

# Genska struktura i raznolikost zavičajnih i stranih vrsta pastrva na području Plitvičkih jezera

---

Novoselec, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:934757>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Lucija Novoselec

**Genska struktura i raznolikost zavičajnih i stranih vrsta pastrva na području Plitvičkih jezera**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Lucija Novoselec

**Genetic structure and diversity of the native  
and alien trout species in the Plitvice Lakes  
area**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kralješnjake i zaštitu prirode na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Buj. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre struke znanosti o okolišu.

## ZAHVALA

---

*Veliko hvala mojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Buj na pruženoj prilici, izrazitom strpljenju i dobroti te pružanju nesebične potpore i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Puno hvala Luciji i Sari na velikodušnoj pomoći u labosu te svakom savjetu i potpori.*

*Hvala svim mojim prijateljima, a posebno Andrei koja je uvijek bila tu za mene.*

*Najveće hvala mojoj obitelji, naročito mami, tati i sestri koji su mi uvijek bili najveća podrška i bez čijeg razumijevanja i ljubavi ne bih sada bila tu gdje jesam.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Genska struktura i raznolikost zavičajnih i stranih vrsta pastrva na području Plitvičkih jezera

Lucija Novoselec

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Dvije srodne vrste pastrva, *Salmo trutta* Linnaeus, 1758 i *Salmo labrax* Pallas, 1814, nastanjuju područje Plitvičkih jezera. *Salmo labrax* je zavičajna vrsta na navedenom području gdje je zabilježena i prisutnost njezinih čistih populacija koje su rijetkost u ostatku Europe. Za razliku od nje, *S. trutta* je na promatranom području strana vrsta te negativno utječe na opstanak *S. labrax*. Nadalje, prisustvo invazivne vrste *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), eutrofikacija te izgradnja brana i pregrada također ugrožavaju populacije *S. labrax* kojima prijete izumiranje. Cilj ovog istraživanja bio je napraviti filogenetsku rekonstrukciju, odrediti evolucijsku povijest i osnovne mjere genske raznolikosti te utvrditi protok gena i migracije između populacija tri navedene vrste kako bi se dobio bolji uvid u njihove odnose. Analize sam provela na temelju sekvenci gena za citokrom *b* i kontrolne regije korištenjem metode najveće parsimonije, metode najveće vjerojatnosti, metode susjednog povezivanja te *Bayesove* metode. Dobiveni rezultati potvrđuju da je vrsta *S. labrax* zavičajna, dok su *S. trutta* i *O. mykiss* unesene iz više različitih izvora na promatrano područje. Utvrđena je vrlo niska genska raznolikost zavičajne vrste, pogotovo njezinih čistih populacija, kao i zanemarive migracije između njih, dok više vrijednosti genske raznolikosti zabilježene kod unesenih vrsta upućuju na njihov viši evolucijski potencijal i bolju prilagodljivost.

Ključne riječi: atlantska pastrva, dunavska pastrva, kalifornijska pastrva, populacijska genetika, konzervacija

(68 stranica, 22 slike, 10 tablica, 103 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelji:

doc. dr. sc. Zoran Marčić

doc. dr. sc. Ivan Čanjevac

prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović

Rad prihvaćen: 08.09.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### Genetic structure and diversity of the native and alien trout species in the Plitvice Lakes area

Lucija Novoselec

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Two related trout species, *Salmo trutta* Linnaeus, 1758 and *Salmo labrax* Pallas, 1814, inhabit the Plitvice Lakes area. *S. labrax* is native to the area where its pure populations, considered rare in the rest of Europe, have been recorded. However, *S. trutta* is considered an alien species there and negatively affects the survival of *S. labrax*. The presence of the invasive *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), eutrophication and the construction of dams and barriers also pose a threat to *S. labrax*. The aim of this study was to make a phylogenetic reconstruction and determine the evolutionary history, basic measures of genetic diversity, gene flow and migrations of three observed species in order to gain a better insight into their relationships. I based the analysis on cytochrome *b* gene and control region sequences using the methods of maximum parsimony, maximum likelihood, median joining and the Bayesian analysis. The results confirm *S. labrax* is native, while *S. trutta* and *O. mykiss* were introduced from several different sources to the observed area. Low genetic diversity of *S. labrax*, especially its pure populations, as well as insignificant migration rates between them, were determined. Higher values of genetic diversity of introduced species indicate their evolutionary potential.

Keywords: Danube trout, Atlantic trout, Rainbow trout, population genetics, conservation

(68 pages, 22 figures, 10 tables, 103 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Ivana Buj, PhD

Reviewers:

Asst. Prof. Zoran Marčić, PhD

Asst. Prof. Ivan Čanjevac, PhD

Prof. Blanka Cvetko Tešović, PhD

Thesis accepted: 08.09.2022.

# SADRŽAJ

---

1. UVOD.....	1
1.1. Opće značajke porodice Salmonidae.....	1
1.1.1. Opće značajke potporodice Salmoninae s naglaskom na rodove <i>Salmo</i> i <i>Oncorhynchus</i> .....	1
1.2. Opće značajke vrste <i>Salmo trutta</i> Linnaeus, 1758.....	2
1.2.1. Morfologija i ekologija vrste <i>Salmo trutta</i> .....	2
1.2.2. Rasprostranjenost vrste <i>Salmo trutta</i> u Europi.....	3
1.2.3. Ugroženost i invazivnost vrste <i>Salmo trutta</i> .....	5
1.3. Opće značajke vrste <i>Salmo labrax</i> Pallas, 1814.....	6
1.3.1. Morfologija i ekologija vrste <i>Salmo labrax</i> .....	6
1.3.2. Rasprostranjenost vrste <i>Salmo labrax</i> u Europi.....	7
1.3.3. Ugroženost vrste <i>Salmo labrax</i> .....	8
1.4. Opće značajke vrste <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792).....	9
1.4.1. Morfologija i ekologija vrste <i>Oncorhynchus mykiss</i> .....	9
1.4.2. Rasprostranjenost vrste <i>Oncorhynchus mykiss</i> na svjetskoj razini.....	10
1.4.3. Ugroženost i invazivnost vrste <i>Oncorhynchus mykiss</i> .....	11
1.5. Taksonomski položaji i odnosi proučavanih vrsta pastrva.....	12
1.6. Teoretske postavke i primjena metoda populacijske genetike i filogenetske rekonstrukcije te genskih markera.....	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	17
3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA – šire područje Plitvičkih jezera.....	18
4. MATERIJALI I METODE.....	26
4.1. Popis korištenih kemikalija, opreme i računalnih programa.....	26
4.1.1. Terenska oprema za prikupljanje uzoraka.....	26
4.1.2. Laboratorijska oprema i kemikalije.....	26
4.1.3. Računalni programi.....	27
4.2. Prikupljanje uzoraka.....	27
4.3. Laboratorijski postupci (izolacija DNA, umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje).....	29
4.4. Filogenetska rekonstrukcija.....	31
4.5. Određivanje intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti proučavanih vrsta pastrva.....	32
4.6. Određivanje evolucijske povijesti proučavanih vrsta pastrva.....	33



4.7. Određivanje efektivne veličine i povezanosti populacija proučavanih vrsta pastrva.....	33
5. REZULTATI.....	35
5.1. Filogenetski odnosi proučavanih vrsta pastrva šireg područja Plitvičkih jezera.....	35
5.1.1. Rezultati analiza gena za citokrom <i>b</i> ( <i>cyt b</i> ) .....	35
5.1.2. Rezultati analiza temeljeni na sekvencama kontrolne regije (CR) .....	39
5.2. Rasprostranjenost i zastupljenost pojedinih haplotipova proučavanih vrsta pastrva određenih na temelju gena za citokrom <i>b</i> .....	44
5.3. Intraspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost proučavanih vrsta pastrva.....	46
5.3.1. Rezultati analiza gena za citokrom <i>b</i> ( <i>cyt b</i> ) .....	46
5.3.2. Rezultati analiza temeljeni na sekvencama kontrolne regije (CR) .....	48
5.4. Evolucijska povijest proučavanih vrsta pastrva određena na temelju gena za citokrom <i>b</i> .....	49
5.5. Efektivna veličina i povezanost populacija proučavanih vrsta pastrva određene na temelju gena za citokrom <i>b</i> .....	50
6. RASPRAVA.....	53
7. ZAKLJUČAK.....	58
8. LITERATURA.....	59
9. ŽIVOTOPIS	

# 1. UVOD

## 1.1. Opće značajke porodice Salmonidae

Salmonidi ili pastrve (porodica Salmonidae) su srednje do velike ribe rasprostranjene na području sjeverne polutke, no zbog njihove komercijalne važnosti u vidu akvakulture i rekreacijskog ribolova unesene su i u ostale dijelove svijeta. Nastanjuju gotovo uvijek bistru i hladnu vodu koja je dobro opskrbljena kisikom, obitavajući često na području brzih, izvorišnih dijelova riječnih vodotoka, preferirajući kamenita i šljunkovita dna, iako mogu biti prisutne i u jezerima (Kottelat i Freyhof 2007). Jedinke koje obitavaju u morima ili estuarijskim područjima su anadromne, što znači da migriraju u slatke vode na mrijest (Nelson 2006). Osim parnih prsnih i trbušnih peraja te neparne repne i podrepne peraje, karakterizira ih prisutnost jedne leđne peraje bez bodlji te masne peraje bez perajnih šipčica. Osim toga, imaju specifično građenu nepčanu (*os palatinum*) i raličnu (*os vomer*) kost na kojima su prisutni zubi (Kottelat i Freyhof 2007; Nelson 2006).

### 1.1.1. Opće značajke potporodice Salmoninae s naglaskom na rodove *Salmo* i *Oncorhynchus*

Porodica Salmonidae sadrži tri potporodice: Coregoninae, Thymallinae i Salmoninae. Potporodici Salmoninae pripadaju rodovi *Brachymystax*, *Parahucho*, *Salvethymus*, *Hucho*, *Salvelinus*, *Oncorhynchus* i *Salmo* (Lažiu i sur. 2020; Stearley i Smith 1993), od kojih su posljednja tri roda najproučavanija (Klemetsen i sur. 2003). Pripadnike ovih rodova karakteriziraju male ljuste, s više od 110 ljustaka na području bočne pruge. Osim toga, kod ovih skupina zabilježeno je manje od 16 šipčica u leđnoj peraji te je uočena prisutnost zubi na čeljusnoj kosti (*os maxillare*). Pastrve koje pripadaju rodovima *Salmo* i *Oncorhynchus* provode većinu života u slatkim vodama gdje se i mrijeste, a nakon mrijesta najčešće ne umiru (Nelson 2006). Iako je njihova evolucijska povijest vrlo raznolika, a područje rasprostranjenosti gotovo cijela Europa, pojedine populacije zavičajnih vrsta (*Salmo labrax* Pallas, 1814) vrlo su ugrožene ljudskim aktivnostima, prvenstveno unosom stranih salmonidnih vrsta (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) na područje njihovog obitavanja čime dolazi do stvaranja hibrida i genskog onečišćenja zavičajnih populacija (Kottelat i Freyhof 2007). Još jednu univerzalnu prijetnju predstavlja im i nekontrolirano širenje invazivnih vrsta koje uspostavljanjem stabilnih populacija na područjima gdje se ne smatraju zavičajnima remete normalno funkcioniranje cijelih ekosustava (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) (Stanković i sur. 2015).

## 1.2. Opće značajke vrste *Salmo trutta* Linnaeus, 1758

### 1.2.1. Morfologija i ekologija vrste *Salmo trutta*

Atlantska pastrva (*Salmo trutta*) specifična je zbog svoje sposobnosti prilagođavanja okolišu u kojem se nalazi, što je ujedno omogućilo njezinu široku rasprostranjenost (Bernatchez i sur. 1992; Apostolidis i sur. 1997). Zbog toga jedinke ove vrste mogu drugačije izgledati u različitim staništima; njihova boja može varirati od tamnije sive, smeđe te zelene na dorzalnoj strani, do svjetlije sive, žute i bijele boje na ventralnoj strani tijela. Također, karakteriziraju ih brojne točke različite veličine prisutne na trupu, a najčešće su crne ili crvene boje (Slika 1) (Kottelat i Freyhof 2007). Osim toga, ova vrsta može imati i više različitih oblika, zbog čega će različite populacije imati različite fenotipske karakteristike. To znači da se fenotipska plastičnost vrste očituje u morfološkim razlikama između njezinih različitih oblika (Pakkasmaa i Piironen 2001). No, razlike nisu uočene samo na razini morfologije, već i ekologije te ponašanja jedinki (Apostolidis i sur. 1997). Za vrstu *Salmo trutta* opisana su 3 oblika: „morski oblik“ (anadromni) koji život započinje u slatkim vodama, najčešće potoku, no migrira u more ili estuarijsko područje gdje se hrani, a na mrijest se vraća u isti potok; „jezerski oblik“ (potamodromni) koji zbog mrijesta migrira iz potoka u jezero; te „potočni oblik“ koji ne migrira u druga vodena tijela već čitav život provede u potoku. Općenito, različiti oblici mogu stvarati potomstvo koje ima sposobnost migrirati u različita staništa, iako postoje slučajevi kada se dva različita oblika iste vrste ponašaju kao dvije zasebne vrste (populacije su reproduktivno izolirane i neovisne jedna o drugoj) (Kottelat i Freyhof 2007; Bernatchez i sur. 1992). Čimbenici koji utječu na životni ciklus jedinki su okolišni, ali i genetski (Kottelat i Freyhof 2007; Pakkasmaa i Piironen 2001).



**Slika 1.** Fotografija vrste *Salmo trutta* (preuzeto s <https://commons.wikimedia.org/>).

Jedinke atlantske pastrve općenito postaju spolno zrele između prve i desete, no najčešće između druge i treće godine života (Klemetsen i sur. 2003; Kottelat i Freyhof 2007). Ustanovljeno je da mužjaci postaju ranije spolno zreli od ženki, a uz to je prisutan i spolni dimorfizam (Klemetsen i sur. 2003). Mrijest se odvija u jesen ili zimu, najčešće između listopada i ožujka, u potocima iznad kamenog ili šljunčanog dna. Mužjaci su vrlo teritorijalni te čuvaju svoju ženku od drugih mužjaka, dok su ženke zadužene za brigu oko gnijezda koje grade na dnu u supstratu gdje nakon mrijesta zakopaju oplođena jaja. Ona prolaze proces inkubacije najmanje jedan, a moguće i nekoliko mjeseci, nakon čega se, najčešće između ožujka i srpnja, iz njih izlegnu ličinke sa žumanjčanom vrećom kao izvorom hrane (Klemetsen i sur. 2003; Kottelat i Freyhof 2007). Nakon što potroše svu dostupnu hranu, mlađ izlazi iz gnijezda u potrazi za hranom. U tome su razdoblju vrlo agresivni, kompetitivni i teritorijalni, a jedinke koje se ne mogu izboriti za hranu ili druge resurse najčešće ugibaju ili postaju plijen predatorskih životinja. Preživjele jedinke koje su uspjele započeti sa samostalnom prehranom migrirat će na novo stanište kada dosegnu određenu veličinu zbog koje im je potrebno više prostora i hrane za život. Mlade jedinke uglavnom se hrane ličinkama kukaca redova Diptera (porodice Chironomidae i Simuliidae), Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera, a mogu se hraniti i zooplanktonom, kukcima s površine koji upadnu u vodu te raznim drugim beskralježnjacima, kao što su rakovi ili mnogočetinaši. Nakon što dosegnu određenu veličinu (15 cm) ili dob (4 godine) počinju se hraniti i drugom ribom. Ovu vrstu općenito smatramo oportunistom i vizualnim predatorom, tako da njezina prehrana uvelike ovisi o uvjetima u staništu i godišnjem dobu, ali i veličini te dobi jedinki (Klemetsen i sur. 2003).

### **1.2.2. Rasprostranjenost vrste *Salmo trutta* u Europi**

Atlantska pastrva široko je rasprostranjena vrsta, zavičajna za područje Euroazije, konkretnije Europe i zapadne Azije, te sjeverne Afrike (Bernatchez i sur. 1992; Elliott i Hurley 2000). Prirodno područje pojavljivanja vrste proteže se od Islanda na zapadu preko sjeverne Norveške i sjeveroistočnog dijela istočne Rusije na sjeveru, preko planine Ural i pritoka Aralskog jezera na istoku, kao i planine Atlas u sjevernoj Africi i obale Sredozemnog mora na jugu do zapadne obale Europe (Bernatchez i sur. 1992; Elliott 1994). Što se tiče „morskog oblika“ ove vrste, on je prisutan na Islandu i u Skandinaviji, rijekama koje utječu u Bijelo more te Čoški zaljev, kao i Baltičko i Sjeverno more, pa sve do Biskajskog zaljeva te Atlantika kod sjevernog Portugala (Frost i Brown 1967). Osim toga, može zaći i u Crno more i Kaspijsko jezero (Elliott 1994). No, vrsta je zbog svoje ekonomske važnosti u vidu rekreacijskog ribolova,

ribarstva te akvakulture unesena u najmanje 24 države izvan Europe, kao i brojne europske zemlje u kojima se smatra stranom vrstom: Italija, Sjeverna i Južna Amerika, države južne te planinskog dijela istočne Afrike, Pakistan, Indija, Nepal, Japan, Novi Zeland i Australija (Meraner i sur. 2012; Elliott 1994; Kottelat i Freyhof 2007). S druge strane, europske države u kojima se smatra zavičajnom vrstom su: Andora, Austrija, Bjelorusija, Belgija, Hrvatska, Češka, Danska, Estonija, Farski otoci, Finska, Francuska, Njemačka, Guernsey, Mađarska, Island, Irska, Otok Man, Jersey, Latvija, Lihtenštajn, Litva, Luksemburg, Nizozemska, Norveška, Poljska, Portugal, Rumunjska, Rusija, Srbija, Slovačka, Slovenija, Španjolska, Švedska, Švicarska, Ukrajina i Ujedinjeno Kraljevstvo (Slika 2) (Freyhof 2011a). No, bitno je uzeti u obzir da ne moraju i sve populacije ove vrste u navedenim zemljama biti zavičajne na području koje nastanjuju. Tako postoje slučajevi unosa ove vrste na neko područje gdje prirodno ne obitava, iako se radi o državi u kojoj je zavičajna, te se ondje ona smatra stranom vrstom.



**Slika 2.** Rasprostranjenost vrste *Salmo trutta* na području Europe i dijela zapadne Azije. Narančasto obojenje prikazuje zemlje u kojima je zavičajna, a ljubičasto obojenje područje u koje je unesena kao strana vrsta (preuzeto i prilagođeno iz Freyhof 2011a).

### 1.2.3. Ugroženost i invazivnost vrste *Salmo trutta*

Ova široko rasprostranjena vrsta klasificirana je kao najmanje zabrinjavajuća (LC) na Crvenom popisu ugroženih vrsta Međunarodnog saveza za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava (engl. *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*, IUCN) (Freyhof 2011a), dok se u Hrvatskoj ona smatra osjetljivom (VU) (Mrakovčić i sur. 2006). Na globalnoj razini, vrsta je ugrožena različitim antropogenim djelovanjima, uključujući izgradnju brana te preusmjeravanje vodnih tijela (Koljonen i Kallio-Nyberg 1991), onečišćenje vodenih ekosustava (Henriksen i sur. 1989; Hesthagen i sur. 1999; Koljonen i Kallio-Nyberg 1991), prekomjerni izlov i korištenje u komercijalne svrhe (Koljonen i Kallio-Nyberg 1991), unos invazivnih vrsta u njezina staništa te puštanje ili bijeg (migracije) jedinki iz stranih ili genski značajno drukčijih populacija ove vrste, posebice jedinki iz uzgoja, što za posljedicu može imati njihovu hibridizaciju sa zavičajnim populacijama te uzrokovati gensko onečišćenje divljih populacija (Taggart i Ferguson 1986; Apostolidis i sur. 1996; Apostolidis i sur. 1997; Garcia-Marin i sur. 1991; Ryman i Ståhl 1980, Ryman i Ståhl 1981; Martínez i sur. 1993; Hansen i sur. 1997). Navedeni čimbenici mogu uzrokovati uništavanje, degradaciju te fragmentaciju staništa vrste, što za posljedicu može imati izolaciju određenih populacija te nemogućnost protoka gena među njima. Zbog toga dolazi do smanjenja genske raznolikosti populacija, a time i njihovog fitnesa, odnosno mogućnosti preživljavanja (Buj i sur. 2020). Antropogeni utjecaji na divlje populacije u njihovim prirodnim staništima danas su nažalost gotovo neizbježni, a Hrvatska nije iznimka. Zabilježeni negativni utjecaji na populacije ove vrste u našim vodotocima uključuju regulaciju vodotoka i izgradnju brana kojima se značajno mijenja vodni režim te vrsti onemogućuju migracije na područje mrijesta (Mrakovčić i sur. 2006). Još jedan istaknuti problem je i sječa šuma uz same vodotoke jer se time mijenjaju mikroklimatski uvjeti staništa, pogotovo ljeti kada drveće stvara hlad nad vodotokom onemogućujući da temperature u njemu narastu preko optimalne za pastvrce; temperatura je za ovu vrstu ograničavajući faktor, a optimalna iznosi najviše 18-20 °C (Mrakovčić i sur. 2006; Elliott i Hurley 2000; Ojanguren i sur. 2001). Imajući to na umu, klimatske promjene i sve izraženiji efekti globalnog zagrijavanja zasigurno će imati negativan utjecaj na rasprostranjenost, ali i preživljavanje ove vrste (Mangel 1994). Također, poribljavanje vodotoka, odnosno unos jedinki iz stranih i genski značajno drukčijih populacija zabilježeno je i kod nas, a vrlo štetno utječe na gensku raznolikost zavičajnih populacija (Mrakovčić i sur. 2006). Bitno je naglasiti i okolišnu važnost salmonidnih vrsta kroz njihovu ulogu u održavanju zdravlja vodenih ekosustava te očuvanju biološke raznolikosti (Lažiu i sur. 2020). Upravo je

zbog svega navedenog za ovu vrstu izrađen plan upravljanja s akcijskim planom sa svrhom zaštite i očuvanja vrste, no njegove smjernice još nisu implementirane i ne provode se.

