta uskog grla (engl. *bottleneck effect*), odnosno moguće da su klimatske promjene tijekom pleistocena imale negativan utjecaj na populacije potočne mreže iz područja istraživanja. Druga moguća hipoteza koja bi objasnila ovako niske raznolikosti podrazumijeva efekt osnivača (engl. *founder effect*). Efekt osnivača pretpostavlja da je vrsta tek nedavno u evolucijskoj povijesti kolonizirala ove prostore i da se nije stigla razviti genska raznolikost. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio točan razlog.

Pretpostavlja se da su populacije u južnijim područjima koja su bila manje ometana klimatskim promjenama divergirale u puno dužim vremenskim periodima što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja na primjerima grupe haplotipova s područja Makedonije i grupe haplotipova s područja jugoistočne Srbije. Balkanski poluotok predstavlja jedan od najbitnijih refugijskih areala u Europi (Hewitt, 2000, Taberlet i sur., 1998) te rezultati ovog istraživanja upućuju na postojanje više glacijalnih refugija za vrstu potočne mreže. Ovakve pretpostavke i rezultati su u skladu s istraživanjem vrste *Barbus petenyi* za koju se utvrdilo da je zapravo kompleks od tri vrste koje su se razdvojile tijekom pliocena među kojima je i potočna mreža (Kotlik i Berrebi, 2002, Kotlik i sur., 2002). Geografski gledano refugij makedonske linije vjerojatno se nalazio na području rijeke Vardar i njenih pritoka dok je refugij istočno-srpske linije vjerojatno bio smješten na području južnih Karpata.

Prema filogeografskoj mreži, ancestralni haplotip za grupu haplotipova iz područja istraživanja je HAP3. Jedinke koje pripadaju haplotipu HAP3 najvećim brojem potječu iz regija Zagorje i Medvednica te iz regije Slavonija. Sve jedinke koje pripadaju haplotipu HAP3 potječu iz potoka koji su indirektni pritoci rijeke Save te je za pretpostaviti da su upravo rijeka Sava i njeni pritoci bili glacijalni refugij za vrstu potočne mreže na području Hrvatske.

Stope migracija u ovom istraživanju su različite. Najviše su na području Banovine i Požeške gore, nešto niže za područje Medvednice i Zagorja, a najniže su u regiji Slavonija i vjerojatno su rezultat genetske sličnosti između populacija. U regiji Banovina i Požeška gora populacije iz potoka Brusovače i Listovačkog potoka su isključivo izvorišne populacije, a sve ostale populacije izmjenjuju međusobno jedinke. U regiji Zagorje i Medvednica sve populacije su izvorišnog tipa osim onih iz potoka Vidovca i Pronjaka (koji su mješovitog tipa). U regiji Slavonija isključivo izvorišne populacije nalaze se u potocima Putnjaku i Lonži dok su populacije iz potoka Šumečice i Rinovice mješovitog tipa. Radi održavanja varijabilnosti između populacija unutar regija bitno je zaštititi izvorišne populacije, odnosno

njihova staništa. Izvorišne populacije s velikim brojem emigranata po generaciji održavaju stabilnost metapopulacije, a kada bi se staništa izvorišnih populacija poremetila antropološkim djelovanjem ili pojavom bolesti, cijela metapopulacija bi doživjela stres.

Genska raznolikost nekih izvorišnih populacija potočne mreže je srednja do niska (populacije iz potoka Željeznice, Žarovnice, Lonjice, Šumečice, Brusovače, Vidovca i Listovačkog potoka). Potočnu mrežu najviše ugrožavaju onečišćenja i regulacije vodotoka. Ovaj podatak je zabrinjavajuć zato što neki lokaliteti s populacijama potočne mreže pokazuju znakove onečišćenja i regulacije vodotokova. Potok Željeznica pokazao je izrazito nisku gensku raznolikost populacije potočne mreže i na njemu je izgrađena retencija za obranu od poplava (<http://www.varazdinska-zupanija.hr>). Regulacija vodotoka i/ili kanaliziranje izgrađena je ili se planira graditi i na potocima Žarovnici (<https://evarazdin.hr>) na kojem je ujedno i prisutnost otpada antropogenog porijekla, Vidovcu (prisutni znaci onečišćenja), Burnjaku (<https://ogportal.com>), Putnjaku (<https://mzoe.gov.hr>), Rinovici (<http://www.bpz.hr>), Londži (<https://www.voda.hr>) na kojoj su vidljivi i znaci onečišćenja i Pronjaku (<http://www.kzz.hr>). Iako je genska raznolikost populacija iz Burnjaka, Putnjaka, Rinovice i Londže umjerena do visoka, pitanje je kako će ti zahvati utjecati u budućnosti na gensku raznolikost tih populacija te na stabilnost metapopulacija u njihovim regijama.