No, unatoč svemu tome, ova vrsta jedna je od najrasprostranjenijih salmonidnih vrsta na svijetu i unesena je kao strana u 42 države (FAO 2003 / u Fausch 2007). U mnogima od njih zabilježena je kao uzrok smanjenja brojnosti zavičajnih vrsta (Fausch 2007). Zbog svoje invazivnosti te sposobnosti uspostavljanja stabilnih populacija, proglašena je jednom od 100 najgorih invazivnih stranih vrsta na svijetu (Lowe i sur. 2004). Takav utjecaj primijećen je i na lokalnoj razini područja istraživanja, gdje ova vrsta negativno utječe na zavičajnu dunavsku pastrvu.

### **1.3. Opće značajke vrste *Salmo labrax* Pallas, 1814**

#### **1.3.1. Morfologija i ekologija vrste *Salmo labrax***

Dunavska pastrva (*Salmo labrax*) izgledom je vrlo slična atlantskoj. Neki autori navode određene morfološke razlike, ali vrlo blage i uz preklapanja. Među njima je prema literaturi najistaknutiji broj škržnih šipčica (branhiospina), koji kod *S. labrax* varira između 16 i 18 (najčešće je 18), a kod *S. trutta* od 14 do 16 (najčešće je 16) (Kottelat i Freyhof 2007; Lađiu i sur. 2020). Uz to, broj ljustica od baze masne peraje do bočne pruge također je naveden kao značajno različit (*S. trutta* = 15–17 vs. *S. labrax* = 18–19). Postoje i potencijalne razlike u broju perajnih šipčica leđne i podrepne peraje, kao i broja ljustica iznad i ispod bočne pruge (Lađiu i sur. 2020). Također, zabilježen je različit oblik repne peraje kod *S. trutta* u odnosu na *S. labrax* nakon prelaska standardne duljine tijela od 200 mm (Kottelat i Freyhof 2007; Lađiu i sur. 2020), kao i tamnija boja ruba repne peraje i slabije razvijena masna peraja kod vrste *S. labrax*. Zamijećeno je i drukčije obojenje dunavske pastrve u odnosu na atlantsku; boja je više srebrnasta, a točke su rjeđe crvene (nekada potpuno nedostaju), dok su crne točke „x“ oblika (ne okrugle) (Slika 3) (Lađiu i sur. 2020). Kao i kod atlantske pastrve, postoje tri oblika; „morski“, „jezerski“ i „potočni“ (Kottelat i Freyhof 2007; Lađiu i sur. 2020). Nadalje, jedinke ove vrste također preferiraju brze i čiste potoke s hladnom vodom dobro opskrbljenom kisikom te kamenitim i šljunkovitim dnom. Za vrijeme mrijesta, između listopada i siječnja, a prema nekim autorima u proljeće (Lađiu i sur. 2020), jedinke migriraju u gornje, izvorišne dijelove vodotoka. Mužjaci postaju spolno zreli prije ženki, već nakon prve godine života, dok ženke tek u drugoj (Makhrov i sur. 2018). Juvenilne jedinke morskog oblika provode 2–4 godine u slatkovodnim ekosustavima, preferirajući potoke brdovitih krajeva, prije povratka u more gdje



provode također između 2 i 4 godine. U moru obitavaju uz obalu, na dubini od oko 50 metara. Neke jedinke se na proljeće (travanj ili svibanj) vraćaju u rijeke gdje obitavaju sve do mrijesta, dok druge na mrijest dolaze tek neposredno prije početka mrijesta (listopad ili studeni). Nakon mrijesta, ikra se razvija 1,5–2 mjeseca. Juvenilni i odrasli potočni oblici hrane se raznim vodenim, ali i kopnenim beskralješnjacima, dok se morski te velike jedinke jezerskog oblika hrane uglavnom drugom ribom ili pak velikim rakovima. Bitno je napomenuti da se morski oblici prehranjuju u riječnim ekosustavima (Kottelat i Freyhof 2007; Freyhof 2011b). Osim reproduktivnih migracija i migracija vezanih uz prehranjivanje, ova vrsta može migrirati i u potrazi za novim staništem, kao i povoljnijim hidrografskim uvjetima (Lažiu i sur. 2020).



**Slika 3.** Fotografija vrste *Salmo labrax* (preuzeto iz Kottelat i Freyhof 2007).

### **1.3.2. Rasprostranjenost vrste *Salmo labrax* u Europi**

Dunavska pastrva smatra se rjeđom salmonidnom vrstom (Muhareem i sur. 2011). Rasprostranjena je uz obalu Crnog i Azovskog mora te u rijekama koje se u njih ulijevaju, među kojima su i rijeka Dunav te Vardar (Lažiu i sur. 2020; Kottelat i Freyhof 2007). Zemlje u kojima je zabilježena njezina prisutnost kao zavičajne vrste su Austrija, Bjelorusija, Bosna i Hercegovina, Bugarska, Hrvatska, Češka, Gruzija, Mađarska, Moldavija, Crna Gora, sjever Makedonije, Poljska, Rumunjska, Rusija, Srbija, Slovačka, Slovenija, Turska i Ukrajina (Slika 4) (Freyhof 2011b). Iako se vrsta smatrala endemom Crnog i Azovskog mora (Dudu i sur. 2011; Lažiu i sur. 2020), njezina rasprostranjenost vidno premašuje ta područja, kao i područja porječja rijeka koje se u njih ulijevaju. Točnije bi je bilo nazvati endemom crnomorskog slijeva.





**Slika 4.** Rasprostranjenost vrste *Salmo labrax* na području Europe i dijela zapadne Azije. Narančasto obojenje prikazuje područje u kojem je vrsta zavičajna (preuzeto i prilagođeno iz Freyhof 2011b).

### 1.3.3. Ugroženost vrste *Salmo labrax*

Prema Crvenoj listi ugroženih vrsta dunavska pastrva uvrštena je u kategoriju najmanje zabrinjavajućih vrsta (LC) (Freyhof 2011b), iako je nedavno zabilježen pad brojnosti njezinih populacija (Lažiu i sur. 2020). S obzirom na to da je donedavno od strane nekih autora bila smatrana intraspecijskom linijom unutar atlantske pastrve, za ovu vrstu nije rađena zasebna procjena rizika od izumiranja u Hrvatskoj, već je ona preuzeta od vrste *S. trutta*; dakle vrsta se smatra osjetljivom (VU) (HAOP 2017). Kao i atlantska pastrva, ugrožena je izgradnjom brana te preusmjeravanjima vodnih tijela i svim zahvatima na i oko njezinog staništa koji ga značajno mijenjaju te uzrokuju njegovu degradaciju ili uništavanje, ili pak vrsti onemogućuju migracije (Kalayci i sur. 2018). Osim već spomenute problematike onečišćenja okoliša (eutrofikacija), izlova zbog prehrane ili rekreacije te negativnih utjecaja invazivnih vrsta i klimatskih promjena, ovoj vrsti značajno prijete gensko onečišćenje njezinih populacija kroz hibridizaciju s atlantskom pastrvom, no moguće i jedinkama ove vrste, ako se radi o jedinkama koje su namjerno unesene u prirodna staništa (poribljavanje) ili su pobjegle iz uzgajališta jer su one često genski značajno različite (Kalayci i sur. 2018; Buj i sur. 2020). Osim toga, na lokalnoj

razini je kod dunavske pastrve zamijećena izoliranost populacija i slab protok gena među njima koji su doveli do niske razine raznolikosti, ali i malih efektivnih veličina njezinih populacija (Buj i sur. 2020). Upravo je zbog svega navedenog za ovu vrstu izrađen plan upravljanja s akcijskim planom sa svrhom zaštite i očuvanja vrste, no njegove smjernice još nisu implementirane i ne provode se.

#### **1.4. Opće značajke vrste *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)**

##### **1.4.1. Morfologija i ekologija vrste *Oncorhynchus mykiss***

Kalifornijska pastrva (*Oncorhynchus mykiss*) prepoznatljiva je po mnogobrojnim tamnim točkicama koje su prisutne po čitavom tijelu, uključujući glavu te peraje, kao i izraženoj crvenkastoj prugi koja se proteže na bočnoj strani tijela od glave do baze repne peraje (Slika 5) (Kottelat i Freyhof 2007). Kao dvije već opisane vrste, vrlo je plastična s obzirom na morfološke i ekološke značajke, nastanjujući i slatke vode i morska staništa te posjedujući više različitih oblika (Stanković i sur. 2015; Sloat i sur. 2014; Candiotto i sur. 2011). Ipak, preferira slatke vode, gdje ju se može pronaći u potocima, rijekama te jezerima, no temperatura vode ne smije prelaziti 24–25 °C, dok optimalna za ovu vrstu iznosi oko 12 °C. Također, iako može tolerirati razne ekološke uvjete, potreban joj je visoki stupanj oksigeniranosti vode za život (Candiotto i sur. 2011; Kottelat i Freyhof 2007). Za mrijest odabire područja brzog protoka vode iznad šljunkovitog dna (Kottelat i Freyhof 2007). Tipično se mrijesti na proljeće (veljača do svibanj), no zbog amplificiranog širenja vrste pod ljudskim utjecajem mrijest je zabilježen i na jesen, pa čak i zimu, što je primijećeno najviše kod morskih oblika (Busby i sur. 1996; Kottelat i Freyhof 2007; Candiotto i sur. 2011; Kannry i sur. 2020). Ženke su te koje grade gnijezda, a mrijest započinje kada temperatura naraste preko 10-15 °C. Uspješnost mrijesta također ovisi o temperaturi; pokazalo se da više temperature pozitivno utječu na razvoj ikre te ishod mrijesta (Candiotto i sur. 2011). Mlađ kalifornijske pastrve pokazuje vrlo antagonističko ponašanje prema mlađi drugih vrsta pastrva, time negativno utječući na njihov opstanak (Kottelat i Freyhof 2007). Nadalje, jedinke ove vrste pokazuju i vrlo kompetitivno ponašanje, pogotovo ako se radi o obrani teritorija na kojem se hrane (Kendall i sur. 2015). Mlađ se primarno hrani zooplanktonom, a razvitkom se jedinke postepeno počinju prehranjivati i vodenim ili kopnenim kukcima, rakovima te drugom ribom, dok se morski oblici hrane i glavonošcima (Kottelat i Freyhof 2007). Od kukaca im u prehrani dominiraju redovi Diptera

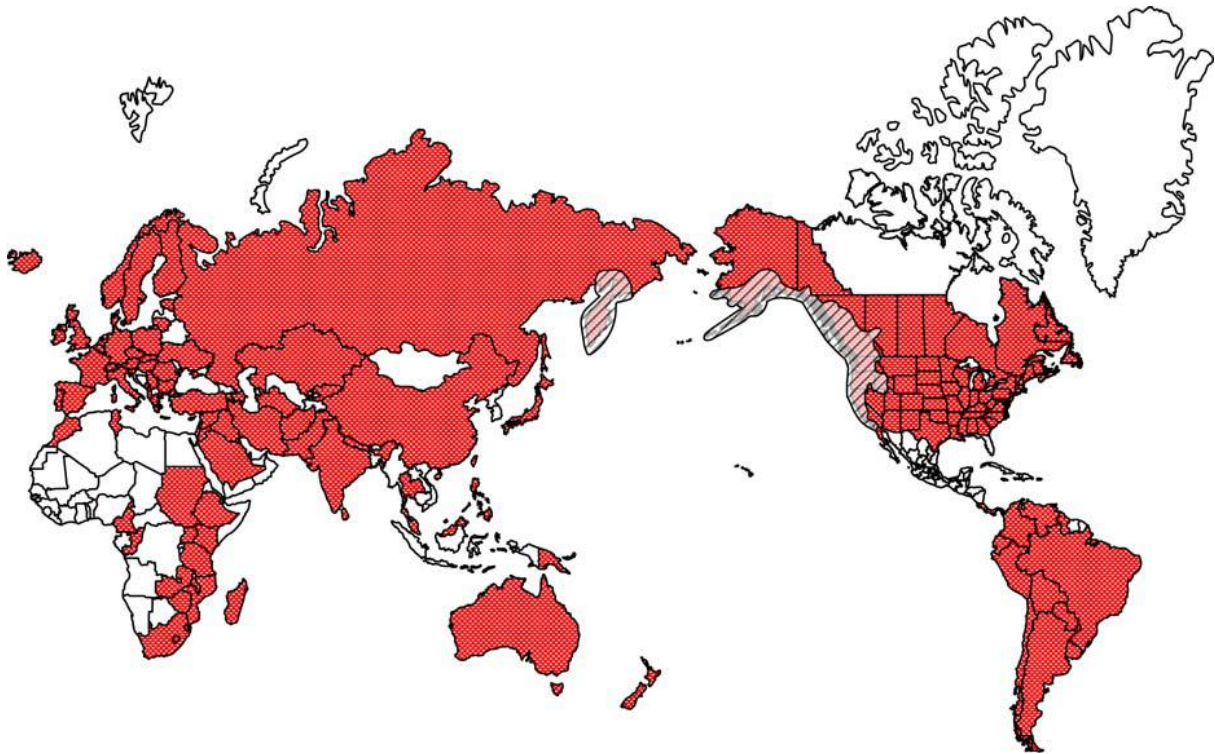
(Chironomidae, Simuliidae), Trichoptera i Ephemeroptera (Baetidae), a od riba rodovi *Barbus* i *Chondrostoma* (Dedual i Collier 1995; Stanković i sur. 2015).



**Slika 5.** Fotografija vrste *Oncorhynchus mykiss* (preuzeto s <https://commons.wikimedia.org/>).

#### **1.4.2. Rasprostranjenost vrste *Oncorhynchus mykiss* na svjetskoj razini**

Kalifornijska pastrva smatra se jednom od najrasprostranjenijih vrsta riba, kao i najrasprostranjenijom pastrvom na svijetu; njezina prisutnost zabilježena je kroz cijeli umjereni i subarktički klimatski pojas, osim na Antarktici, kao i u tropskom pojasu iznad 1200 metara nadmorske visine (Crawford i Muir 2008; Fausch 2008; Crossman 1991). Razlog njezine široke rasprostranjenosti je primarno namjeren unos vrste u staništa u kojima nije zavičajna zbog rekreacije (sportski ribolov), i to često ilegalno od strane ribiča, kao i sa svrhom uzgoja zbog prehrane (akvakultura), dok joj je njezina prilagodljivost okolišu i tolerancija prema određenim ekološkim čimbenicima samo dodatno pripomogla i omogućila joj uspostavljanje stabilnih populacija na stranom staništu (Fausch 2007; Fausch 2008, Candiotta i sur. 2011; Olden 2006, Crawford i Muir 2008; Halverson 2008; Stanković i sur. 2015). Zavičajnom se smatra u rijekama koje pripadaju slijevu Pacifičkog oceana na području Sjeverne Amerike, konkretnije uz zapadnu obalu od Kalifornijskog zaljeva do Aljaske, kao i na području poluotoka Kamčatka u Rusiji, dok je u prošlosti bila prisutna i na području sjevernog Meksika (Slika 6) (Jonsson i sur. 1993; McCusker i sur. 2000; Crawford i Muir 2008; Deiner i sur. 2007). Kao strana vrsta unesena je u 97 zemalja (FAO 2003 / u Fausch 2007), a uspostavila je stabilne populacije u 28 država od ukupnih 41 istraženih u Europi (Fausch 2007; Savini i sur. 2010).



**Slika 6.** Rasprostranjenost vrste *Oncorhynchus mykiss* na svjetskoj razini. Crno isprugani dijelovi prikazuju područje u kojem je vrsta zavičajna, a crveno su obojene zemlje u koje je vrsta unesena (preuzeto iz Crawford i Muir 2008).

#### 1.4.3. Ugroženost i invazivnost vrste *Oncorhynchus mykiss*

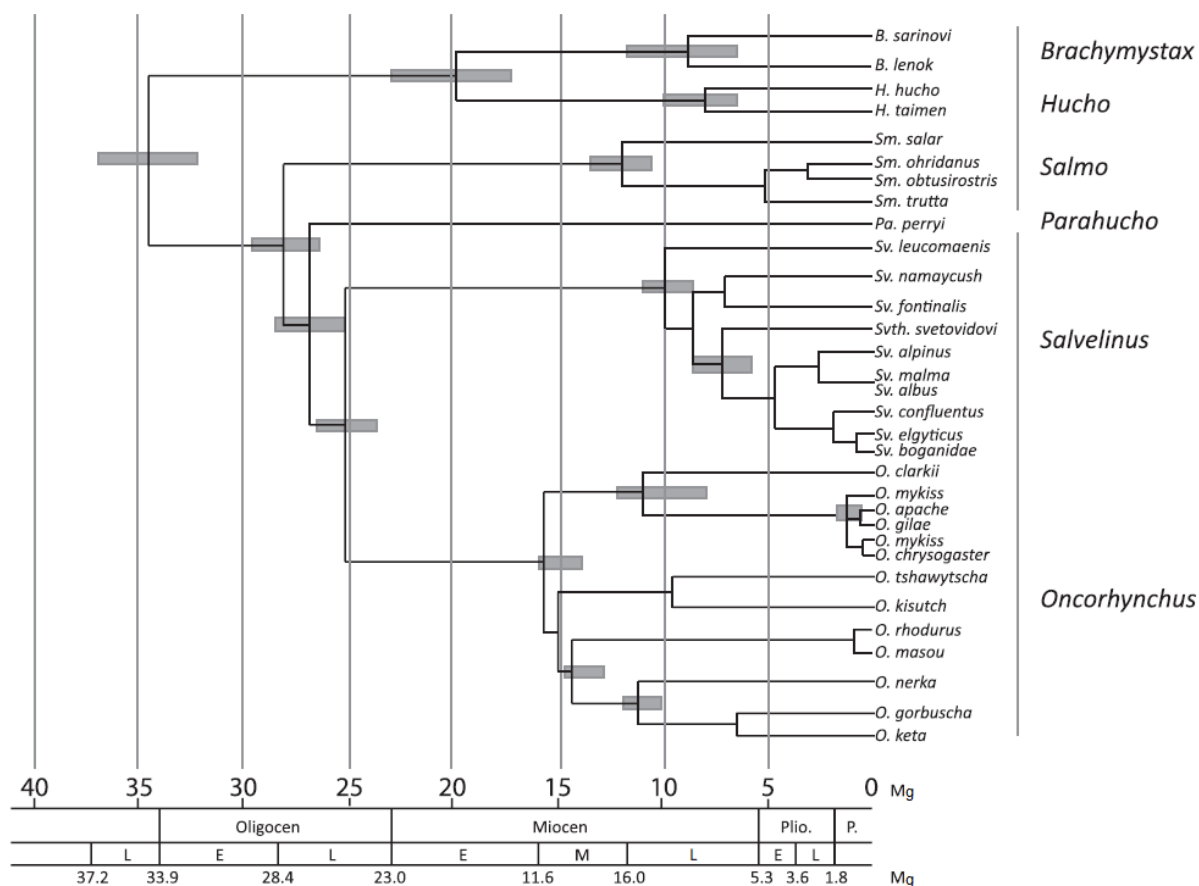
Zavičajne populacije kalifornijske pastrve na području Kamčatke i u Sjevernoj Americi smatraju se ugroženima (Kottelat i Freyhof 2007; Yoshiyama i Moyle 2010; Kannry i sur. 2020; McPhee i sur. 2007). Čimbenici koji negativno utječu na njih su uglavnom isti kao i za dvije prethodno opisane vrste: izgradnja brana i pregrada, kanaliziranje i preusmjerenje vode, prenamjena i uništavanje staništa, sječa stabala na području oko vodotoka, klimatske promjene, prelov te unos ili bijeg jedinki iz mrjestilišta u prirodna staništa (Katz i sur. 2012). No, u Europi, gdje je unesena kao strana vrsta, nije nimalo ugrožena, štoviše, vrlo je invazivna te posljedično proglašena jednom od 100 najgorih invazivnih stranih vrsta na svijetu od strane IUCN-a (Lowe i sur. 2004). Posljedice unošenja ove vrste u ekosustave gdje nije zavičajna te njezinog uspješnog uspostavljanja stabilnih populacija na tom području mogu biti direktne i indirektno, odnosno mogu djelovati izravno na druge jedinke i populacije ili kumulativno na cijele ekosustave i njihovo normalno funkcioniranje (Simon i Townsend 2003). Najznačajniji utjecaji su primijećeni u vidu predacije i kompeticije sa zavičajnim (salmonidnim) vrstama riba, i to u

više životnih stadija (Crowl i sur. 1992). Osim toga, svojom prisutnošću mijenjaju veličine zavičajnih populacija, njihovu distribuciju te ponašanje, čime mogu negativno utjecati na trofičke odnose i usklađenost cijele hranidbene mreže slatkovodnih ekosustava (Nystrom i sur. 2001; Simon i Townsend 2003). To može uzrokovati razne poremećaje u ekosustavu, kao što su na primjer cvjetanje algi, a posljedično i eutrofikacija (Fausch 2007). Osim na ribe, pokazalo se da kalifornijska pastrva predacijom negativno utječe i na zavičajne vrste vodozemaca te raznih beskralješnjaka (Nystrom i sur. 2001; Vredenberg 2004). Ipak, najznačajniji utjecaj kalifornijske pastrve očituje se u zauzimanju staništa zavičajnim salmonidnim vrstama, time uzrokujući fragmentaciju i izolaciju njihovih populacija, što posljedično dovodi do smanjenja veličina njihovih populacija, protoka gena između njih, kao i njihove raznolikosti (Fausch i sur. 2007). Osim toga, hibridizacija zavičajnih vrsti s kalifornijskom pastrvom dovodi do genskog onečišćenja njihovih populacija, pospješujući time njihov rizik od izumiranja (Allendorf i sur. 2001; Weigel i sur. 2003; Fausch 2007).

### **1.5. Taksonomski položaji i odnosi proučavanih vrsta pastrva**

Iako su pastrve vrlo dobro istražena skupina, njihova taksonomija još uvijek nije potpuno jasna niti uređena (Kottelat i Freyhof 2007). To za sobom vuče i druge probleme, pogotovo u vidu adekvatne zaštite vrsta; kako nešto adekvatno zaštititi ako nismo sigurni radi li se o zasebnoj vrsti ili samo jednoj filogenetskoj liniji iste vrste? (Buj i sur. 2020). Veliki problem predstavlja plastičnost vrste *Salmo trutta* koja joj omogućuje značajnu morfološku raznolikost ovisnu o ekološkim uvjetima staništa, zbog čega su molekularne i genetske metode ključne u rješavanju taksonomskih pitanja (Pakkasmaa i Piironen 2001; Buj i sur. 2020).





**Slika 7.** Filogenetski odnosi potporodice Salmoninae, uključujući i rodove *Salmo* te *Oncorhynchus*. Mg – milijuni godina, Plio. – pliocen, P. – pleistocen, E – stariji, M – srednji, L – mlađi (preuzeto i prilagođeno iz Whiteley i sur. 2019).

Taksonomski odnosi roda *Salmo* i *Oncorhynchus* su jasni; njihov zajednički predak potječe iz razdoblja oligocena (prije otprilike 25–30 milijuna godina), nakon čega dolazi do njihovog odvajanja i daljnjeg neovisnog evolucijskog razvitka (Slika 7) (Crête-Lafrenière i sur. 2012 / u Whiteley i sur. 2019). Situacija kod vrsta *Salmo trutta* i *Salmo labrax* znatno je složenija. Donedavno se smatralo da pripadaju samo dvjema različitim linijama unutar iste vrste te je vrsta *S. labrax* tretirana kao podvrsta *S. trutta* (Berg 1948, Bănărescu 1964, Svetovidov 1984, Lelek 1987 / u Lațiu i sur. 2020), dok su ih neki autori čak smatrali istom vrstom (Kalayci i sur. 2018). No, na temelju detaljnijih molekularnih istraživanja potvrđeno je da se zapravo radi o dvije potpuno različite vrste koje su se evolucijski razvijale neovisno jedna o drugoj, odnosno da predstavljaju dvije evolucijski nezavisne jedinice (Kottelat i Freyhof 2007; Turan i sur. 2014; Buj i sur. 2020).

Općenito, taksonomski položaj navedene tri vrste je sljedeći (Nelson 2006):

**CARSTVO** Animalia

**KOLJENO** Chordata

**POTKOLJENO** Vertebrata

**MEĐUKOLJENO** Gnathostomata

**NADRAZRED** Actinopterygii

**RAZRED** Teleostei

**NADRED** Protacanthopterygii

**RED** Salmoniformes

**PORODICA** Salmonidae

**POTPORODICA** Salmoninae

**ROD** *Salmo*

**ROD** *Oncorhynchus*

**VRSTA** *Salmo trutta*

**VRSTA** *Oncorhynchus mykiss*

*Salmo labrax*

## **1.6. Teoretske postavke i primjena metoda populacijske genetike i filogenetske rekonstrukcije te genskih markera**

Metode populacijske genetike koriste se kako bismo dobili bolji uvid u gensku strukturu populacija i vrsta. Kako bi se ta struktura odredila potrebno je provesti analize učestalosti gena, kao i genotipova vrsta u njihovim prirodnim populacijama. No, važno je u obzir uzeti te dobro proučiti i čimbenike koji utječu na gene te određuju genotip neke populacije (Pavlica 2022).

Općenito, geni na razini populacija mogu biti monomorfni, odnosno polimorfni (pojava jednog, odnosno više alela na nekom genskom lokusu). Nadalje, za neki lokus možemo reći da je polimorfan kada frekvencija pojave drugog alela na lokusu u nekoj populaciji iznosi 5 % ili više. Genska struktura populacije određena je upravo frekvencijom alela, odnosno genotipova u nekoj populaciji, a njihove promjene kroz više generacija definiraju proces evolucije. Pojave, odnosno sile koje uzrokuju spomenute promjene su selekcija, genske mutacije i miješanja,

migracije, odnosno protok gena, te genski otklon ( engl. *drift*). Genski otklon određen je samom veličinom populacije čija promjena na ovu pojavu može utjecati preko učinka uskog grla (engl. *bottle-neck effect*), učinka utemeljitelja (engl. *founder effect*) te parenjem u srodstvu (engl. *inbreeding*) ili izvan srodstva (engl. *outbreeding*) (Pavlica 2022).

Kako bi bilo moguće provesti analize genske strukture i raznolikosti populacija određenih vrsta, prvo moramo poznavati njihove srodstvene odnose, odnosno genske veze. Upravo to nam omogućuju metode molekularne filogenije, pomoću kojih možemo dobiti informacije o evolucijskoj povijesti organizama, odnosno vrsta i viših sistematskih kategorija, koje proučavamo (Lipscomb 1998). Još jedna znanstvena disciplina koja je usko povezana s populacijskom genetikom je i filogeografija (Bermingham i Moritz 1998). Njezina uloga jest da genskim vezama između organizama prida prostornu i vremensku komponentu koje potom objašnjava utjecajima demografskih procesa (Emerson i Hewitt 2005; Hewitt 2001; Avise 1998). Osim toga, vrlo je korisna prilikom usporedbe filogeografskih karakteristika različitih taksonomskih skupina određenog područja (Arbogast i Kenagy 2001), kao i proučavanja njihovog prostornog širenja, specijacije i adaptivne radijacije te izumiranja (Bermingham i Moritz 1998).

Za prikazivanje evolucijske povijesti organizama koriste nam metode filogenetske rekonstrukcije pomoću kojih izrađujemo filogenetska stabla i mreže na temelju haplotipskih sekvenci. Filogenetskim stablima prikazujemo srodstvene odnose među organizmima te redoslijed kojim se specijacija postupno odvijala, dok je filogenetskom mrežom moguće ilustrirati i veze među organizmima koji nisu direktno srodni te one uključuju rekombinaciju, lateralni prijenos gena i hibridizaciju. To je posebno važno za vrste koje mogu stvarati hibride; genski odnosi jedinki različitih vrsta su hijerarhijski upravo zbog njihove reproduktivne izolacije i raznolikosti (Nakhleh i sur. 2005; Posada i Crandall 2001). Od metoda za izradu filogenetskih stabala najčešće se koriste metoda najveće parsimonije (MP), metoda najveće vjerodostojnosti (ML) te Bayesova metoda (BAY), dok se metodom susjednog sparivanja (MJ), kao i metodom statističke parsimonije (TCS), izrađuje filogenetska mreža. Upravo se potonja metoda koristi u analizama koje se provode na razini populacija jer preostale metode ne uključuju pojave ključne za populacijsku genetiku (npr. rekombinacije) (Posada i Crandall 2001; Clement i sur. 2000).

Haplotipske sekvence koje se primjenjuju u analizama dobivaju se pomoću genskih markera. Za provođenje filogenetskih istraživanja viših životinja najčešće se koriste markeri iz mitohondrijske DNA (mtDNA) koja se uglavnom prenosi samo majčinskom linijom (Avise



1998; Emerson i Hewitt 2005). Idealna je za ove metode jer je prisutna u velikom broju kopija u stanicama te brzo evoluirala, ali ne toliko da dođe do zasićenja mutacijama kroz nekoliko milijuna godina, dok su rekombinacije vrlo rijetke ili uopće nisu prisutne (Harrison 1989; Zhang i Hewitt 1996; Hewitt 2001). Također, zbog toga što pokazuje veliku varijabilnost između, ali i unutar populacija, odlična je i za analize struktura populacija te prostorne varijabilnosti unutar iste vrste (Harrison 1989). Danas najčešće korišteni mtDNA markeri su mitohondrijski geni citokrom *b* (*cyt b*), kontrolna regija (CR), citokrom oksidaza I/II (CO I/II) i rRNA (Zhang i Hewitt 1996). Citokrom *b* smatra se najboljim od navedenih markera za određivanje strukture populacija, kao i filogenetskih veza među različitim vrstama riba (Buj i sur. 2014; Buj i sur. 2017a; Schenekar i sur. 2014). No, primjenom samo jednog markera mogu se izostaviti važni čimbenici, poput hibridizacije, selekcije ili horizontalnog prijenosa gena (Bermingham i Moritz 1998). Zbog toga je prilikom analiza uvijek poželjno koristiti više genskih markera koje karakteriziraju različite stope mutacija, i to na što većem broju sekvenci, kako bi naši zaključci bili utemeljeni (Bermingham i Moritz 1998; Emerson i Hewitt 2005). Zato se sve češće osim mitohondrijskih markera koriste markeri nuklearne DNA, kao što je to gen koji aktivira rekombinaciju, RAG1 (engl. *recombination activating gene*). No, potrebno je naglasiti kako je njihova stopa mutacije znatno niža, pa je njihova primjena prikladna za filogenetska istraživanja odnosa među vrstama koje nisu srodne te mogu ukazati na prisustvo hibridizacije (Hewitt 2001; Buj i sur. 2017a).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

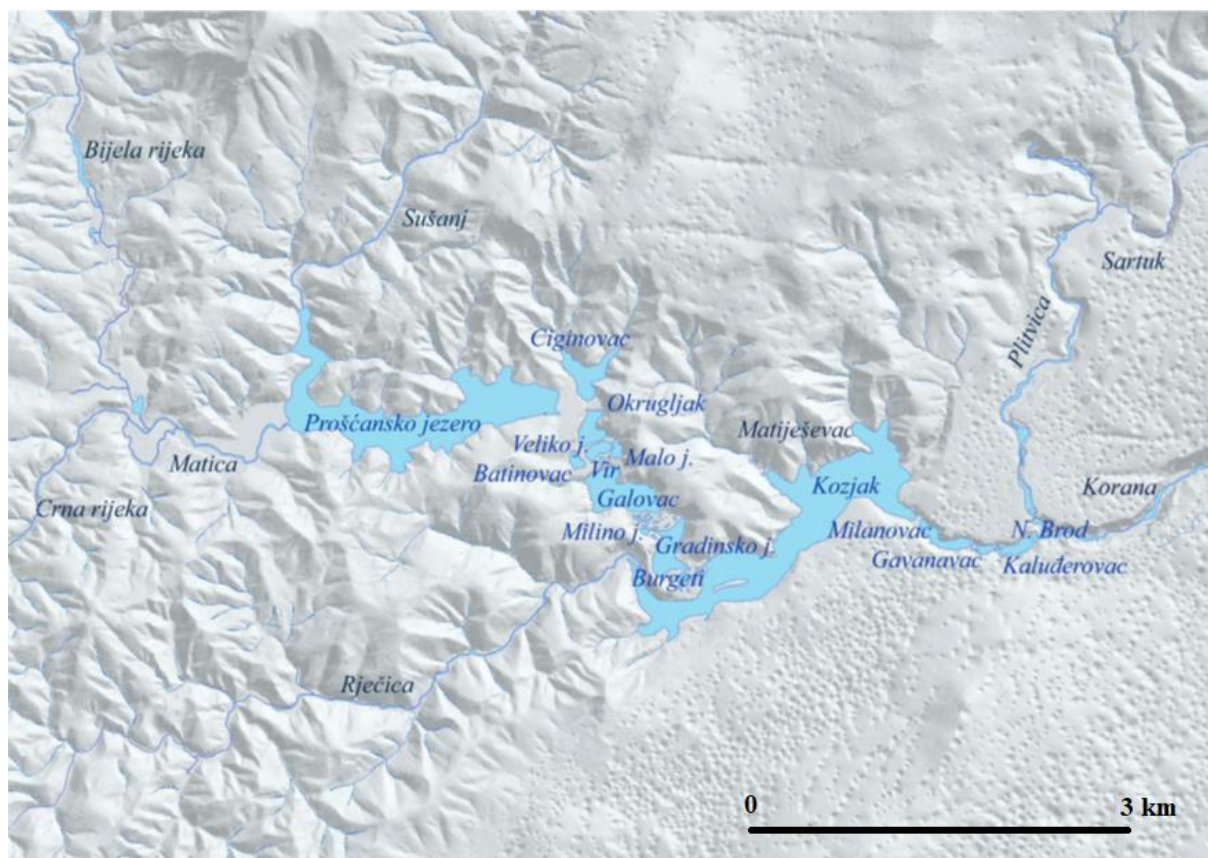
Prema Buj i sur. (2022), *Salmo labrax* predstavlja zavičajnu vrstu na području Plitvičkih jezera, a njezine su čiste populacije, iako rijetkost u ostatku Europe, ondje još uvijek prisutne te predstavljaju drevnu raznolikost ove evolucijske jedinice. No, prijete im ugroza u vidu antropogenih utjecaja koji su doveli do izoliranosti populacija, uzrokujući slab ili nikakav protok gena između njih. Osim toga, vrlo je zabrinjavajuće što je kod tri čiste populacije *S. labrax* (Lička Jesenica, Sartuk i Plitvica) utvrđena vrlo niska razina genske raznolikosti. Uz to, efektivne veličine populacija ove vrste vrlo su male, što situaciju čini još alarmantnijom. Za razliku od nje, *Salmo trutta* je unesena na Plitvička jezera, a njezine populacije karakterizira veća genska raznolikost i efektivne veličine populacija, što nije uobičajena značajka unesenih vrsta. Isto vrijedi i za stranu invazivnu vrstu *Oncorhynchus mykiss*.

Cilj ovog istraživanja stoga je odrediti gensku strukturu i raznolikost populacija tri vrste pastrva, od kojih svaka ima drugačiji „status“, a sve obitavaju na širem području Plitvičkih jezera. Time sam nastojala:

- dobiti bolji uvid u rasprostranjenost te migracije svake od vrsta na navedenom području
- odrediti protok gena između njihovih populacija
- ustanoviti područja mogućih interakcija, odnosno preklapanja njihovih areala
- utvrditi je li došlo do promjena u zastupljenosti pojedinih haplotipova vrsta roda *Salmo* na već istraženim lokacijama, što je posebno važno zbog potencijalne zaštite ugroženih čistih populacija *S. labrax* kojima prijete moguća hibridizacija sa stranom vrstom *S. trutta*
- opisati gensku strukturu populacija invazivne strane vrste *Oncorhynchus mykiss* zbog njezinih negativnih utjecaja na populacije drugih salmonidnih vrsta na području Plitvičkih jezera.

### 3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA – šire područje Plitvičkih jezera

Područje Plitvičkih jezera zbog svoje je iznimne ljepote i neprocjenjivih vrijednosti u vidu prirodne i kulturne baštine 1949. godine proglašeno nacionalnim parkom. Time ono predstavlja naš najstariji nacionalni park, a uz to i najveći te svakako najpoznatiji. Ovaj nacionalni park prepoznat je i na svjetskoj razini te je 1979. godine postao dio popisa Svjetske prirodne baštine Organizacije Ujedinjenih naroda za obrazovanje, znanost i kulturu (engl. *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*, UNESCO) (Meaški i sur. 2016). Nalazi se u gorskoj Hrvatskoj, u depresiji između masiva Mala Kapela i Lička Plješivica, te je dio Dinarskog krškog područja. Stijenski sastav, klima i biogene komponente omogućile su proces stvaranja sedrenih barijera, prema kojima je ovaj nacionalni park poznat, ali i sami nastanak jezera. Ona su nastala na karbonatnim stijenama mezozojske starosti; 12 Gornjih jezera formirano je na dolomitnim stijenama trijaskne starosti, dok su 4 Donja jezera i kanjon rijeke Korane nastali na vapnenačkoj podlozi iz krede. Za zadržavanje vode između stijenskih kompleksa zaslužne su upravo sedrene barijere; one nastaju samo u uvjetima tople i vlažne klime, slične današnjoj, a procjenjuje se da najstariji nalazi sedre datiraju iz razdoblja prije 100–300 tisuća godina. Upravo je ovaj kompleksan proces omogućio stvaranje kaskadnog jezerskog sustava Plitvičkih jezera. Da bi se proces uopće dogodio, nekoliko uvjeta mora biti zadovoljeno: voda iz koje će se taložiti kalcijev karbonat mora biti njime prezasićena, pH vrijednost vode mora biti veća od 8,0, a koncentracija otopljene organske tvari manja od 10 mg L<sup>-1</sup> ugljika. Kada su ti uvjeti ostvareni, tek onda uz pomoć sedrotvorne mahovine koja raste na barijerama, kao i modrozelenih algi, algi kremenjašica te bakterija i drugih mikroorganizama, može nastati sedra (JUNPPJ 2019).



**Slika 8.** Šesnaest kaskadnih jezera u sklopu Plitvičkih jezera i njihove glavne pritoke (preuzeto iz JUNPPJ 2019).

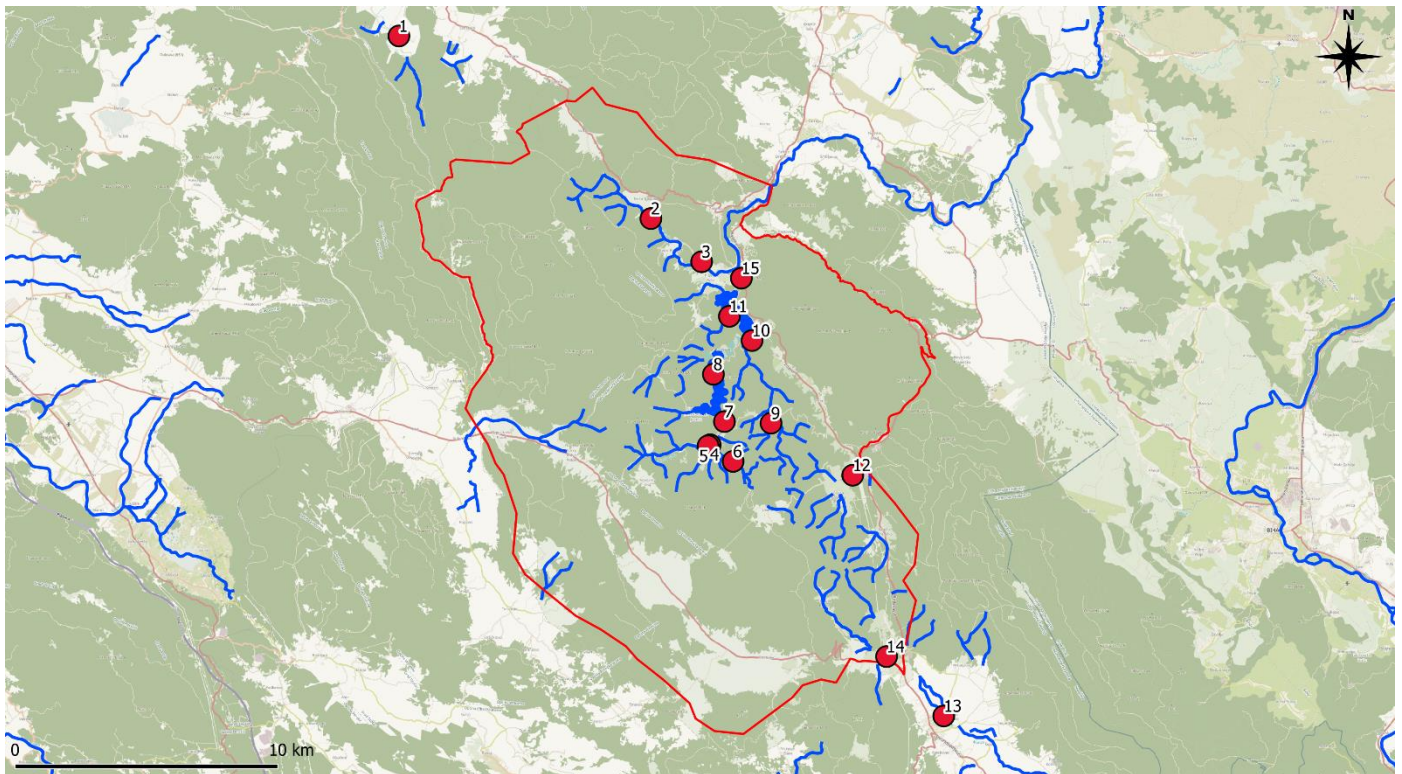
Plitvička jezera pripadaju crnomorskom slijevu, odnosno slijevu rijeke Dunav, a velika većina slijeva nalazi se u granicama nacionalnog parka, uz izuzetak manjih dijelova na području Male Kapele, Kuselja i Saborskog. Površinske vode zauzimaju oko 1 % površine nacionalnog parka, a među njima je svakako najpoznatiji sustav kaskadnih jezera (Slika 8). Gornjim jezerima pripadaju i dva najveća jezera, Kozjak te Prošćansko jezero, koji zajedno čine 89 % ukupnog volumena vode. Stalni krški izvori koji doprinose održavanju površinskih tokova su izvor Crne rijeke, izvor Bijele rijeke te izvor potoka Plitvica. Osim Crne i Bijele rijeke, za opskrbu jezera vodom značajni su i stalni veći vodotoci Rječica i Sušanj, kao i brojni manji stalni te povremeni vodotoci. Crna i Bijela rijeka spajaju se kod mjesta Plitvički Ljeskovac u vodotok Maticu koja se ulijeva u Prošćansko jezero. Slijedi kaskada Gornjih jezera Ciginovac, Okrugljak, Batinovac, Veliko jezero, Malo jezero, Vir jezero, Galovac, Milino, Gradinsko i Burgeti preko čijih se brana voda prelijeva sve do jezera Kozjak, u koje se ulijeva i vodotok Rječica. Nakon Kozjaka voda se ulijeva u sustav Donjih jezera Milanovac, Gavanovac i Kaluđerovac koji završava posljednjim jezerom, Novakovića Brod. Na mjestu barijere

Novakovića Brod, odnosno slapa Sastavci, dolazi do spajanja jezerske vode s potokom Plitvica, tvoreći rijeku Koranu (JUNPPJ 2019).

Ovo istraživanje provedeno je na širem području Plitvičkih jezera, tako da obuhvaća i lokalitete koji se nalaze izvan samih granica nacionalnog parka, a uzorkovanje je izvršeno na ukupno 15 postaja (Tablica 1, Slika 9).

**Tablica 1.** Popis lokaliteta s koordinatama na kojima je provedeno uzorkovanje.

<b>Broj lokaliteta (Slika 9)</b>	<b>Lokalitet</b>	<b>y koordinata</b>	<b>x koordinata</b>
1	Lička Jesenica	4982823,11	416769,67
2	potok Sartuk	4975874,00	426359,00
3	potok Plitvica	4974230,67	428289,74
4	Plitvički Ljeskovac	4967268,00	428614,00
5	Bijela rijeka	4967288,00	428509,00
6	Crna rijeka	4966671,49	429502,40
7	Matica	4967451,42	428924,32
8	Prošćansko jezero	4969948,82	428738,19
9	Rječica	4968089,44	430931,62
10	Kozjak	4971233,47	430208,88
11	Matijaševac	4972154,54	429346,86
12	Čujića Krčevina	4966108,00	434041,00
13	Matica korenička	4956947,05	437504,15
14	Korenička rijeka	4959207,07	435328,47
15	Gavanovac	4973607,28	429803,19



**Slika 9.** Karta područja istraživanja s označenom granicom Nacionalnog parka Plitvička jezera (crvena linija) te postajama gdje je provedeno uzorkovanje (crvene točke s crnim rubom) koje su označene brojevima od 1 do 15. Vodna tijela su istaknuta pomoću dodanih slojeva *vodotoci* i *kopnene\_vode* preuzetih s *Bioportala* (<http://services.bioportal.hr/wfs>).