Da bi se očuvala potočna mreža i održala stabilnost metapopulacija iz područja istraživanja potrebno je čim prije razviti mjere zaštite i očuvanja ove vrste te njenih staništa, a pogotovo staništa u kojima je prisutan veliki broj jedinki koje emigriraju. Potočna mreža u Hrvatskoj je na Crvenom popisu slatkovodnih riba kao osjetljiva vrsta, a osjetljive vrste su vrste suočene s visokim rizikom od izumiranja (Mrakovčić i sur., 2006). Potrebno je osnovati ihtiološki tim za područje Hrvatske koji bi napravio dodatne analize staništa i vijabilnosti potočne mreže te razvio i proveo mjere za monitoring staništa koja održavaju stabilnost metapopulacija te staništa s niskom genskom raznolikosti. Takvim staništima trebalo bi ispitati razinu onečišćenja i strogo regulirati zahvate na vodotokovima. Prisutna onečišćenja trebaju se sanirati u što kraćem roku. U slučaju povećanja rizika od izumiranja potočne mreže na području Hrvatske potrebno bi bilo osnovati ihtiološke rezervate za potočnu mrežu.

6. ZAKLJUČAK

- Utvrđena je prisutnost populacija potočne mreže u potocima na području Banovine, Petrove gore, Medvednice, Zagorja, Papuka, Krđnije i Požeške gore.
- Filogenetskim analizama utvrđena je strukturiranost vrste potočne mreže i postojanje tri grupe haplotipova: hrvatske, makedonske i srpske.
- Liniju iz područja istraživanja (Hrvatske) karakterizira veliki broj haplotipova umjerene do visoke raznolikosti te niska nukleotidna raznolikost što ukazuje na nedavnu kolonizaciju vrste.
- Populacije potočne mreže iz područja istraživanja bile su pod utjecajima klimatskih promjena tijekom pleistocena koje su najvjerojatnije utjecale na njihovu gensku raznolikost.
- Rijeka Sava i njeni pritoci su najvjerojatnije bili glacijalni refugij za potočnu mrežu na području Hrvatske.
- Utvrđene su strukture metapopulacija na području Banovine i Petrove gore, Medvednice i Zagorja te Papuka, Krđnije i Požeške gore.
- Izvorišne populacije utječu na stabilnost metapopulacija.
- Potočnu mrežu ugrožava onečišćenje vodotoka, nestajanje prirodnih i mriješnih staništa, pregradnja rijeka i regulacija gornjih tokova rijeka.
- Potrebno je zaštititi staništa izvorišnih populacija potočne mreže koja utječu na stabilnost metapopulacija.

7. LITERATURA

- Alexander, R. M. (1962): The structure of the Weberian apparatus in the Cyprini. Proceedings of the Zoological Society of London, **139**: 451–473.
- Avise, J.C., Wollenberg, K. (1997): Phylogenetics and the origin of species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **94**: 7748–7755.
- Berli, P. (2009): How to use mIGRATE or why are markov chain monte carlo programs difficult to use. Population Genetics for Animal Conservation, **17**: 42–79.
- Berrebi, P. (1995): Speciation of the genus *Barbus* in the north Mediterranean Basin: Recent advances from biochemical genetics. Biological Conservation, **72**: 237–249.
- Bohlin, T., Hamrin, S., Heggberget, T., Rasmussen, G., Saltveit, S. J. (1989): Electrofishing - Theory and Practice with Special Emphasis on Salmonids. Hydrobiologia, **173**: 9–43.
- Bogut, I., Novoselić, D., Pavličević, J. (2006): Biologija riba. Poljoprivredni fakultet. Osijek.
- Brown, W. M., George, M., Wilson, A. C. (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **76** (4): 1967–71.
- Buj, I., Marčić, Z., Čaleta, M., Šanda, R., Geiger, M. F., Freyhof, J. (2017): Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes). PLoS ONE, **12** (12): e0187366.
- Buj, I., Šanda, R., Marčić, Z., Čaleta, M., Mrakovčić, M. (2014): Combining morphology and genetics in resolving taxonomy—A systematic revision of spined loaches (Genus *Cobitis*; Cypriniformes, Actinopterygii) in the Adriatic Watershed. PLoS ONE, **9** (6): e99833.
- Buonerba, L. (2010): Phylogeography of Italian barbels (Cyprinidae, *Barbus*) inferred by mitochondrial and nuclear markers. Doktorska disertacija, University of Insubria.