### **Postaja 1: Lička Jesenica**

Uzorkovanje je obavljeno kod mjesta Mlini, gdje je na rijeci prisutno slapište. Postaju karakterizira razvijenost vodene vegetacije, kao i ujezerenje rijeke iznad umjetno napravljene brane. Zabilježeno je prisustvo pretežito dunavske pastreve, raznih veličina i izgleda (Buj i sur. 2017b).

### **Postaja 2: potok Sartuk**

Uzorkovanje je provedeno na području potoka gdje on prolazi kroz Sertić poljanu. Potok je ondje okružen livadnom vegetacijom (Slika 10). Na lokaciji su zabilježene samo dunavske pastreve (Buj i sur. 2017b).





**Slika 10.** Postaja potok Sartuk na kojoj je provedeno uzorkovanje (preuzeto iz Buj i sur. 2017b).

### **Postaja 3: potok Plitvica**

Potok Plitvica velik je potok dobro opskrbljen vodom te brzog protoka i nikada ne presušuje (JUNPPJ 2019). Te karakteristike čine ga vrlo povoljnim staništem za dunavsku pastrvu koja je ondje brojna (Buj i sur. 2017b).

### **Postaja 4: Plitvički Ljeskovac**

Na lokaciji uzorkovanja potok Ljeskovac prolazi kroz mjesto Plitvički Ljeskovac. U potoku uočene sve tri vrste pastrva koje su proučavane ovim istraživanjem (Buj i sur. 2017b).

### **Postaja 5: Bijela rijeka**

Izvor Bijele rijeke je raspršen i vrlo slabe snage, dok korito rijeke za vrijeme sušnog razdoblja ima tendenciju djelomično presušiti (JUNPPJ 2019). Bijela rijeka vrlo je pogodno stanište za sve tri proučavane vrste pastrva (Slika 11), koje su ondje i uočene, no njezina obala i korito bili su pod negativnim utjecajem antropogenih djelovanja, konkretnije zahvata koji su ondje provedeni, te je stanište posljedično izmijenjeno (Buj i sur. 2017b).



**Slika 11.** Postaja Bijela rijeka na mjestu gdje su uzeti uzorci (preuzeto iz Buj i sur. 2017b).

### **Postaja 6: Crna rijeka**

Crna rijeka predstavlja najveći izvor na području Plitvičkih jezera (JUNPPJ 2019). Protok vode na izvoru ove rijeke je brz, dok je dno kamenito i šljunkovito, čineći ga pogodnim za pastrve. Crna rijeka dalje protječe kroz šumovitu vegetaciju, a dno joj karakterizira prekrivenost mahovinom (Buj i sur. 2017b). Iako dubina rijeke varira, ona nikada ne presušuje te je u vrijeme sušnih razdoblja zaslužna za donošenje najvećeg udjela vode u jezerski sustav (JUNPPJ 2019). U njoj je zabilježeno prisustvo sve tri vrste pastrva.

### **Postaja 7: Matica**

Rijeka Matica započinje spajanjem Crne i Bijele rijeke u mjestu Plitvički Ljeskovac (JUNPPJ 2019). Iako je potvrđena prisutnost samo dunavske i atlantske pastrve, zabilježene su druge vrste riba, osobito pijor i klen (Buj i sur. 2017b).

### **Postaja 8: Prošćansko jezero**

Prošćansko jezero drugo je po veličinu u sustavu jezera. U njega se ulijeva rijeka Matica te je prvo jezero u sustava Gornjih jezera (JUNPPJ 2019). Iako su u jezeru prisutne sve tri vrste pastrva, značajno prevladavaju strane vrste, osobito klen i crvenperka (Buj i sur. 2017b).

### **Postaja 9: Rječica**



Vodotok Rječica izravno se ulijeva u jezero Kozjak, a u njemu su uočene samo dunavska i atlantska pastrva (Buj i sur. 2017b).

#### **Postaja 10: Kozjak**

Jezero Kozjak najveće je i najdublje jezero u sustavu jezera, čija dubina prelazi 40 m. Ono čini granicu između dva jezerska sustava, Gornjih i Donjih jezera (JUNPPJ 2019). U jezeru su uočene sve tri vrste pastrva, no ulovljene su i brojne strane vrste, najviše klen (Buj i sur. 2017b).

#### **Postaja 11: Matijaševac**

Ovaj potok također se ulijeva u jezero Kozjak. U njemu su ulovljene sve tri pastrve, s tim da je kalifornijska pastrva dominantna. Osim toga, zabilježene su i druge vrste: pijor, crvenperka, štuka te zlatovčica (Buj i sur. 2017b).

#### **Postaja 12: Čujica Krčevina**

Potok Čujica Krčevina povoljno je stanište za pastrve; voda u njemu brzo teče, ima kamenito dno različite dubine, a okolna vegetacija je gusta te čini sjenu iznad vodotoka. Pronađene su sve tri vrste pastrva, kao i pijor (Buj i sur. 2017b). No, ponovnim uzorkovanjem nakon nekoliko godina u potoku nije ulovljena niti jedna riba.

#### **Postaja 13: Matica korenička**

Matica Korenička široka je i sporo tekuća rijeka sa šljunkovitim dnom. Dubina rijeke je varijabilna, no većinom je podosta plitka. Vodena i obalna vegetacija je prisutna, ali oskudna. Najviše je zabilježeno atlantske pastrve, ali prisutna je i dunavska. Uočeni su i pijori (Buj i sur. 2017b).

#### **Postaja 14: Korenička rijeka**

Uzorkovanje je provedeno u nizvodnom dijelu rijeke na dubini oko 1 m (Slika 12). Zabilježena je velika brzina protoka vode, dno je okarakterizirano kao pjeskovito do muljevito, a vegetacija je prisutna, ali oskudna. Zabilježena je prisutnost atlantske pastrve. Korenička rijeka samo se djelomično nalazi unutar granica nacionalnog parka, no uzorkovane riblje populacije zalaze i u područje koje izlazi izvan njegovih granica (Buj i sur. 2017b).



**Slika 12.** Postaja Korenička rijeka na mjestu uzorkovanja (preuzeto iz Buj i sur. 2017b).

### **Postaja 15: Gavanovac**

Jezero Gavanovac jedno je od najmanjih jezera u cijelom jezerskom sustavu, dubine do 10 m (JUNPPJ 2019). Jezero se opskrbljuje vodom iz jezera koje mu prethodi, Milanovca, preko slapa Milke Trnine (JUNPPJ 2019; Nacionalni park Plitvička jezera 2022). Uzorkovanjem je potvrđena prisutnost kalifornijska pastrve.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Popis korištenih kemikalija, opreme i računalnih programa

#### 4.1.1. Terenska oprema za prikupljanje uzoraka

- Škare s tupim vrhom
- *Eppendorf* epruvete volumena 0,5 ml
- 96 %-tni etanol
- elektroagregat Hans Grassl model IG-200-1
- anestetik MS-222 (trikain metansulfonat)
- spremnik za vodu

#### 4.1.2 Laboratorijska oprema i kemikalije

- komplet kemikalija za izolaciju DNA (engl. *Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit*): otopina za razgradnju tkiva (engl. *Digestion Solution*), proteinaza K, ribonukleaza A (engl. *RNasa A*), otopina za razgradnju (engl. *Lysis Solution*), koncentrirani puferi I i II (prema uputama ih treba razrijediti dodavanjem 96–100 %-tnog etanola), elucijski pufer, kolone za pročišćavanje DNA (engl. *Purification Column*), epruvete za skupljanje otopine od 2 mL (engl. *Collection Tubes*)
- Škare s tupim vrhom
- 96 %-tni etanol
- Vorteks miješalica (engl. *BIO RAD BR-2000 Vortexer*)
- Vodena kupelj (engl. *SHEL LAB model no: 1225*)
- Uređaj za centrifugu (engl. *Eppendorf Centrifuge 5424*)
- Uređaj za provođenje lančane reakcije polimerazom (PCR) (engl. *Eppendorf nexus GX2*)
- Mikropipete (engl. *Eppendorf Research plus*)
- komplet kemikalija za lančanu reakciju polimerazom (PCR) (engl. *HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN)*)

- Agaroza (engl. *Thermo Scientific TopVision Agarose Tablets*)
- TAE pufer (tris (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina))
- Boja za agarozni gel (engl. *Invitrogen SYBR Safe DNA Gel Stain*)
- Oprema za elektroforezu (engl. *BIO RAD SUB-CELL GT i BIO RAD POWER PAC 300*)
- Stroj za fotografiranje s UV svjetlom (engl. *FastGene GelPic LED Box*)

#### **4.1.3. Računalni programi**

- BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (Hall 1999)
- DnaSP 5.10.01 (Librado i Rozas 2009)
- Network 10.2.0.0. (Fluxus Technology Ltd.)
- MEGA 11.0.13 (Tamura i sur. 2021)
- PAUP 4.0a (Swofford 2003)
- BEAUti v1.10.4 (Suchard i sur. 2018)
- BEAST v1.10.4 (Suchard i sur. 2018)
- TreeAnnotator v1.10.4 (Suchard i sur. 2018)
- FigTree v1.4.4 (Rambaut 2018)
- MIGRATE 3.7.2 (Beerli 2009)
- QGIS 3.16

#### **4.2. Prikupljanje uzoraka**

Prikupljanje uzoraka za ovo istraživanje primarno se odvijalo u rijekama i potocima, uz nekoliko iznimki uzorkovanja u jezerima. Za uzorkovanje u rijekama i potocima najčešće se koristi metoda lova elektroagregatom, u ovom slučaju marke *Hans Grassl model IG-200-1*, dok se u jezerima koriste mreže. Elektroribolov je poželjna metoda za prikupljanje jedinki, pogotovo ako nam je cilj da jedinke nakon uzorkovanja ostanu na životu, zbog toga što ovaj

način lova ostavlja najmanje posljedica na jedinke, a uz to je i neselektivan te se može koristiti za jedinke različite veličine. Elektroribolov se bazira na činjenici da prolazak električne struje određene jačine kroz mišiće jedinki uzrokuje njihovu kratkotrajnu paralizu, što nam omogućuje jednostavno hvatanje jedinki jer se one u pod utjecajem struje ne mogu kretati. Također, nakon prestanka djelovanja električne struje ribe se najčešće brzo oporave i mogu nastaviti normalno živjeti bez ikakvih posljedica (Sooley i sur. 1998).

Nakon ulova jedinke su stavljene u spremnik napunjen vodom u koji je dodan anestetik kako ne bi osjećale bol dok im se uzima komadić peraje. Kada se jedinka umirila, znamo da je anestetik počeo djelovati i tada možemo početi uzimati uzorke za daljnja molekularna istraživanja. Jedinkama sam škarama odrezala komadić trbušne ili prsne peraje te ga pospremila u adekvatno označenu (lokalitet, broj jedinke) *Eppendorf* epruvetu volumena 0,5 mL u koju sam prethodno ulila 96 %-tni etanol. Jedinke su nakon toga fotografirane i izmjerene za potrebe monitoringa (Slika 13) te potom prebačene u drugi spremnik s vodom u kojemu su se oporavljale od anestetika prije nego su vraćene u vodotok iz kojeg su ulovljene. Broj uzorka koji su uzeti na određenom lokalitetu ovisi o uspješnosti lova, na koji je katkad nemoguće utjecati (npr. loše vremenske prilike), ali i o tome koliko je taj lokalitet važan u istraživanju pojedine vrste te koliko je već uzoraka s tog lokaliteta prikupljeno.



**Slika 13.** Fotografija jedinke vrste roda *Salmo* kojoj je uzet komadić peraje s epruvetom u koju je pospremljen.

### **4.3. Laboratorijski postupci (izolacija DNA, umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje)**

Svakom uzorku je dodijeljena odgovarajuća šifra; šifre sadrže četiri slova, prva dva predstavljaju rod, a druga dva lokalitet, te broj koji predstavlja broj uzetog uzorka (npr. SACR1 – *Salmo*, Crna rijeka, prvi uzeti uzorak).

Nakon pravilnog imenovanja uzoraka i njihovog dopremanja u laboratorij, slijedio je prvi korak obrade uzoraka, a to je izolacija DNA. Koristila sam komplet kemikalija za izolaciju DNA (engl. *Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit*) te slijedila protokol proizvođača. Prije početka izolacije bilo je potrebno škarama usitniti uzorke na komadiće veličine oko 0,5 cm te ih prebaciti u nove *Eppendorf* epruvete od 0,5 mL koje su označene brojevima koje označavaju broj uzorka. Zatim sam u epruvete dodala 180  $\mu$ L otopine za razgradnju tkiva te 20  $\mu$ L proteinaze K koja razgrađuje proteine te time pomaže daljnjoj u razgradnji tkiva. Nakon toga sam sadržaj epruveta dobro promiješala koristeći vorteks miješalicu. Zatim sam uzorke stavila na 24 sata u prethodno zagrijanu vodenu kupelj, na temperaturu od 56 °C, kako bi se tkivo potpuno razgradilo. Idući dan sam uzorcima dodala 20  $\mu$ L RNaze A, kako bi uklonila RNA, te ih promiješala na vorteks miješalici i inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom sam im dodala 200  $\mu$ L otopine za razgradnju koja služi za razaranje stanične membrane, odnosno „otvaranje“ stanica. Zatim sam epruvete dobro izmiješala 15 sekundi na vorteks miješalici kako bi dobila homogenu otopinu. Nakon toga sam pripremila 50 %-tnu otopinu etanola te svakom uzorku dodala 400  $\mu$ L te otopine i ponovno ih promiješala na vorteks miješalici. Sadržaj epruveta sam pipetom premjestila u kolone koje sam stavila na epruvete za skupljanje otopine. Njih sam također prethodno označila brojevima prema broju uzoraka. Zatim sam epruvete s kolonom stavila na centrifugu 1 minutu s postavkom RCF (engl. *Relative Centrifugal Force*) 6000 x g. Nakon toga sam kolone premjestila na nove epruvete za skupljanje otopine te dodala 500  $\mu$ L pufera I i stavila na centrifugu 1 minutu s postavkom RCF 8000 x g. Zatim sam ponovno kolone premjestila na nove epruvete te dodala 500  $\mu$ L pufera II i stavila ih na centrifugu 3 minute s postavkom RCF 12000 x g. Do sada sam sve epruvete s prikupljenom otopinom bacala. Kolone sam zatim premjestila na *Eppendorf* epruvete na kojem sam prethodno napisala točne kodove koje sam dodijelila uzorcima. Dodala sam 150  $\mu$ L elucijskog pufera te inkubirala uzorke 2 minute na sobnoj temperaturi. Zatim sam ih stavila na centrifugu 1 minutu s postavkom RCF 8000 x g. Ovaj put sam kolone bacila, a otopinu u *Eppendorf* epruvetama sačuvala; upravo to je izolirana DNA koja nam treba za daljnje analize.

Sljedeći korak je umnažanje DNA izolata lančanom reakcijom polimerazom (PCR reakcijom). Kako bi se odsječak DNA umnožio, potrebno je imati 2 početnice (engl. *reverse* i *forward*). Analize sam provodila s dva različita genska markera: gen za citokrom *b* (*cyt b*), što je kodirajući gen unutar mitohondrijske DNA (mtDNA), te kontrolna regija (CR), koja je također dio mtDNA, ali nije kodirajuća. Uzorke sam pripremala koristeći komplet kemikalija za lančanu reakciju polimerazom (PCR) (engl. *HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN)*) set kemikalija, kao i početnice sintetizirane u *Macrogen Europe* servisu. Protokol koji sam koristila za PCR reakciju je za svaki genski marker prilagođen i optimiziran, te su korištene početnice za koje se smatra da daju najbolje konačne PCR produkte (Tablica 2). To je važno kako bi se mogli dobiti što dulji i cjelovitiji genski odsjeci. Ipak, ponekad je izazov pronaći dovoljno dobre PCR uvjete, početnice za uspješnu PCR reakciju ili početnice za sekvenciranje, pa se može dogoditi da PCR reakcija ne uspije, da dobijemo sekvence koje najveće moguće duljine ili da se sekvenciranje uopće ne može provesti s dostupnim resursima.

**Tablica 2.** Laboratorijski protokol za PCR i početnice za dva analizirana genska markera.

gen	<i>cyt b</i>	CR
<b>PCR uvjeti</b>	10 min 95,0°C 35x 00:45 92,0°C 01:30 48,0°C 01:45 72,0°C 7 min 72,0°C	10 min 95,0°C 40x 01:00 92,0°C 01:00 50,0°C 01:30 72,0°C 10 min 72,0°C
<b>početnice za PCR</b>	H-cyp: CCTAGCTTTG GGAGYTAGG L-cyp: GAYTTGAARA ACCACGTTG	LN20: ACCACTAGCAC CCAAAGCTA HN20: GTGTTATGCTTT AGTTAAGC

Uspješnost PCR reakcije dobro je provjeriti prije daljnje obrade i slanja uzoraka. Taj postupak provodi se metodom elektroforeze na agaroznom gelu. Gel sam pripremila od 1 g agaroze koji sam otopila u 100 mL pufera TAE (1 %). Navedeni pufer je prema sastavu tris (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena

kiselina). Nakon 4 minute na sobnoj temperaturi, otopinu sam grijala u mikrovalnoj pećnici 2 minute te potom hladila 5-6 minuta na sobnoj temperaturi. Kako bi se gel mogao fotografirati koristeći UV svjetlo otopini sam potom dodala i 8  $\mu\text{L}$  boje za agarozni gel. Dobivenu otopinu sam ulila u kadicu za gel koju sam prethodno umetnula u okvir, umetnula češljice u gel i čekala 30 minuta da se gel stvrdne. Nakon toga sam uklonila češljice i kadicu izvadila iz okvira. 4  $\mu\text{L}$  od svakog uzorka sam nanosila na gel mikropipetom, nakon čega sam gel stavila u kadicu za elektroforezu koju sam namjestila na 120 V, 400 mA i 30 minuta te provela elektroforezu. Nakon toga sam gel fotografirala u stroju za fotografiranje koji koristi UV svjetlo. Tako provjereni PCR produkti su poslani u *Macrogen Europe* servis na pročišćavanje i određivanje primarne strukture nukleotida (sekvenciranje). Dobivene sekvence sam sravnila koristeći računalni program BioEdit, prilikom čega sam i vizualno provjerila točnost svih sekvenci pregledavajući njihove kromatograme.

#### 4.4. Filogenetska rekonstrukcija

Kako bih utvrdila srodstvene odnose između jedinki tri proučavane vrste pastrva na širem području Plitvičkih jezera provela sam filogenetsku rekonstrukciju koristeći sljedeće metode: metodu najveće parsimonije (MP), metodu najveće vjerojatnosti (ML) i metodu susjednog povezivanja (MJ). Rezultati prve dvije metode su filogenetska stabla, a metoda susjednog povezivanja (MJ) rezultira filogenetskom mrežom. Filogenetska mreža je posebno korisna kada se rade analize za jedinke bliske srodnosti, kao što su to *Salmo trutta* i *Salmo labrax*, jer je među njima moguć horizontalan prijenos gena.

MP i ML analize provela sam koristeći programe PAUP 4.0b10 (Swofford 2003) i MEGA 11.0.13 (Tamura i sur. 2021). Navedene analize provodila sam pod heurističkim modelom uz 100 ponavljanja, s nasumičnim redoslijedom unošenja taksa i preklapanjem grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem (TBR, engl. *Tree bisection-reconnection*). Također, sve nukleotidne supstitucije i sva mjesta kodona imali su jednaku težinu. Podržanost grananja utvrdila sam analizom samopodržanja (BS, engl. *Bootstrap analysis*), uz 1000 BS ponavljanja te 10 replika dodatnih sekvenci. Kao ulazne sekvence za izradu filogenetskih stabala i mreže koristila sam haplotipove koje sam odredila prema sekvencama dobivenim iz uzoraka prikupljenih za ovo istraživanje pomoću programa DnaSP 5.10.01 (Librado i Rozas 2009). Za ukorjenjenje stabala (engl. *outgroup*) prilikom provođenja analiza za *cyt b* koristila sam sekvencu vrste *Hucho hucho* (Linnaeus, 1758) koja pripada istoj potporodici kao i rodovi *Salmo*



te *Oncorhynchus*, a koju sam preuzela iz Banke gena (ime sekvence: *Hucho hucho*; pristupni kod: JX960797.1; referenca: Crête-Lafrenière i sur. 2012) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), dok sam za kontrolnu regiju koristila sekvencu vrste *Oncorhynchus mykiss* dobivenu kroz ovo istraživanje. Prilikom izrade filogenetskih mreža koristila sam metodu susjednog povezivanja (MJ), a izradila sam ih u računalnom programu Network 10.2.0.0. (Fluxus Technology Ltd.). Filogenetske mreže izradila sam na temelju haplotipova, ali i sekvenci prikupljenih kroz ovo istraživanje jer se tom metodom mogu vidjeti frekvencije određenih haplotipova na pojedinim lokalitetima. Za analize nisu korištene sekvence iz Banke gena (osim sekvence za ukorjenjenje) jer je cilj istraživanja pokazati odnose jedinki vrsta koje nastanjuju jedno određeno područje, odnosno šire područje Plitvičkih jezera.

#### **4.5. Određivanje intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti proučavanih vrsta pastrva**

Razinu genske raznolikosti unutar vrsta te svih populacija svake vrste procijenila sam određivanjem mjere DNA polimorfizma koristeći program DnaSP 5.10.01 (Librado i Rozas 2009). Odredila sam sljedeće mjere:

- Broj polimorfni mjesta ( $S$ ) – broj mjesta na sekvenci na kojima se unutar neke populacije pojavljuje više alela, odnosno broj mjesta na kojima je došlo do mutacija
- Ukupan broj mutacija ( $\eta$ ) – ukupan broj mutacija zabilježenih kroz sekvence
- Broj haplotipova ( $h$ ) – broj različitih haplotipova zabilježenih u nekoj populaciji
- Raznolikost haplotipova ( $H_d$ ) – vjerojatnost da su dvije nasumično odabrane sekvence različite
- Nukleotidna raznolikost ( $\pi$ ) – prosječan broj nukleotidnih razlika po mjestu, odnosno vjerojatnost da se dvije nasumično odabrane sekvence razlikuju na određenom mjestu (razlika u bazama nukleotida)
- Prosječan broj razlika nukleotida ( $k$ ) – broj nukleotida koji se razlikuju u dvije nasumično odabrane sekvence

Kao ulazne podatke za određivanje genske raznolikosti koristila sam sekvence dobivene iz uzoraka prikupljenih za ovo istraživanje, koristeći genske markere *cyt b* i *CR*. U analizama na temelju citokroma *b* određena je genska raznolikost unutar vrsta te svih populacija svake

vrste, a za analize na temelju kontrolne regije određena je samo razina genske raznolikosti unutar vrsta.

#### **4.6. Određivanje evolucijske povijesti proučavanih vrsta pastrva**

Kako bih procijenila evolucijsku povijest sve tri proučavane vrste, odnosno odredila vrijeme koje je bilo potrebno za odvajanje njihovih linija (divergenciju), koristila sam paket računalnih programa: BEAUti v1.10.4 (Suchard i sur. 2018), BEAST v1.10.4 (Suchard i sur. 2018) i TreeAnnotator v1.10.4 (Suchard i sur. 2018). Pri analizi koristila sam Bayes MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) metodu, gdje je broj koraka, odnosno duljina lanca namještena na 10 milijuna, a stopa mutacije na 0,31 % po liniji po milijunu godina (stopa mutacije za porodicu Salmonidae prema Crête-Lafrenière i sur. 2012). Za vizualan prikaz rezultata koristila sam računalni program FigTree v1.4.4 (Rambaut 2018). Ulazni podaci su haplotipovi koje sam odredila prema sekvencama dobivenim iz uzoraka koristeći genski marker *cyt b*, kao i već korištena *Hucho hucho* sekvenca preuzeta iz Banke gena koja je ponovo poslužila za ukorjenjenje.

#### **4.7. Određivanje efektivne veličine i povezanosti populacija proučavanih vrsta pastrva**

Procjenu efektivne veličine populacija napravila sam koristeći Bayesovu metodu pomoću programa MIGRATE 3.7.2 (Beerli 2009). Analizom dobivenu srednju vrijednost genskog parametra ( $\Theta$ ) koristila sam za izračun efektivne veličine populacija ( $N_e$ ) prema formuli:  $N_e = \Theta / \mu$ , gdje  $\mu$  predstavlja stopu mutacije po jednoj sekvenci po generaciji (izračunata prema stopi mutacije za porodicu Salmonidae prema Crête-Lafrenière i sur. 2012). Efektivna veličina populacije govori o broju jedinki u populaciji koje se mogu razmnožavati i stoga je vrlo bitan parametar pri određivanju rizika od izumiranja za neku vrstu. Nadalje, međudjelovanja populacija sve tri proučavane vrste pastrva na širem području Plitvičkih jezera također sam analizirala Bayesovom metodom u programu MIGRATE 3.7.2 (Beerli 2009). Analizom dobiveni migracijski koeficijent ( $M$ ) koristila sam za izračun broja migranata po generaciji ( $N_m$ ) prema formuli:  $N_m = M * \mu$ , gdje  $\mu$  predstavlja stopu mutacije po jednoj sekvenci po generaciji (izračunata prema stopi mutacije za porodicu Salmonidae prema Crête-Lafrenière i sur. 2012). Tako sam odredila vrijednosti stope imigracije iz pojedine populacije u sve ostale

te broj migranata po generaciji. Za ulazne podatke koristila sam sekvence dobivene iz uzoraka koristeći genski marker *cyt b*.

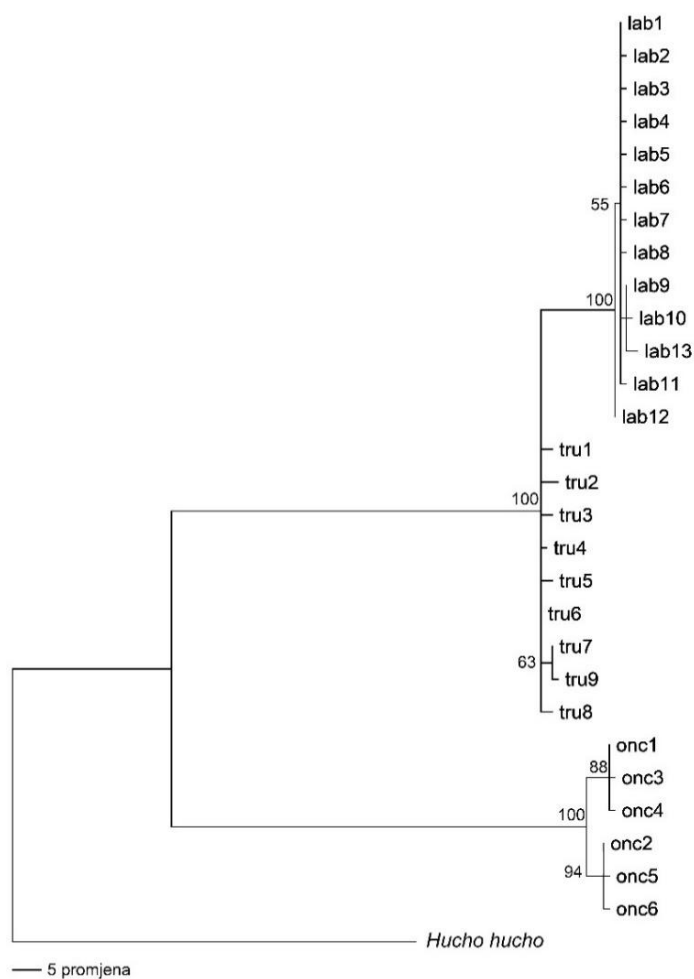
## 5. REZULTATI

### 5.1. Filogenetski odnosi proučavanih vrsta pastrva šireg područja Plitvičkih jezera

#### 5.1.1. Rezultati analiza gena za citokrom *b* (*cyt b*)

U prvoj analizi filogenetska rekonstrukcija temeljena je na sekvencama gena za citokrom *b* pastrva koje su ulovljene na širem području Plitvičkih jezera. Ulazni podaci za dobivanje filogenetskih stabala su sekvence duge 1141 parova baza, od kojih je 904 mjesta konstantno, a 237 varijabilno. Parsimonijski značajnih mjesta, odnosno onih koja imaju barem dva nukleotida koja se pojavljuju barem dva puta, je 158, a preostalih 79 varijabilnih mjesta nisu nositelji filogenetskog signala. Analize sam provela na ukupno 208 sekvenci pastrva dobivenih iz prikupljenih uzoraka jedinki ulovljenih na navedenom području, od kojih 111 pripada vrsti *Salmo labrax*, 72 vrsti *Salmo trutta* i 25 vrsti *Oncorhynchus mykiss*. Kako sam analizom htjela utvrditi odnose jedinki prisutnih na Plitvičkim jezerima, u analizu nisam uključivala sekvence izvan istraživanog područja, kao niti sekvence iz Banke gena (osim *Hucho hucho* sekvence za ukorjenjenje stabala). Utvrdila sam prisutnost 28 haplotipova, od kojih 13 pripada vrsti *Salmo labrax*, 9 vrsti *Salmo trutta* i 6 vrsti *Oncorhynchus mykiss*.

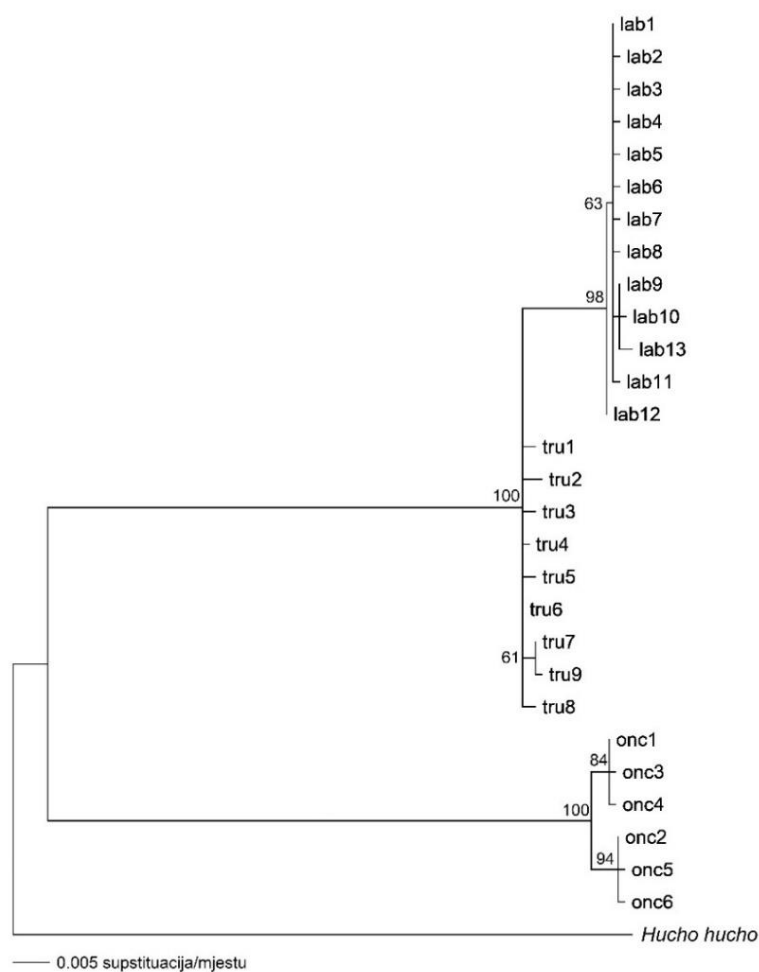
Dobivena stabla (Slika 14 i Slika 15) pokazuju jednaku topologiju, a haplotipovi su se grupirali na isti način. Kod vrste *S. labrax* vidi se najveća strukturiranost, no grane stabla su plitke, odnosno kratke, što može biti odraz nedavne divergencije. Kod vrste *S. trutta* uočeno je gotovo potpuno izostajanje bilo kakve strukturiranosti grana, što nije odraz prirodnog evolucijskog tijeka te razvitka neke vrste, a može ukazivati i na meku politomiju. Za vrstu *Oncorhynchus mykiss* jasno su definirane dvije odvojene linije, no unutar njih također nedostaje daljnje strukturiranosti. Osnovni podaci o filogenetskom stablu koje je dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) nalaze se u Tablici 3, dok je parametar (Ln) koji opisuje filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) naveden u opisu Slike 15.



**Slika 14.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju cyt *b* gena. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.

**Tablica 3.** Podaci o filogenetskom stablu dobivenom metodom najveće parsimonije (MP) na temelju cyt *b* gena.

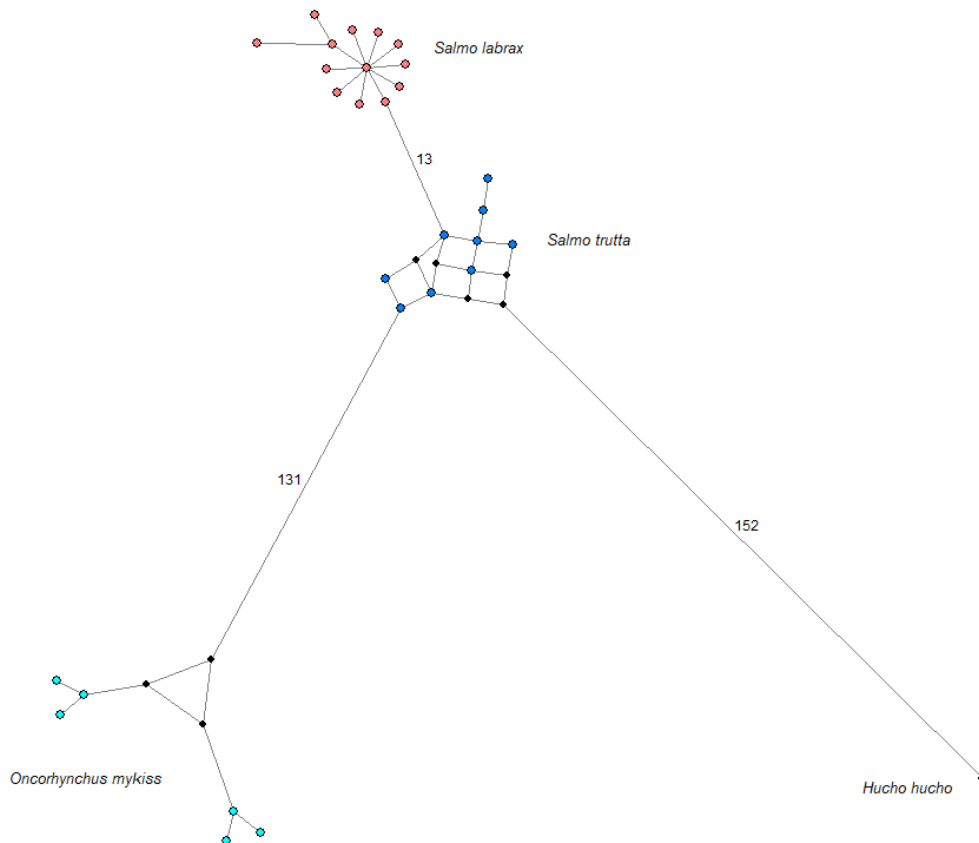
<b>Duljina stabla</b>	289
<b>Indeks konzistencije (CI)</b>	0,9066
<b>Indeks homoplazije (HI)</b>	0,0934
<b>Indeks retencije</b>	0,9706
<b>Indeks reskalirane konzistencije (RC)</b>	0,8799



**Slika 15.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju *cyt b* gena. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Ln = 2948,801.

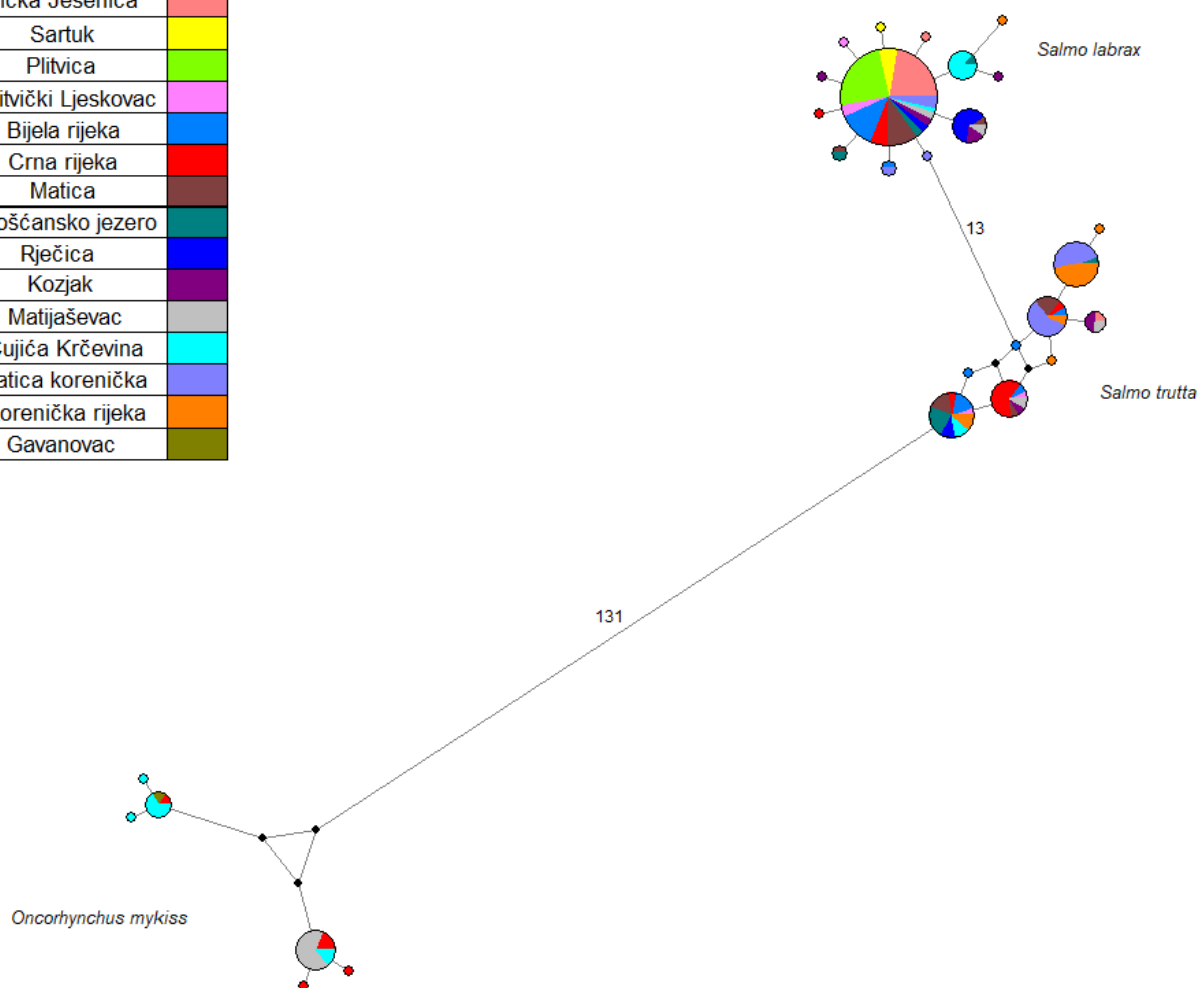
Filogenetske mreže (Slika 16 i Slika 17) dobivene metodom susjednog povezivanja (MJ) dobro pokazuju odvojenost haplotipova sve tri proučavane vrste određenih prema sekvencama *cyt b* gena, ali i njihovu povezanost unutar svake vrste. Upravo se na temelju oblika mreže može zaključiti o evolucijskom razvoju neke vrste; zvjezdasti oblik kod vrste *S. labrax* s jasno vidljivim ancestralnim haplotipom (haplotip iz kojeg su daljnjim mutacijama nastali svi ostali) karakterističan je za prirodne populacije, dok je nepregledna mreža s prisutnim medijskim vektorima (haplotipovi koji nisu primijećeni u ovom istraživanju, ali su potrebni kako bi mreža mogla biti izrađena i vizualno prikazana) kod vrste *S. trutta* pokazatelj neprirodnosti u vidu evolucije te potencijalno ukazuje na višestruki unos ove vrste na navedeno područje. Jasno se vidi i udaljenost vrste *O. mykiss* od roda *Salmo*, kao i početak razvitka dvije

zasebne linije vrste *O. mykiss* na navedenom području. Osim toga, filogenetska mreža izrađena koristeći sekvence jasno nam prikazuje zastupljenost, odnosno frekvenciju haplotipova na određenim lokalitetima.



**Slika 16.** Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) izrađena koristeći haplotipove na temelju *cyt b* gena. Svaki krug predstavlja jedan haplotip, a svaka vrsta označena je zasebnom bojom: ružičasta – *S. labrax*, plava – *S. trutta*, tirkizna – *O. mykiss*, zelena – *Hucho hucho* (*outgroup*). Duljine linija proporcionalne su broju mutacija, a crne točke označavaju haplotipove koji nisu primijećeni u ovom istraživanju (medijski vektori). Brojevi 13, 131 i 152 označavaju broj mutacija koji se dogodio između haplotipova, odnosno vrsta.

lokalityet	boja
Lička Jesenica	crvena
Sartuk	žuta
Plitvica	zeleno-žuta
Plitvički Ljeskovac	ružičasta
Bijela rijeka	plava
Crna rijeka	crvena
Matica	crna
Prošćansko jezero	zeleno-žuta
Rječica	plava
Kozjak	ljubičasta
Matijaševac	siva
Čujića Krčevina	svjetloplava
Matica korenička	plava
Korenička rijeka	narandžasta
Gavanovac	zeleno-žuta



**Slika 17.** Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) izrađena koristeći sekvence na temelju cyt b gena. Svaki krug predstavlja jedan haplotip, a lokalitet na kojem je on pronađen predstavljen je zasebnom bojom koja je naznačena u legendi. Veličina kružnih isječaka proporcionalna je broju sekvenca s određenog lokaliteta koje pripadaju pojedinom haplotipu. Duljine linija proporcionalne su broju mutacija, a crne točke označavaju haplotipove koji nisu primijećeni u ovom istraživanju (medijski vektori). Brojevi 13 i 131 označavaju broj mutacija koji se dogodio između haplotipova, odnosno vrsta.

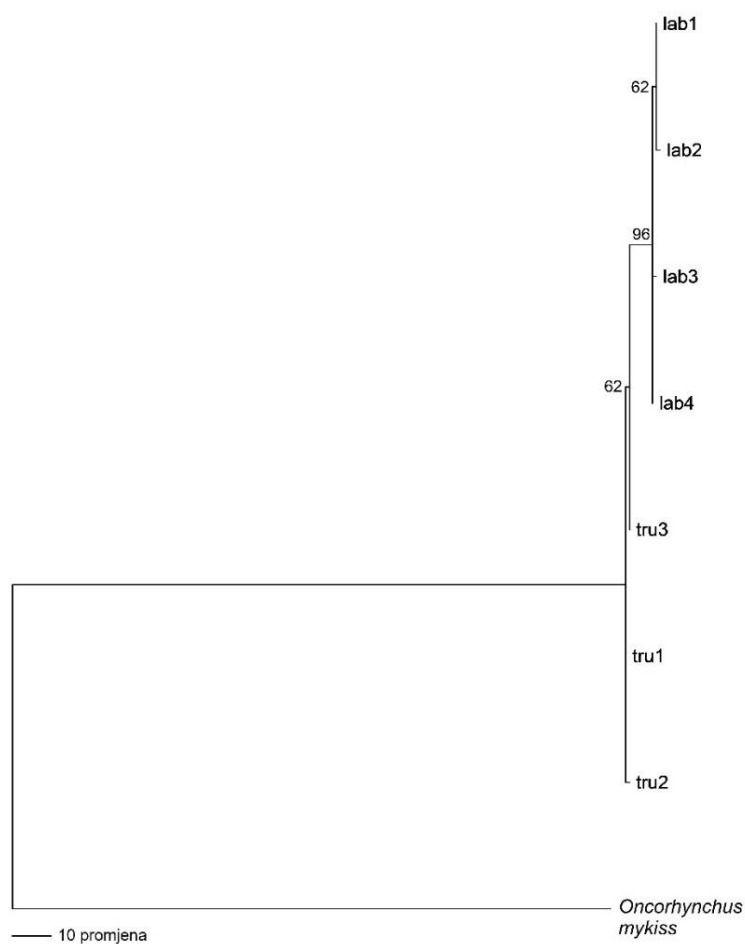
### 5.1.2. Rezultati analiza temeljeni na sekvencama kontrolne regije (CR)

U drugoj analizi filogenetska rekonstrukcija temeljena je na sekvencama za kontrolnu regiju pastrva koje su ulovljene na širem području Plitvičkih jezera. Ulazni podaci za dobivanje



filogenetskih stabala bile su sekvence duge 533 parova baza, od kojih je 210 mjesta konstantno, a 323 varijabilno. Parsimonijski značajnih mjesta je 10, a preostalih 313 varijabilnih mjesta nisu nositelji filogenetskog signala. Analize sam provela na ukupno 57 sekvenci pastrva dobivenih iz prikupljenih uzoraka jedinki ulovljenih na navedenom području, od kojih 31 pripada vrsti *S. labrax* i 26 vrsti *S. trutta*, dok za vrstu *O. mykiss* sekvenciranje nije uspješno provedeno za većinu uzoraka pa ona nije uključena u ovu analizu (osim kao *outgroup*). Zbog toga što sam analizom htjela utvrditi odnose jedinki prisutnih na Plitvičkim jezerima, u analizu nisam uključivala sekvence izvan istraživanog područja, kao niti sekvence iz Banke gena. Utvrdila sam prisutnost 7 haplotipova, od kojih 4 pripada vrsti *S. labrax*, a 3 vrsti *S. trutta*.