- Cox, M., Doudna, J. A., O'Donnell, M. (2015): *Molecular Biology: Principles and Practice*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Dynesius, M., Jansson, R. (2000): Evolutionary consequences of changes in species' geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**: 9115–9120.
- Economidis, P. S., Sorič, V. M., Bănărescu, P. M. (2003): *Barbus peloponnesius* Valenciennes, 1842. U: Bănărescu, P. M., Bogutskaya, N.G. (ur.) *The freshwater fishes of Europe. 5/II Cyprinidae 2, part II: Barbus*. AULA-Verlag. Wiebelsheim.
- Esposti, D. M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., Meyer, A. (1993): Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1143**: 243–271.
- Farias, I., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H., Meyer, A. (2001): The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular Evolution*, **53**: 89–103.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783–791.
- Frankham, R., Briscoe, D. A., Ballou, J. D. (2002): *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Hall, T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95–98.
- Hewitt, G.M. (2000): The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**: 907–913.
- Holmlund, C. M., Hammer, M. (1999): Ecosystem services generated by fish populations. *Ecological Economics*, **29**: 253–268.
- Ismail, S., Essawi, M. (2012): Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*, **1** (2): 57–63.
- Jakšić, G. (2018): *Slatkovodne ribe Aquatike*. Javna ustanova Aquatika – Slatkovodni akvarij. Karlovac.

- Kardong, K. V. (2011): Vertebrates Comparative Anatomy, Function, Evolution Sixth edition. McGraw-Hill Education.
- Kolesnikov, A. A., Gerasimov, E. S. (2012): Diversity of mitochondrial genome organization. *Biokhimiia*, **77** (13): 1424–35.
- Kotlik, P., Berrebi, P. (2002): Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic barb *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **24**: 10–18.
- Kotlik, P., Tsigenopoulos, C.S., Rab, P., Berrebi, P. (2002): Two new *Barbus* species from the Danube River basin, with redescription of *B. petenyi* (Teleostei: Cyprinidae). *Folia Zoologica*, **52** (3): 227–240.
- Kottelat, M., Freyhof, J. (2007): Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Crnol, Switzerland and Freyhof, Berlin.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**: 1547–1549.,
- Lauder, G. V., Liem, K. F. (1983): The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, **150**: 95–197.
- Machodrom, A., Doadrio, I. (2001): Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. *The Royal Society London*, **268**: 1297–1306.
- Marić, S. D., Rakočević, J. V., Marić, D. S. (2012): Morphological characteristics of barbels (*Barbus*, Cyprinidae) from the waters of Montenegro. *Natura Montenegrina*, **11** (1): 79–92.
- Miloš, M. (2002): Prehrana potočne mreže (*Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb i Berrebi, 2002). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Mrakovčić, M., Brigić, A., Buj, I., Čaleta, M., Mustafić, P., Zanella, D. (2006): Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture. Zagreb.

- Nei, M., Kumar, S. (2000): *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nelson, J. S. (2006): *Fishes of the World*. 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Okumus, I., Ciftci, Y. (2003): Fish population genetics and molecular markers: II- Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **3**: 51–79.
- Radović, J. (1999): Pregled stanja biološke i krajobrazne raznolikosti Hrvatske sa strategijom i akcijskim planovima zaštite. Državna uprava za zaštitu prirode i okoliša, Zagreb.
- Riđanović, J. (1993): Hidrogeografija. Školska knjiga, Zagreb.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. W., Sanchez-Gracia, A. (2017): DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **34**: 3299–3302.
- Saccone, C., Gissi, C., Lanave, C., Larizza, A., Pesole, G., Reyes, A. (2000): Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene*, **261**: 153–159.
- Sallan, L. C. (2014): Major issues in the origin of ray-finned fish (Actinopterygii) biodiversity. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **89**: 950–971.
- Simonović, P. D., Nikolić, V. P. (1996): Freshwater fish of Serbia: An annotated checklist with some faunistic and zoogeographical considerations. *Bios*, **4**: 137–156.
- Sofradžija, A. (2009): *Slatkovodne ribe Bosne i Hercegovine*. Vijeće Kongresa bošnjačkih intelektualaca. Sarajevo.
- Swofford, D. L. (2002): PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4 [Computer software and manual]. Sinauer Associates. Sunderland.
- Tsigenopoulos, C. S., Berrebi, P. (1999): The North Mediterranean *Barbus* lineage: Phylogenetic hypotheses and taxonomic implications based on allozyme data. *Journal of Fish Biology*, **54**: 267–286.