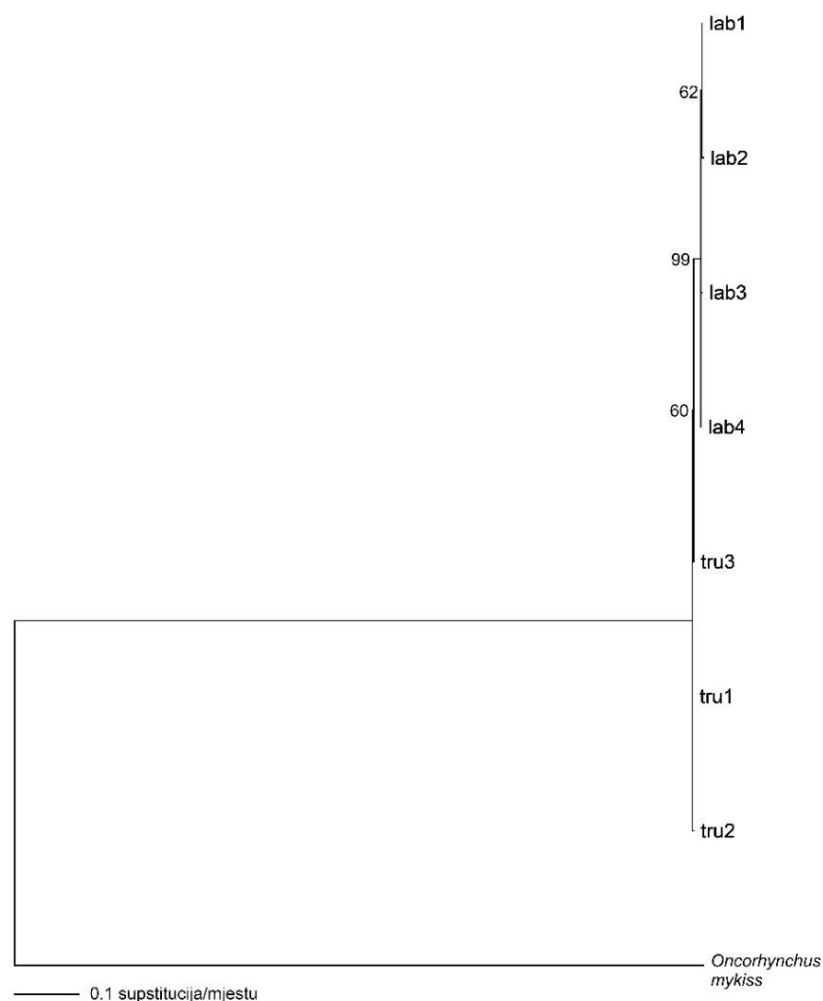
Dobivena stabla (Slika 18 i Slika 19) su slabo strukturirana te, iako postoje grananja, ona su vrlo plitka te pokazuju da haplotipove nije bilo moguće grupirati u odvojene linije, odnosno da njihova divergencija nije dobro prikazana, barem ne onako kako je to uspjelo koristeći sekvence gena za *cyt b*, već je u ovom slučaju uočena meka politomija. Iz tog razloga su daljnje detaljnije analize genske raznolikosti, kao i evolucijske povijesti te efektivne veličine i povezanosti populacija provedene samo na sekvencama gena za *cyt b*. Osnovni podaci o filogenetskom stablu koje je dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) nalaze se u Tablici 4, dok je parametar ( $L_n$ ) koji opisuje filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) naveden u opisu Slike 19.



**Slika 18.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju kontrolne regije (CR). Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.

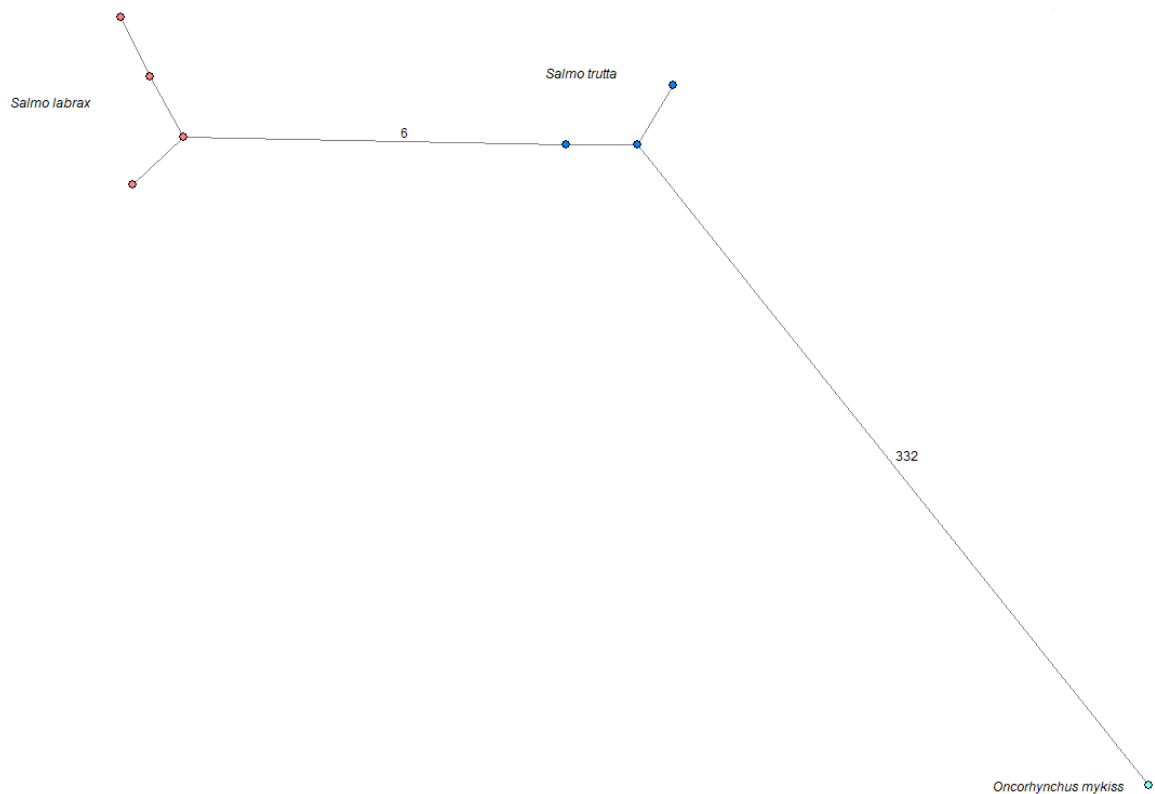
**Tablica 4.** Podaci o filogenetskom stablu dobivenom metodom najveće parsimonije (MP) na temelju kontrolne regije (CR).

<b>Duljina stabla</b>	327
<b>Indeks konzistencije (CI)</b>	0,9939
<b>Indeks homoplazije (HI)</b>	0,0061
<b>Indeks retencije</b>	0,9091
<b>Indeks reskalirane konzistencije (RC)</b>	0,9035



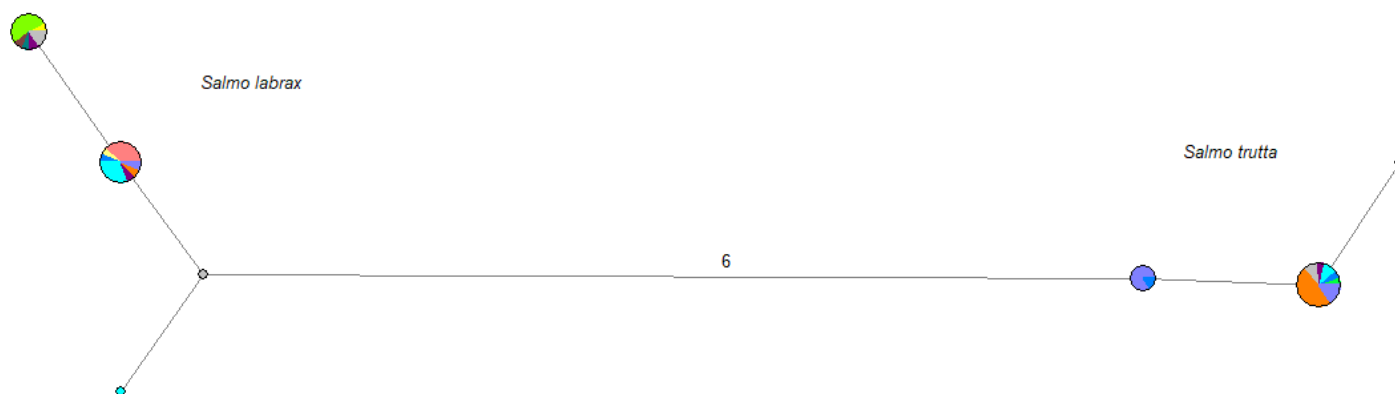
**Slika 19.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju kontrolne regije (CR). Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Ln = 1503,945.

Filogenetske mreže (Slika 20 i Slika 21) dobivene metodom susjednog povezivanja (MJ), za razliku od filogenetskih stabala, ipak bolje prikazuju odvojenost haplotipova proučavanih vrsta određenih prema sekvencama za kontrolnu regiju (CR), ali ne i njihovu brojnost i povezanost unutar svake vrste, koja je jako dobro vidljiva u rezultatima istih analiza s genom za *cyt b*.



**Slika 20.** Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) izrađena koristeći haplotipove dobivene na temelju kontrolne regije (CR). Svaki krug predstavlja jedan haplotip, a svaka vrsta označena je zasebnom bojom: ružičasta – *S. labrax*, plava – *S. trutta*, tirkizna – *O. mykiss* (*outgroup*). Duljine linija proporcionalne su broju mutacija. Brojevi 6 i 332 označavaju broj mutacija koji se dogodio između haplotipova, odnosno vrsta.

lokalitet	Lička Jesenica	Sartuk	Plitvica	Plitvički Ljeskovac	Bijela rijeka	Matica	Prošćansko jezero	Kozjak	Matijaševac	Čujića Krčevina	Matica korenička	Korenička rijeka
boja	crvena	žuta	zeleno	ružičasto	plava	crna	zeleno	ljubičasto	sivo	svjetloplavo	plavo	narandžasto



**Slika 21.** Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) izrađena koristeći sekvence na temelju kontrolne regije (CR). Svaki krug predstavlja jedan haplotip, a lokalitet na kojem je on pronađen predstavljen je zasebnom bojom koja je naznačena u legendi. Veličina kružnih isječaka proporcionalna je broju sekvenci s određenog lokaliteta koje pripadaju pojedinom haplotipu. Duljine linija proporcionalne su broju mutacija. Broj 6 označava broj mutacija koji se dogodio između haplotipova, odnosno vrsta.

## 5.2. Rasprostranjenost i zastupljenost pojedinih haplotipova proučavanih vrsta pastrva određenih na temelju gena za citokrom *b*

Rasprostranjenost haplotipova na pojedinim lokalitetima, kao i broj uzoraka u kojima je pronađen pojedini haplotip određen na temelju gena za citokrom *b* prikazala sam za svaku proučavanu vrstu zasebno, u Tablici 5, Tablici 6 i Tablici 7. Usporedbom tablica vidi se da je *S. labrax* i dalje jedina vrsta prisutna na lokalitetima Sartuk i Plitvica, dok je na lokaciji Lička Jesenice ipak pronađena jedna jedinka vrste *S. trutta*. Na svim preostalim lokalitetima uključenim u ovo istraživanje pronađene su obje vrste, osim na Gavanovcu za koji postoji samo jedan nalaz vrste *O. mykiss*. Zabilježeno prisustvo kalifornijske pastrve na samo četiri lokaliteta (Crna rijeka, Matijaševac, Čujića Krčevina i Gavanovac) odraz je malog broja uzoraka ove vrste koji su uključeni u ovo istraživanje, to nije njezin ukupan opseg rasprostranjenosti na Plitvičkim jezerima. Nadalje, iz Tablice 5 vidi se da za vrstu *S. labrax* postoji jedan haplotip (lab1) koji je dominantan na istraživanom području i upravo je to spomenuti ancestralni haplotip iz kojeg su vjerojatno nastali svi ostali. Prema Tablici 7 također bi se dalo zaključiti da postoji jedan dominantniji haplotip i za vrstu *O. mykiss*, onc1, dok ga po zastupljenosti slijedi haplotip onc2; navedena dva haplotipa vjerojatno su ishodišni haplotipovi dvije linije koje su prisutne na

promatranom području. Za razliku od toga, u Tablici 6, koja prikazuje rasprostranjenost haplotipova vrste *S. trutta*, teško je odrediti dominantni haplotip jer su pojedini prisutni u malom broju na više lokaliteta, dok su drugi ograničeni na nekoliko lokaliteta, ali s većom frekvencijom. To također može biti odraz nedovoljnog broja uzoraka prikupljenih na određenim lokalitetima.

**Tablica 5.** Broj jedinki vrste *Salmo labrax* na lokalitetima uključenim u ovo istraživanje na kojima je prisutan pojedini cyt *b* haplotip.

lokalitet/haplotip	lab1	lab2	lab3	lab4	lab5	lab6	lab7	lab8	lab9	lab10	lab11	lab12	lab13
Lička Jesenica	18	1											
Sartuk	5		1										
Plitvica	20												
Plitvički Ljeskovac	3			1									
Bijela rijeka	10				1								
Crna rijeka	5					1							
Matica	8						1				1		
Prošćansko jezero	2						1		1				
Rječica	2							7					
Kozjak	2							2		1	1		
Matijaševac	2							1					
Čujica Krčevina	1								6				
Matica korenička	3				1							1	
Korenička rijeka													1

**Tablica 6.** Broj jedinki vrste *Salmo trutta* na lokalitetima uključenim u ovo istraživanje na kojima je prisutan pojedini cyt *b* haplotip.

lokalitet/haplotip	tru1	tru2	tru3	tru4	tru5	tru6	tru7	tru8	tru9
Lička Jesenica	1								
Kozjak	2		1						
Matijaševac	1		1						
Plitvički Ljeskovac		1	1						
Bijela rijeka		3	1	1	1	1			
Crna rijeka		1	8	1					
Matica		3	1	3					
Prošćansko jezero		4					1		
Rječica		2							
Čujica Krčevina		2							
Korenička rijeka		2		1			9	1	1
Matica korenička				8			9		

**Tablica 7.** Broj jedinki vrste *Oncorhynchus mykiss* na lokalitetima uključenim u ovo istraživanje na kojima je prisutan pojedini *cyt b* haplotip.

lokalitet/haplotip	onc1	onc2	onc3	onc4	onc5	onc6
Crna rijeka	3	1	1	1		
Matijaševac	10					
Čujića Krčevina	2	4			1	1
Gavanovac		1				

### 5.3. Intraspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost proučavanih vrsta pastrva

#### 5.3.1. Rezultati analiza gena za citokrom *b* (*cyt b*)

Analizom sekvenci dobivenih koristeći genski marker *cyt b* odredila sam mjere intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti, odnosno genskog polimorfizma, za svaku od tri proučavane vrste pastrva (Tablica 8).

Populacije, odnosno lokaliteti koji nisu uzeti u obzir su oni na kojima je broj jedinki za pojedinu vrstu bio premali za provođenje analiza, odnosno na kojima je bila prisutna samo jedna jedinka određene vrste. To su Korenička rijeka za vrstu *S. labrax*, Lička Jesenica za vrstu *S. trutta* te Gavanovac za vrstu *O. mykiss*.

**Tablica 8.** Mjere genskog polimorfizma tri vrste pastrva na temelju *cyt b* gena. N – broj sekvenci, S – broj polimorfni mjesta,  $\eta$  - ukupan broj mutacija, h – broj haplotipova, Hd – raznolikost haplotipova,  $\pi$  – nukleotidna raznolikost, k – prosječan broj razlika nukleotida.

vrsta	lokalitet	N	S	$\eta$	h	Hd	$\pi$	k
<i>S. labrax</i>		111	13	13	13	0,457	0,00049	0,564
<i>S. trutta</i>		72	7	7	9	0,805	0,00214	2,44
<i>O. mykiss</i>		25	9	9	6	0,600	0,00305	3,48
<i>S. labrax</i>	Lička Jesenica	19	1	1	2	0,105	0,00009	0,105
	Sartuk	6	1	1	2	0,333	0,00029	0,333
	Plitvica	20	0	0	1	0	0	0
	Plitvički Ljeskovac	4	1	1	2	0,500	0,00044	0,500
	Bijela rijeka	11	1	1	2	0,182	0,00016	0,182
	Crna rijeka	6	1	1	2	0,333	0,00029	0,333
	Matica	10	2	2	3	0,378	0,00035	0,400
	Prošćansko jezero	4	2	2	3	0,833	0,00088	1
	Rječica	9	1	1	2	0,389	0,00034	0,389
	Kozjak	6	4	4	4	0,867	0,00134	1,533
	Matijaševac	3	1	1	2	0,667	0,00058	0,667
	Čujica Krčevina	7	1	1	2	0,286	0,00025	0,286
	Matica korenička	5	2	2	3	0,700	0,00070	0,800
<i>S. trutta</i>	Kozjak	3	4	4	2	0,667	0,00234	2,667
	Matijaševac	2	4	4	2	1	0,00351	4
	Plitvički Ljeskovac	2	1	1	2	1	0,00088	1
	Bijela rijeka	7	4	4	5	0,857	0,00167	1,905
	Crna rijeka	10	4	4	3	0,378	0,00070	0,800
	Matica	7	4	4	3	0,714	0,00200	2,286
	Prošćansko jezero	5	5	5	2	0,400	0,00175	2
	Rječica	2	0	0	1	0	0	0
	Čujica Krčevina	2	0	0	1	0	0	0
	Korenička rijeka	14	6	6	5	0,593	0,00152	1,736
	Matica korenička	17	1	1	2	0,529	0,00046	0,529
<i>O. mykiss</i>	Crna rijeka	6	9	9	4	0,800	0,00263	3
	Matijaševac	10	0	0	1	0	0	0
	Čujica Krčevina	8	9	9	4	0,750	0,00307	3,500

Promatrajući vrste, najniža genska raznolikost zabilježena je kod vrste *S. labrax*, iako je broj uzoraka kod ove vrste najveći, što potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja. Kod vrsta *S. trutta* i *O. mykiss* uočena je veća genska raznolikost, iako je njihov broj uzoraka korištenih pri analizi manji, pogotovo kod kalifornijske pastrve (u analizu je uključeno 25 uzoraka). Prema analizama rađenima za svaku pojedinu populaciju, ponovno su kod vrste *S. labrax* zamijećene vrlo niske vrijednosti za gensku raznolikost, dok su kod pojedinih populacije *S. trutta* i *O. mykiss* zamijećene znatno više vrijednosti. Za vrstu *S. labrax* najniža genska raznolikost



zabilježena je na lokalitetu Plitvica gdje raznolikost haplotipova iznosi 0, što znači da svih 20 uzoraka s navedenog lokaliteta korištenih u ovom istraživanju pripada istom haplotipu. Bitno je napomenuti da upravo na tom lokalitetu postoji čista populacija ove vrste. Također, populacija ove vrste koja nastanjuje Ličku Jesenicu ističe se vrlo niskom genskom raznolikošću unatoč zadovoljavajućem broju uzoraka korištenih u analizama. Najveća genska raznolikost ove vrste uočena je na lokalitetu Kozjak, s najvišim vrijednostima za parametre raznolikost haplotipova, nukleotidna raznolikost te prosječan broj razlika nukleotida. Nadalje, iako su za vrstu *O. mykiss* u dvije od tri populacije zabilježene relativno visoke vrijednosti raznolikosti haplotipova, nukleotidne raznolikost, kao i prosječnog broja razlika nukleotida, što zapravo ukazuje na dublju strukturiranost, kod treće populacije na lokalitetu Matijaševac te vrijednosti iznose nula. To znači da ponovno svi prikupljeni uzorci s navedenog lokaliteta pripadaju istom haplotipu, ukazujući na nepostojanje genske raznolikosti. Kod vrste *S. trutta* su u pojedinim populacijama također zabilježene visoke vrijednosti genske raznolikosti, no u obzir se mora uzeti mogućnost nerealnih procjena zbog malog broja uzoraka (npr. ako je analiza rađena samo s dva uzorka). Najviše vrijednosti za nukleotidnu raznolikost te prosječan broj razlika nukleotida zabilježene su kod populacija ove vrste na lokalitetima Matijaševac, Kozjak i Matica, a najveća vrijednost raznolikosti haplotipova kod uočena je za populacije koje nastanjuju Matijaševac, Plitvički Ljeskovac i Bijelu rijeku. Genska raznolikost iznosi 0 za populacije na lokalitetima Rječica i Čujića Krčevina, dok su najniže vrijednosti za nukleotidnu raznolikost i prosječan broj razlika nukleotida zabilježene za populaciju na lokalitetu Matica korenička. Zanimljivo je primijetiti kako su za obje vrste roda *Salmo* više vrijednosti genske raznolikosti zabilježene upravo u jezerskim populacijama.

### **5.3.2. Rezultati analiza temeljeni na sekvencama kontrolne regije (CR)**

Analizom sekvenci dobivenih na temelju kontrolne regije (CR) određene su mjere intraspecijske genske raznolikosti, odnosno genskog polimorfizma, za vrste pastrva za koje su sekvence uspješno dobivene: *S. labrax* i *S. trutta* (Tablica 9).

S obzirom na to da su sekvence dobivene na temelju cyt *b* gena kompletne, i da su općenito prikladnije za ovakav tip analize, sekvence dobivene na temelju kontrolne regije korištene su samo za određivanje genske raznolikosti unutar vrsta, a ne i populacija. Zanimljivo je kako je za vrstu *S. labrax* procijenjena slična genska raznolikost kao i za cyt *b* gen, dok je kod vrste *S. trutta* zabilježena genska raznolikost u ovom slučaju znatno niža u odnosu na

rezultat analize koja je koristila sekvence dobivene na temelju *cyt b* gena. Također, procijenjena genska raznolikost vrste *S. labrax* viša je nego za vrstu *S. trutta*.

**Tablica 9.** Mjere genskog polimorfizma dvije vrste pastrva na temelju *cyt b* gena. N – broj sekvenci, S – broj polimorfnih mjesta,  $\eta$  - ukupan broj mutacija, h – broj haplotipova, Hd – raznolikost haplotipova,  $\pi$  – nukleotidna raznolikost, k – prosječan broj razlika nukleotida.

vrsta	N	S	$\eta$	h	Hd	$\pi$	k
<i>S. labrax</i>	31	3	3	4	0,574	0,0013	0,692
<i>S. trutta</i>	26	2	2	3	0,428	0,0008	0,446

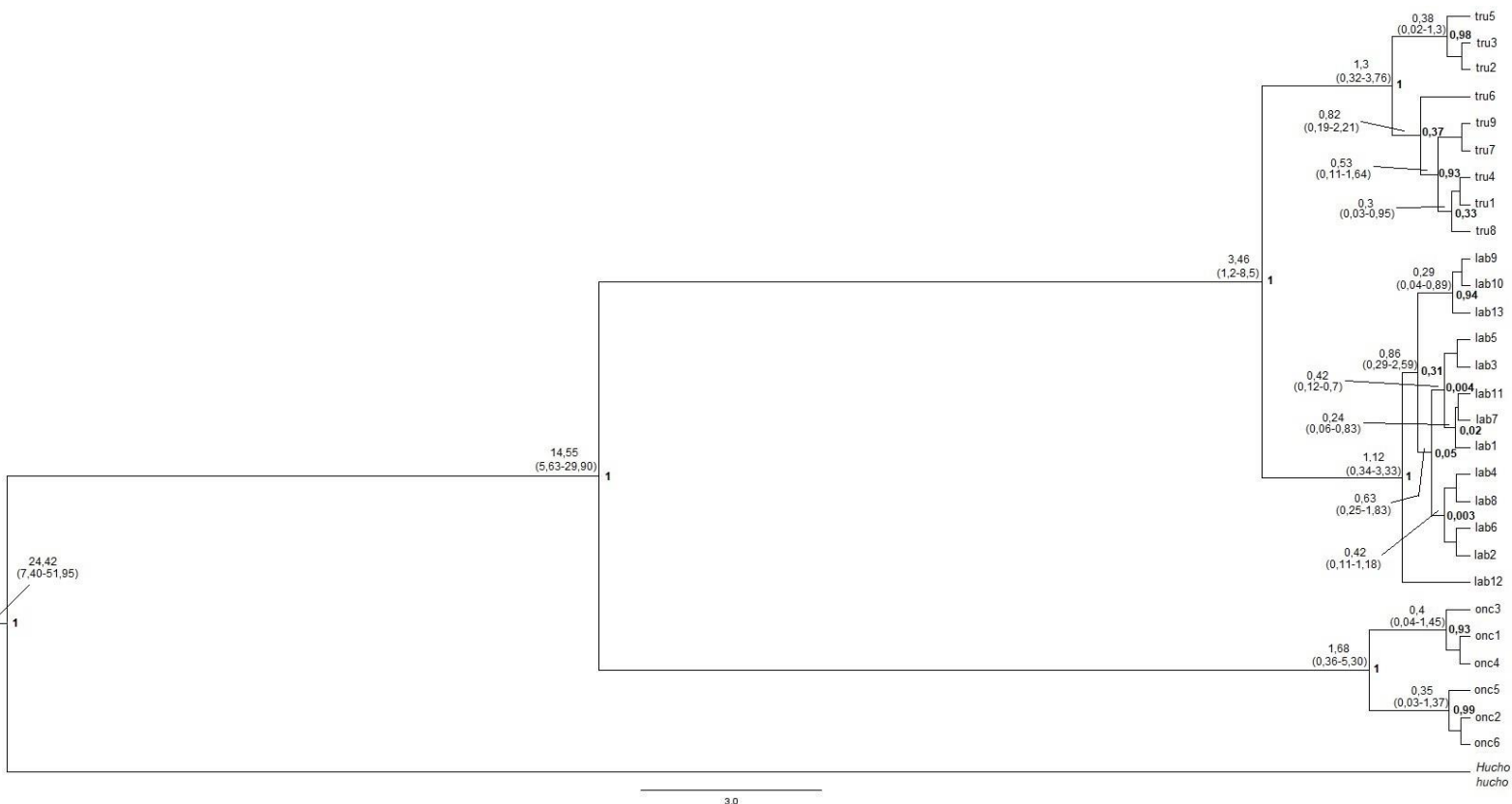
#### 5.4. Evolucijska povijest proučavanih vrsta pastrva određena na temelju gena za citokrom *b*

Evolucijsku povijest sve tri proučavane vrste pastrva, odnosno što točnije vrijeme kada je došlo do divergencije njihovih linija odredila sam koristeći haplotipove dobivene prema sekvencama na temelju *cyt b* gena.

Rezultati (Slika 22) pokazuju da se *Oncorhynchus mykiss* od roda *Salmo* odvojio prije otprilike 14,55 milijuna godina, što odgovara geološkom razdoblju miocen, no dobiveni raspon godina vrlo je velik pa ne možemo biti sigurni u ovu procjenu. To može biti odraz i malog broja skupljenih i analiziranih uzoraka za ovu vrstu. Daljnje odvajanje dvije linije ove vrste dogodilo se prije otprilike 1,68 milijuna godina, što odgovara razdoblju pleistocena. Preostala manja grananja također pripadaju ovom geološkom razdoblju. Razdvajanje vrsta *S. trutta* i *S. labrax* dogodilo je prije otprilike 3,46 milijuna godina, odnosno za vrijeme pliocena. Za daljnje odvajanje *S. trutta* na dvije linije procijenjeno je da se dogodilo prije otprilike 1,3 milijuna godina, dakle u razdoblju pleistocena. Prema izračunatim procjenama su se i sva preostala grananja unutar ove vrste dogodila za vrijeme tog razdoblja. Treba primijetiti kako su grane kod ove vrste pliće nego kod vrste *O. mykiss*.

Unutar vrste *S. labrax* dogodilo se najviše grananja, odnosno divergencija. Za prvo je procijenjeno da se dogodilo prije otprilike 1,12 milijuna godina, odnosno u geološkom razdoblju pleistocen, no njime nismo dobili dvije linije iz kojih su nastajali preostali haplotipovi. Tek bi za drugo grananje unutar vrste mogli reći da predstavlja grananje na dvije linije, a za njega je procijenjeno da se dogodilo prije 0,86 milijuna godina, dakle također za

vrijeme pleistocena. Još jedno značajnije grananje dogodilo se prije otprilike 0,63 milijuna godina (pleistocen). Ipak, kod ove vrste grananja su mnoga, a grane vrlo plitke, što znači da se relativno nedavno dogodilo više divergencija, ukazujući na „mladost“ ove vrste.



**Slika 22.** Filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom MCMC metodom koristeći haplotipove dobivene na temelju *cyt b* gena iz uzoraka skupljenih sa šireg područja Plitvičkih jezera. Brojevi s lijeve strane grananja označavaju vrijeme u milijunima godina kada je došlo da grananja (divergencije): prvi broj predstavlja najvjerojatniju vrijednost, dok brojevi u zagradi (ispod) predstavljaju raspon, odnosno minimalnu i maksimalnu vrijednost. Gdje nije bilo dovoljno mjesta, vrijednosti su napisane dalje od samog grananja, a linijom je označeno na koje grananje se oni odnose. Podebljani brojevi s desne strane grananja označavaju podržanost.

### 5.5. Efektivna veličina i povezanost populacija proučavanih vrsta pastrva određene na temelju gena za citokrom *b*

Efektivna veličina populacije te povezanost populacija određivane su samo na temelju gena za *cyt b* jer je on, za razliku od kontrolne regije (CR), pogodan za analize populacijske

genetike zbog svoje duljine, varijabilnosti te informativnosti. Ono što je ograničavajuće kod određivanja efektivne veličine populacija na ovaj način jest broj uzoraka, koji je u ovom istraživanju za pojedine populacije nedovoljan kako bi se dobile realne vrijednosti. Stoga sam za svaku vrstu izdvojila rezultate populacija s najviše uzoraka iz Tablice 10, kako bi bila sigurna u njihovu pouzdanost.

**Tablica 10.** Procjene efektivnih veličina populacija tri vrste pastrva na širem području Plitvičkih jezera.  $\Theta$  – srednja vrijednost genskog parametra na temelju kojeg je izračunata efektivna veličina populacija ( $N_e$ ).

vrsta	lokalitet	$\Theta$	$N_e$
<i>S. labrax</i>	Lička Jesenica	0,00003	25
	Sartuk	0,06634	55283
	Plitvica	0,00002	17
	Plitvički Ljeskovac	0,01689	14075
	Bijela rijeka	0,00003	25
	Crna rijeka	0,01176	9800
	Matica	0,06928	57733
	Prošćansko jezero	0,02905	24208
	Rječica	0,00015	125
	Kozjak	0,08169	68075
	Matijaševac	0,08282	69017
	Čujića Krčevina	0,00048	400
	Matica korenička	0,06411	53425
	Korenička rijeka	0,08283	69025
<i>S. trutta</i>	Lička Jesenica	0,02961	24675
	Kozjak	0,07207	60058
	Matijaševac	0,00018	150
	Plitvički Ljeskovac	0,03761	31342
	Bijela rijeka	0,03898	32483
	Crna rijeka	0,00025	208
	Matica	0,04300	35833
	Prošćansko jezero	0,07142	59517
	Rječica	0,03163	26358
	Čujića Krčevina	0,00652	5433
	Korenička rijeka	0,00034	283
	Matica korenička	0,00010	83
<i>O. mykiss</i>	Crna rijeka	0,00093	775
	Matijaševac	0,00017	142
	Čujića Krčevina	0,00015	125
	Gavanovac	0,03502	29183

Za vrstu *S. labrax* bi prema broju uzoraka prikupljenih s pojedinih lokaliteta najrealniji rezultati za efektivne vrijednosti populacija bili za populaciju na lokalitetima Lička Jesenica, Plitvica, Bijela rijeka, Matica, Rječica te Čujića Krčevina (lokaliteti s minimalno 7 uzoraka). Procjene efektivnih veličina populacija su najgore za Ličku Jesenicu i Plitvicu s kojih je prikupljeno upravo najviše uzoraka, što je vrlo alarmantno jer su njihove efektivne veličine procijenjene na 25, odnosno 17 jedinki. Procjena za Bijelu rijeku također je vrlo zabrinjavajuća (25). Za populacije koje nastanjuju Rječicu i Čujića Krčevinu rezultati su bolji, ali se te vrijednosti također smatraju nedovoljnima (125 i 400). Jedino je vrijednost efektivne populacije u Matici visoka, no njezina vjerodostojnost je upitna (57733). Za vrstu *S. trutta* vrijedi izdvojiti populacije na lokalitetima Bijela rijeka, Crna rijeka, Matica, Korenička rijeka i Matica korenička. Efektivne veličine populacija za Bijelu rijeku i Maticu vrlo su velikih vrijednosti (32483 i 35833), dok su za Crnu rijeku, Koreničku rijeku i Maticu koreničku vrijednosti prilično niske (208, 283, 83), no nisu toliko niske kao kod pojedinih populacija vrste *S. labrax*. Efektivne veličine populacija za vrstu *O. mykiss* na lokalitetima Matijaševac i Čujića Krčevina također su prilično niskih vrijednosti (142 i 125).

Prilikom određivanja povezanosti populacija, odnosno procjenjivanja broja migranata iz određene populacije neke vrste u sve ostale moguće populacije, pomoću migracijskog koeficijenta ( $M$ ) računala sam broj migranata po generaciji ( $Nm$ ). Analiza je rađena za ukupno 30 populacija, od kojih 14 pripada vrsti *S. labrax*, 12 vrsti *S. trutta* te 4 vrsti *O. mykiss*. Od 870 mogućih kombinacija migracija iz jedne populacije u drugu, ne mogu izdvojiti niti jedan rezultat za broj migranata po generaciji koji prelazi vrijednost nula; najviša zabilježena vrijednost iznosi 0,00111072. Ti rezultati upućuju na izraženu izoliranost populacija te fragmentaciju staništa proučavanih vrsta pastrva. Također, na rezultate je utjecao i premali broj uzoraka prikupljenih s pojedinih lokaliteta zbog kojeg bi se rezultati mogli smatrati neadekvatnima za interpretaciju, kao i mala genska raznolikost populacija zbog koje se migracije vrsta ne mogu pratiti na ovaj način.

## 6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem potvrđene su neke već ranije ustanovljene činjenice, no otkrivene su i neke nove te neočekivane. Dobivenim filogenetskim stablima i mrežama izrađenim na temelju dva različita genska markera, citokroma *b* i kontrolne regije, još jednom je potvrđeno kako je za filogenetska istraživanja salmonidnih vrsta pogodniji upravo citokrom *b*. Iako je kontrolna regija često korištena u filogenetskim istraživanjima salmonidnih vrsta, pa tako i *S. trutta* (Bernatchez i sur. 1992; Apostolidis i sur. 1997; Bernatchez 2001; Ninua i sur. 2018; Segherloo i sur. 2021), utvrđeno je kako taj marker nije dobro koristiti za navedenu vrstu, kao ni vrstu *S. labrax* jer u njihovom slučaju ne mutira dovoljno brzo (Buj i sur. 2020). To se vidi na temelju analize kojom je utvrđen broj parsimonijski značajnih mjesta; prilikom analiza sekvenci duljine 1141 parova baza koje su dobivene na temelju *cyt b* gena njegova ustanovljena vrijednost iznosi 158, dok je za sekvence duljine 533 parova baza izračunat broj do samo 10 parsimonijski značajnih mjesta. Osim toga, broj dobivenih haplotipova četiri je puta veći u analizama prilikom kojih se koristio citokrom *b*. To se odrazilo i na izgled filogenetskih stabala i mreža; na temelju *cyt b* gena dobivena su detaljnija stabla koja su više strukturirana te imaju dublje grane i karakterizira ih veća podržanost grananja, dok stabla temeljena na kontrolnoj regiji pokazuju slabu strukturiranost, loše razdvajanje proučavanih vrste, nisku raznolikost, kao i meku politomiju. Kod vrste *S. labrax* vidi se određena strukturiranost, no slabo je izražena, a grane su vrlo plitke, što potvrđuje nedovoljnu brzinu mutacija kontrolne regije za primjenu prilikom provođenja filogenetskih analiza ove vrste. Zbog toga je citokrom *b* pogodniji za analize koje uključuju određivanje intraspecijske i interpopulacijske genske raznolikosti (Buj i sur. 2020), jer pomoću tog markera dobijemo najbolje rezultate na temelju kojih se mogu donositi i adekvatni zaključci (Perea i sur. 2010; Buj i sur. 2014). Daljnjom analizom filogenetskih stabala i mreža dobivenih na temelju *cyt b* gena također je potvrđeno da je *S. labrax* zavičajna vrsta na području Plitvičkih jezera čiji je evolucijski razvoj na tom području potekao od jednog ancestralnog haplotipa, od kojeg su se daljnjim mutacijama razvili svi ostali. To se na filogenetskom stablu vidi kao strukturiranost, koja je kod ove vrste najizraženija, a na filogenetskoj mreži upravo u njezinom zvjezdastom obliku. Zvjezdasti oblik filogenetske mreže upravo je odraz prirodnog evolucijskog tijeka razvitka neke vrste, bez prisustva paralelne evolucije iz nekog drugog haplotipa (Naik i sur. 2020; Tsai i sur. 2021). Navedeno je potvrđeno i velikim brojem uzoraka koji su prikupljeni na gotovo svim lokalitetima (s iznimkom Koreničke rijeke), a pripadaju istom haplotipu. Upravo je taj haplotip, lab1, ancestralni haplotip ove vrste. Također, bitno je primijetiti i grane stabla koje su manje, odnosno pliće kod ove vrste,

što upućuje na nedavne divergencije različitih linija unutar vrste. Za razliku od toga, za vrstu *S. trutta* filogenetsko stablo vrlo je slabo strukturirano, a filogenetska mreža nije pravilnog, zvjezdastog oblika, niti pokazuje ikakvu strukturu ili razdvojenost haplotipova u linije. Ti rezultati mogu podržati već konstatiranu činjenicu da je *S. trutta* na područje Plitvičkih jezera unesena kao strana vrsta (Buj i sur. 2020), i to više puta te iz više različitih izvora s obzirom na prisustvo velikog broja prisutnih haplotipova. To se također vidi i u tome što za ovu vrstu ne postoji jedan dominantni haplotip iz kojeg bi se svi preostali mogli razviti, već je njihova brojnost ujednačenija nego kod vrste *S. labrax*. Za vrstu *O. mykiss* filogenetska stabla i mreže pokazuju prisutnost dvije linije unutar kojih dalje ne postoji strukturiranost, što znači da je ova vrsta unesena iz dva različita izvora, a unutar svake linije postoji potencijal za daljnju evoluciju novih linija.

Što se tiče genske raznolikosti, najniže vrijednosti parametara koji ju opisuju zabilježeni su kod vrste *S. labrax*, što je također već ranije utvrđeno (Buj i sur. 2020). Iako se radi o vrsti koja se tek nedavno počela evolucijski razvijati na ovom području (pleistocen) te je zbog toga mala genska raznolikost i očekivana jer nije prošlo dovoljno vremena za veću divergenciju, dobivene vrijednosti su zabrinjavajuće niske i nisu odraz samo „mladosti“ vrste već i izraženih antropogenih čimbenika koji negativno djeluju na nju. Primjer koji može savršeno ilustrirati ozbiljnost situacije jest potpuni nestanak populacije ove vrste s lokaliteta Čujića Krčevina, na kojem su zabilježene vrlo niske vrijednosti genske raznolikosti. No, s navedenog lokaliteta nije nestala samo ova vrsta, već i preostale vrste pastrva koje su ondje zabilježene, pokazujući kako i visoke vrijednosti genske raznolikosti (zabilježene kod kalifornijske pastrve) nisu dovoljne ako se utjecaj čovjeka ne ukloni. Ono što je također zabrinjavajuće vezano uz vrstu *S. labrax* jest da, iako je istraživanjem potvrđeno da na lokalitetima Sartuk i Plitvica, a vrlo vjerojatno i Lička Jesenica (uz iznimku ulova jedne *S. trutta*), i dalje postoje čiste populacije ove vrste, na navedenim lokalitetima njezine populacije imaju vrlo nisku gensku raznolikost. Za razliku od toga, rezultati analize za vrstu *S. trutta* pokazuju veću gensku raznolikost vrste. No, potrebno je uzeti u obzir da procjene za određene populacije ove vrste ne mogu biti realne zbog nedostatka uzoraka po lokalitetu. Ipak, iz rezultata je vidljivo da ova vrsta na području Plitvičkih jezera ima velik broj haplotipova, od kojih su neki relativno velike raznolikosti, što upućuje na veliki evolucijski potencijal, čime može predstavljati prijetnju ugroženoj *S. labrax*. Nadalje, rezultati analize za vrstu *O. mykiss* također pokazuju visoku gensku raznolikost ove vrste. Posebno je zanimljivo što je zabilježen mali broj haplotipova koji se međusobno podosta razlikuju, što uz visoke vrijednosti prosječnog broja razlika nukleotida jasno upućuje na

postojanje odvojenih linija unutar ove vrste koje su unesene na ovo područje s dva različita lokaliteta. To također ukazuje na veliki evolucijski potencijal vrste, što je posebno problematično jer se radi o vrlo invazivnoj vrsti koja ugrožava mnoge druge vrste, ne samo *S. labrax*, te negativno utječe na cijele ekosustave. Još jedan dokaz koji ide u prilog unosu vrsta *S. labrax* i *O. mykiss* na područje Plitvičkih jezera iz više različitih izvora jest upravo i velika genska raznolikost zabilježena kod njihovih populacija. Naime, razvoj unesenih populacija temelji se na ograničenom broju jedinki koje su unesene na neko područje zbog čega utjecaji prirodne selekcije i genskog otklona, koji djeluje preko učinka utemeljitelja i učinka uskog grla, uzrokuju smanjenu gensku raznolikost takvih populacija u odnosu na zavičajne (Hagenblad i sur. 2015; Zhang i sur. 2021). U ovom slučaju, situacija je obrnuta i unesene vrste okarakterizirane su većom genskom raznolikošću nego zavičajna vrsta. Jedno od objašnjenja ove pojave jest upravo povećanje genske raznolikosti unosom genski različitih jedinki koje su potekle iz drugačijih izvora, odnosno različitih lokaliteta. Tome u prilog ide i činjenica da je već potvrđeno kako su vrste *S. trutta* i *O. mykiss* često korištene za rekreacijski ribolov te namjerno unesene u vodotoke u kojima nisu zavičajne sa svrhom poribljavanja (Buj i sur. 2020; Valić i sur. 2008). Kako je utvrđeno da populacije koje se koriste za poribljavanje i koje su umjetno uzgojene pokazuju manju gensku raznolikost (Valiquette i sur. 2014), ovi rezultati s priličnom sigurnošću upućuju na višestruko unošenje jedinki ovih vrsta na proučavano područje iz različitih izvora.