Tsigenopoulos, C.S., Ráb, P., Naran, D., Berrebi, P. (2002): Multiple origins of polyploidy in the phylogeny of Southern African barbs (Cyprinidae) as inferred from mtDNA markers. *Heredity*, **88** (6): 466–473.

West-Eberhard, M. J. (2003): *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press. Oxford.

Žutinić, P., Jelić, D., Jelić, M., Buj, I. (2014): A contribution to understanding the ecology of the large spot barbel – sexual dimorphism, growth and population structure of *Barbus balcanicus* (Actinopterygii; Cyprinidae) in Central Croatia. *North-Western Journal of Zoology*, **10** (1): 158–166.

Internet izvori

<https://www.smith-root.com/support/kb/how-do-i-select-the-right-electrofisher/>

(preuzeto 5.11.2019.)

<https://digitalcollections.lib.washington.edu/digital/collection/fishimages/id/51826/rec/1>

(preuzeto 15.10.2019.)

http://www.varazdinska-zupanija.hr/repository/public/2018/6-informacije/svibanj/12_SUO_za_javnu_raspravu.pdf (preuzeto 31.1.2020.)

<https://evarazdin.hr/nasim-krajem/u-tijeku-je-uredenje-vodotoka-potoka-zarovnica-366801/> (preuzeto 31.1.2020.)

https://mzoe.gov.hr/UserDocsImages/UPRAVA-ZA-PROCJENU-UTJECAJA-NA-OKOLIS-ODRZIVO-GOSPODARENJE-OTPADOM/Opuo/16_04_2019_Elaborat_Retencija_Resetarica.pdf (preuzeto 31.1.2020.)

http://www.bpz.hr/_Data/Files/12_2019/7b.pdf (preuzeto 31.1.2020.)

https://www.voda.hr/sites/default/files/clanak/bp_3_-_provedbeni_plan_obrane_od_poplava.pdf (preuzeto 31.1.2020.)

http://www.kzz.hr/sadrzaj/natjecaji/potok-toplicina-informacija-zahtjev-ocjena-o-potrebi-procjene-utjecaja-na-okolis/KZ%C5%BD_Topli%C4%8Dina_Elaborat_za%C5%A1tite_okoli%C5%A1a_revizija.pdf (preuzeto 31.1.2020.)

<https://ogportal.com/2017/09/24/retencija-burnjak-jedna-najvecih-retencija-hrvatskoj/>

(preuzeto 14.2.2020.)

8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Vatroslav Veble

Mjesto rođenja: Karlovac

Obrazovanje

2016. – DIPLOMSKI STUDIJ – Diplomski studij znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

Srpanj 2017. DWA Train the Trainer – certificirani DWA trener (3 dana)

Studeni 2016. Trening „Separatori masnoće“ (1 dan)

Siječanj – lipanj 2016. Edukacija za tehničko osoblje na UPOV-u (30 dana)

2012. – 2016. PREDDIPLOMSKI STUDIJ – Preddiplomski studij znanosti o okolišu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

2010. – 2012. PREDDIPLOMSKI STUDIJ – Preddiplomski studij računarstva, Fakultet elektrotehnike i računarstva, Unska 3, 10000 Zagreb

2006. – 2010. SREDNJA ŠKOLA – Opća gimnazija Karlovac, 47000 Karlovac

1998. – 2006. OSNOVNA ŠKOLA – Osnovna škola Braća Seljan, 47000 Karlovac

Radno iskustvo

1.9. 2017. – direktor tvrtke Veble i Veble d.o.o.

Volontiranje

2010. – 2012. član planinarske udruge KSET-a

2012. 17. filmska revija mladeži i 5th four river film festival

2012. Riječno kino u Karlovcu (2012)

2011. Riječno kino u Karlovcu (2011)

2011. 16. filmska revija mladeži i 4th four river film festival

Vještine

- Rad na računalu (Microsoft Windows, Microsoft Office)
- poznavanje jezika – engleski (aktivno), njemački (pasivno)
- vozačka dozvola za B kategoriju vozila