Filogenetsko stablo pomoću kojeg možemo dobiti detaljniji uvid u evolucijsku povijest triju proučavanih vrsta pastrva okvirno nam pokazuje vremena kada su se dogodile pojedine divergencije. Procjene za odvajanje vrste *O. mykiss* od roda *Salmo* moraju se uzeti s rezervom jer su analize rađene na malom broju uzoraka, a dobiveni raspon godina za događaj divergencije vrlo je širok, otprilike 5–30 milijuna godina, te pripada razdobljima oligocena i miocena. Taj rezultat se djelomično i preklapa s dostupnom literaturom, prema kojoj se navedeno razdvajanje vrste dogodilo prije otprilike 28 milijuna godina, odnosno u oligocenu (Whiteley i sur. 2019; Crête-Lafrenière i sur. 2012). Ipak, zbog širokog vremenskog raspona dobivena srednja vrijednost iznosi 14,55 milijuna godina te ovaj događaj smješta u miocen. Nadalje, ovim stablom također je potvrđeno postojanje dvije linije ove vrste na promatranom području, a vidi se i bolja strukturiranost nego na preostalim stablima, rađenim MP i ML metodama. Razdvajanje vrsta *S. trutta* i *S. labrax* nešto je preciznije određeno, s rasponom 1,2–8,5 milijuna godina, što odgovara mlađem miocenu i pliocenu, dok srednja vrijednost od 3,46 milijuna godina odgovara starijem pliocenu. Kod vrste *S. trutta* također se vidi bolja strukturiranost, kao



i potencijalno postojanje dvije linije, što nije slučaj na preostalim stablima. Jednoj liniji pripadaju haplotipovi koji su najčešći i najbrojniji na lokalitetima Bijela rijeka, Crna rijeka i Prošćansko jezero, a drugoj liniji pripadaju svi preostali haplotipovi koji su podijeljeni daljnjim divergencijama unutar linije. Ova strukturiranost nam govori o mogućnosti postojanja dva izvora, no teško je odrediti točne prostore za koje bi ih vezali, pogotovo u slučaju druge linije, dok se za prvu može reći da je otprilike lokalizirana na Prošćansko jezero i njezine pritoke. Filogenetsko stablo za vrstu *S. labrax* ponovno pokazuje najbolju strukturiranost, ali i plitke grane, što upućuje na brojne nedavne divergencije koje odgovaraju razdoblju pleistocena. Prva divergencija dogodila se prije otprilike 1,12 milijuna godina, a posljednja izračunata prije otprilike 240 tisuća godina, što okvirno odgovara i razdoblju prve pleistocenske glacijacije, odnosno Günz glacijaciji (Chappell 1968).

Općenito, pastrve su predatori koji preferiraju vode niže temperature te ne obitavaju u populacijama visoke gustoće. Ipak, niske vrijednosti efektivne veličine populacija, čak i na lokalitetima gdje je prikupljeno najviše uzoraka, odraz su niske genske raznolikosti jer je pri računu korišten genski parametar ( $\Theta$ ). Analiza koja je utvrdila efektivne veličine populacija za vrstu *S. labrax* dala je zabrinjavajuće rezultate; osim što je kod njezinih čistih populacija zabilježena vrlo niska genska raznolikost, izračunate efektivne veličine populacija također su male, dok su najniže vrijednosti uočene ponovno na lokalitetima gdje su prisutne njezine čiste populacije. Osim negativnog utjecaja stranih vrsta u vidu kompeticije ili predacije, kao i antropogeno uvjetovanog onečišćenja koje uzrokuje degradaciju staništa, jedno od objašnjenja takvih vrijednosti su i rezultati analiza kojima se određivao broj migranata po generaciji. Ispostavilo se da su migracije ove vrste iz jedne u drugu populaciju vrlo male, uzrokujući izoliranost populacija te onemogućujući protok gena između njih, što posljedično rezultira i smanjenom genskom raznolikošću. Izoliranost populacija može biti posljedica i fragmentacije staništa ove vrste koja je ustanovljena na promatranom području; na određenim vodotocima koji su od važnosti za reproduktivne migracije pastrva izgrađene su brane i pregrade koje im onemogućuju odlazak na mrijest, a time i potencijalno miješanje populacija. Ono što je također zabrinjavajuće jesu rezultati dobiveni za vrste *S. trutta* i *O. mykiss*; efektivne veličine populacija za ove dvije unesene vrste uglavnom su relativno više nego kod zavičajne, što uz već utvrđenu veću gensku raznolikost navedenih vrsta govori o njihovom evolucijskom potencijalu, što predstavlja ozbiljnu prijetnju opstanku vrste *S. labrax* na području Plitvičkih jezera. Osim toga, rezultati analiza o migracijama jedinki između populacija proučavanih vrsta pokazali su da migracije gotovo pa niti ne postoje. To je odraz vrlo izražene izoliranosti populacija i

fragmentacije staništa proučavanih vrsta. Na rezultate je utjecala i činjenica da je analiza rađena s ograničenim brojem uzoraka, koji je ponekad bio premali da bi se rezultati mogli smisleno interpretirati. Osim toga, i niske vrijednosti genske raznolikosti koje su primijećene kod populacija također su utjecale na rezultate koji govore o migracijama jedinki jer su analize rađene upravo na temelju genskih sekvenci. Stoga bi buduća istraživanja migracija među populacijama proučavanih vrsta bilo bolje provoditi nekom adekvatnijom metodom, kao što je to obilježavanje jedinki ili korištenje okolišne DNA.

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su vrlo ozbiljnu situaciju vrste *S. labrax* u vidu njezinog opstanka na području Plitvičkih jezera, kao i naglasili negativne utjecaje koje vrste *S. trutta* i *O. mykiss* mogu imati na njezine populacije. Nadalje, naglasili su važnost migracija vrste s ciljem postizanja veće genske raznolikosti i efektivne veličine populacija, kao i potrebu rješavanja problema antropogeno prouzročene fragmentacije staništa, odnosno izgradnje pregrada i brana na vodotocima, koja je uzrokovala izoliranost populacija. Također, pokazali su negativan utjecaj poribljavanja zaštićenog područja stranim vrstama, koje djelujući zajedno sa svim prethodno navedenim čimbenicima vrlo vjerojatno može dovesti do izumiranja ugrožene zavičajne vrste.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju cjelokupnog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Vrsta *S. labrax* zavičajna je vrsta šireg područja Plitvičkih jezera, dok su *S. trutta* i *O. mykiss* strane vrste unesene na promatrano područje više puta iz više različitih izvora.
- Genska raznolikost zavičajne vrste *S. labrax* zabrinjavajuće je niska, dok su kod druge dvije promatrane vrste, *S. trutta* i *O. mykiss*, zabilježene veće vrijednosti, upućujući na njihov evolucijski potencijal na promatranom području.
- Efektivne veličine populacija zavičajne *S. labrax* također su relativno nižih vrijednosti nego kod dvije unesene vrste, *S. trutta* i *O. mykiss*, dok su najniže vrijednosti zabilježene upravo kod njezinih čistih populacija, ukazujući na ozbiljan rizik od izumiranja.
- Migracije su kod sve tri promatrane vrste gotovo zanemarive, upućujući na izoliranost njihovih populacija i vrlo slabi protok gena između njih, ako je uopće prisutan, ali i potrebu dodatnog istraživanja migracija adekvatnijim metodama.
- S obzirom na dobivene rezultate, kako bi se osigurao opstanak zavičajne *S. labrax* potrebno je provesti restauraciju staništa u vidu uklanjanja ili prilagodbe pregrada i brana s ciljem povećanja migracije vrste, smanjenja reproduktivne izolacije njezinih populacije te povećanja protoka gena. Osim toga, potrebno je ukloniti i druge prijetnje, kao što su antropogeno uvjetovano onečišćenje njezinih staništa, kao i negativan utjecaj stranih i invazivnih vrsta, među kojima su i *S. trutta* te *O. mykiss*.

## 8. LITERATURA

- Allendorf F. W., Leary R. B., Spruell P., Wenberg J. K. (2001): The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 613–622.
- Apostolidis A., Karakousis Y., Triantaphyllidis C. (1996a): Genetic and phylogenetic relationships among *Salmo trutta* L. (brown trout) populations from Greece and other European countries. *Heredity* 76: 551–560.
- Apostolidis A., Karakousis Y., Triantaphyllidis C. (1996b): Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Salmo trutta* L (brown trout) populations as revealed by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA segments. *Heredity* 77: 608–618.
- Apostolidis A., Triantaphyllidis C., Kouvatsi A., Economidis P. (1997): Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography among *Salmo trutta* L. (Greek brown trout) populations. *Molecular Ecology* 6: 531–542.
- Arbogast B., Kenagy G. J. (2001): Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28: 819–825.
- Avice, J. C. (1998): The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371–379.
- Bermingham E., Moritz C. (1998): Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367–369.
- Berntchez L. (2001): The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55: 351–379.
- Bernatchez L., Guyomard R., Bonhomme F. (1992): DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* 1: 161–173.
- Beerli P. (2009): How to use Migrate or why are Markov Chain Monte Carlo programs difficult to use? *Population Genetics for Animal Conservation, Conservation Biology* (volume 17), Cambridge University Press, Cambridge.

- Blanc J. M. (2003): Paternal variation in juvenile survival and growth of the triploid hybrid between female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and male brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture Research* 34: 205–210.
- Blanc J. M., Maunas P. (2005): Farming evaluation of the brownbow triploid hybrid (*Oncorhynchus mykiss Salmo trutta*). *Aquaculture International*: 271–281.
- Buj I., Marčić Z., Čaleta M, Šanda R., Geiger M. F., Freyhof J., Machordom A., Vukić J. (2017a): Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes). *PLoS ONE* 12: e0187366.
- Buj I., Marčić Z., Čaleta M., Duplić A., Raguž L. (2017b): Očuvanje prirodne baštine NP Plitvička jezera. Program istraživanja, obnove i zaštite autohtone potočne pastrve. Hrvatsko ihtiološko društvo, Zagreb.
- Buj I., Raguž L., Marčić Z., Čaleta M., Duplić A., Zanella D., Mustafić P., Ivić L., Horvatić S., Karlović R. (2020): Plitvice Lakes National park harbors ancient, yet endangered diversity of trout (genus *Salmo*). *Journal of Applied Ichthyology* 37: 20–37.
- 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: e99833.
- Busby P. J., Wainwright T. C., Bryant G. J., Lierheimer L. J., Waples R. S. (1996): Status review of west coast steelhead from Washington, Idaho, Oregon, and California. NOAA Tech. Memo. NMFS–NWFSC–27. Northwest Fish. Sci. Cent., Seattle, WA.
- Candiotto A., Bo T., Fenoglio S. (2011): Biological and ecological data on an established rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) population in an Italian stream. *Fundamental and Applied Limnology* 179: 67–76.
- Clement M., Posada D., Crandall K. (2000): TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Crawford S. S., Muir A. M. (2008): Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870–2007. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18: 313–344.

- Crête–Lafrenière A., Weir L. K., Bernatchez L. (2012): Framing the Salmonidae family phylogenetic portrait: a more complete picture from increased taxon sampling. PLoS ONE 7: e46662.
- Crossman E. J. (1991): Introduced freshwater fishes: a review of the North American perspective with emphasis on Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 48: 46–57.
- Crowl T. A., Townsend C. R., McIntosh A. R. (1992): The impact of introduced brown and rainbow trout on native fish: the case of Australasia. Reviews in Fish Biology and Fisheries 2: 217–241.
- Dedual M., Collier K. J. (1995): Aspects of juvenile Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diet in relation to food supply during summer in the lower Tongariro River, New Zealand. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 29: 381–391.
- Deiner K., Garza J., Coey R., Girman D. (2007): Population structure and genetic diversity of trout (*Oncorhynchus mykiss*) above and below natural and man–made barriers in the Russian River, California. Conservation Genetics 8: 437–454.
- Dudu A., Georgescu S., Popa O., Dinischiotu A., Costache M. (2011): Mitochondrial 16S and 12S rRNA sequence analysis in four salmonid species from Romania. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 57: 233–246.
- Elliott J. M. (1994): Quantitative Ecology and the Brown Trout. Oxford: Oxford University Press. Xi + 286 pp.
- Elliott, J. M., Hurley, M. A. (2000): Daily energy intake and growth of piscivorous brown trout, *Salmo trutta*. Freshwater Biology 44: 237–245.
- Emerson B., Hewitt G. (2005): Phylogeography. Current Biology 15: 367–371.
- Fausch K. (2007): Introduction, establishment and effects of non–native salmonids: considering the risk of rainbow trout invasion in the United Kingdom\*. Journal of Fish Biology 71: 1–32.
- Fausch K. D. (2008): A paradox of trout invasions in North America. Biological Invasions 10: 685–701.

- Freyhof J. (2011a): *Salmo trutta*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T19861A9050312.  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T19861A9050312.en>. (pristupljeno 02.07.2022.)
- Freyhof J. (2011b): *Salmo labrax*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T135658A4172650.  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T135658A4172650.en>. (pristupljeno 04.07.2022.)
- Frost W. E., Brown M. E. (1967): *The Trout*. London: Collins. 316 pp.
- García–Marín J. L., Jorde P. E., Ryman N., Utter F., Pla C. (1991): Management implications of genetic differentiation between native and hatchery populations of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Aquaculture* 95: 235–249.
- Hagenblad J., Hülskötter J., Acharya K., Brunet J., Chabrierie O., Cousins S., Dar P., Diekmann M., De Frenne P., Hermy M., Jamoneau A., Kolb A., Lemke I., Plue J., Reshi Z., Graae B. (2015): Low genetic diversity despite multiple introductions of the invasive plant species *Impatiens glandulifera* in Europe. *BMC Genetics* 16: 103.
- 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.
- Halverson M. A. (2008): Stocking Trends: A Quantitative Review of Governmental Fish Stocking in the United States, 1931 to 2004. *Fisheries* 33: 69–75.
- Hansen M. M., Mensberg K.–L. D., Rasmussen G., Simonsen V. (1997): Genetic variation within and among Danish brown trout (*Salmo trutta* L.) hatchery strains, assessed by PCR–RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Aquaculture* 153: 15–29.
- HAOP (2017): Planovi upravljanja vrstama. <http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/planovi-upravljanja-i-mjere-ocuvanja-6> (pristupljeno 02.07.2022.)
- Harrison R. (1989): Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution* 4: 6–11.
- Hashemzadeh Segherloo I., Freyhof J., Berrebi P., Ferchaud A., Geiger M., Laroche J., Levin B., Normandeau E., Bernatchez L. (2021): A genomic perspective on an old question:



- Salmo* trouts or *Salmo trutta* (Teleostei: Salmonidae)?. Molecular Phylogenetics and Evolution: 107204.
- Henriksen A., Lien L. Rosseland B. O., Traaen T. S., Sevaldrud I. S. (1989): Lake acidification in Norway: Present and predicted fish status. *Ambio* 18: 314–321.
- Hesthagen T., Sevaldrud I. H., Berger H. M. (1999): Assessment of damage to fish populations in Norwegian lakes due to acidification. *Ambio* 28: 112–117.
- Hewitt, G.M. (2001): Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537–549.
- Jonsson N., Jonsson B., Hansen L. P., Aass P. (1993): Coastal movement and growth of domesticated Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) in Norway. *Ecology of Freshwater Fish* 2: 152–159.
- JUNPPJ (2019): Plan upravljanja Nacionalnim parkom Plitvička jezera 2019. – 2028.. Javna ustanova Nacionalni park Plitvička jezera, Plitvička Jezera, 2019.
- Kalayci G., Ozturk R. C., Capkin E., Altinok I. (2018): Genetic and molecular evidence that brown trout *Salmo trutta* belonging to the Danubian lineage are a single biological species. *Journal of Fish Biology* 93: 792–804.
- Katz J. V. E., Moyle P. B., Quiñones R. M., Israel J., Purdy S. (2012): Impending extinction of salmon, steelhead, and trout (Salmonidae) in California. *Environmental Biology of Fishes* 96: 1169–1186.
- Kendall N., McMillan J., Sloat M., Buehrens T., Quinn T., Pess G., Kuzishchin K., McClure M., Zabel R. (2015): Anadromy and residency in steelhead and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a review of the processes and patterns. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72: 319–342.
- Klemetsen A., Amundsen P.A., Dempson J. B., Jonsson B., Jonsson N., O’Connell M. F., Mortensen E. (2003): Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* 2003: 12: 1–59.
- Koljonen M.-L., Kallio-Nyberg, I. (1991): The Finnish trout (*Salmo trutta*) stock register. *Finnish Fisheries Research* 12: 83–90.

- Kottelat M., Freyhof J. (2007): Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin.
- Lațiu C., Cocan D., Uiu P., Ihuț A., Nicula S., Constantinescu R., Mireșan V. (2020): The Black Sea Trout, *Salmo labrax* Pallas, 1814 (Pisces: Salmonidae) in Romanian Waters. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj–Napoca. Animal Science and Biotechnologies, 77: 9.
- Librado P., Rozas J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451–1452.
- Lipscomb D. (1998): Basics of Cladistic Analysis. George Washington University, Washington D.C.
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S., Poorter M. D. (2004): 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: a Selection from the Global Invasive Species Database. Auckland: Invasive Species Specialist Group, World Conservation Union.
- Makhrov A. A., Artamonova V. S., Murza I. G., Pashkov A.N., Ponomareva M.V., Reshetnikov S. I., Christoforov O. L. (2018): Ecological Forms of Black Sea Brown Trout (*Salmo trutta labrax*) in the Mzymta River as Manifestation of Ontogenetic Plasticity. Russian Journal of Developmental Biology 49: 117–127.
- Mangel M. (1994): Climate change and salmonid life history variation. Deep–Sea Research II: 75–106.
- Martínez P., Arias J., Castro J., Sánchez L. (1993): Differential stocking incidence in brown trout (*Salmo trutta*) populations from northwestern Spain. Aquaculture 114: 203–216.
- Meaški H., Marcuš M., Ptiček Širočić A. (2016): Hidrogeološke značajke vodotoka Plitvica na području Plitvičkih jezera, Hrvatska. Inženjerstvo okoliša 3: 21–32.
- McCusker M. R., Parkinson E., Taylor E. B. (2000): Mitochondrial DNA variation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across its native range: testing biogeographical hypotheses and their relevance to conservation. Molecular Ecology 9: 2089–2108.
- McPhee M., Utter F., Stanford J., Kuzishchin K., Savvaitova K., Pavlov D., Allendorf F. (2007): Population structure and partial anadromy in *Oncorhynchus mykiss* from Kamchatka: relevance for conservation strategies around the Pacific Rim. Ecology of Freshwater Fish 16: 539–547.

- Meraner A., Gratton P., Baraldi F., Gandolfi A. (2012): Nothing but a trace left? Autochthony and conservation status of Northern Adriatic *Salmo trutta* inferred from PCR multiplexing, mtDNA control region sequencing and microsatellite analysis. *Hydrobiologia* 702: 201–213.
- Mrakovčić M., Brigić A., Buj I., Čaleta M., Mustafić P., Zanella D. (2006): Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- Muharrem A., Zengin M., Tabak İ., Nilgün A. R., Alkan A. (2011): Migration, Characteristics of the Black Sea Trout (*Salmo trutta labrax*, Pallas, 1814) in the Eastern Black Sea Coasts and Streams. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11: 623–630.
- Nacionalni park Plitvička jezera (2022): Milka Trnina. <https://np-plitvicka-jezera.hr/milka-trnina/> (pristupljeno 18.08.22.)
- Nakhleh L., Guohua J., Fengmei Z., Mellor–Crummey J. (2005): Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony. *IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB'05)*.
- Naik V., Pusadkar P., Waghmare S., Raghavendra K. P., Kranthi S., Kumbhare S., Nagrare V., Kumar R., Prabhulinga T., Gokte–Narkhedkar N., Waghmare V. (2020): Evidence for population expansion of Cotton pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) in India. *Scientific Reports* 10: 4740.
- Nelson, J. S. (2006): *Fishes of the World*. 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Ninua L., Tarkhnishvili D., Gvazava E. (2018): Phylogeography and taxonomic status of trout and salmon from the Ponto–Caspian drainages, with inferences on European Brown Trout evolution and taxonomy. *Ecology and Evolution* 8: 2645–2658.
- Nystrom P., Svensson O., Lardner B., Bronmark C., Graneli W. (2001): The influence of multiple introduced predators on a littoral pond community. *Ecology* 82: 1023–1039.
- Ojanguren A., Reyes–Gavilán F., Braña F. (2001): Thermal sensitivity of growth, food intake and activity of juvenile brown trout. *Journal of Thermal Biology* 26: 165–170.
- Olden J. D. (2006): Biotic homogenization: a new research agenda for conservation biogeography. *Journal of Biogeography* 33: 2027–2039.

- Pakkasmaa S., Piironen J. (2001): Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 231–239.
- Pavlica M. (2022): Mrežni udžbenik iz genetike. Prirodoslovno–matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, elektronička izdanja, Zagreb.
- Perea S., Böhme M., Zupančič P., Freyhof J., Šanda R., Özuluğ 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.
- Posada D., Crandall K. A. (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 37–45.
- Rambaut A. (2018): FigTree v1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Ryman N., Ståhl G. (1980): Genetic changes in hatchery stocks of brown trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37: 82–87.
- Ryman N., Ståhl G. (1981): Genetic perspectives of the identification and conservation of Scandinavian stocks of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 1562–1575.
- Savini D., Occhipinti–Ambrogi A., Marchini A., Tricarico E., Gherardi F., Olenin S., Gollasch S. (2010): The top 27 animal alien species introduced into Europe for aquaculture and related activities. *Journal of Applied Ichthyology* 26: 1–7.
- Schenekar T., Lerceteau–Köhler E., Weiss S. (2014): Fine–scale phylogeographic contact zone in Austrian brown trout *Salmo trutta* reveals multiple waves of post–glacial colonization and a pre–dominance of natural versus anthropogenic admixture. *Conservation Genetics* 15: 561–572.
- Simon K. S., Townsend C. R. (2003): Impacts of freshwater invaders at different levels of ecological organization, with emphasis on salmonids and ecosystem consequences. *Freshwater Biology* 48: 982–994.
- Sloat M. R., Fraser D. J., Dunham J. B., Falke J. A., Jordan C. E., McMillan J. R., Ohms H. A. (2014): Ecological and evolutionary patterns of freshwater maturation in Pacific and Atlantic salmonines. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 24: 689–707.

- Sooley D. R., Luiker E. A., Barnes M. A. (1998): Standard Methods Guide for Freshwater Fish and Fish Habitat Surveys in Newfoundland and Labrador: Rivers & Streams. Sterling Press St. John's, NL.
- Stanković D., Crivelli A., Snoj A. (2015): Rainbow Trout in Europe: Introduction, Naturalization, and Impacts. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 23: 39–71.
- Stearley R. F., Smith G. R. (1993): Phylogeny of the Pacific Trouts and Salmon (Oncorhynchus) and Genera of the Family Salmonidae. *Transactions of the American Fisheries Society* 122: 1–33.
- Suchard M., Lemey P., Baele G., Ayres D., Drummond A., Rambaut A. (2018): Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 4.
- Swofford, D. L. (2003): PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taggart J. B., Ferguson A. (1986): Electrophoretic evaluation of a supplemental stocking programmes for brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture and Fisheries Management* 17: 155–162.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021): MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027.
- Tsai C., Kubota K., Pham H., Yeh W. (2021): Ancestral Haplotype Retention and Population Expansion Determine the Complicated Population Genetic Structure of the Hilly Lineage of *Neolucanus swinhoei* Complex (Coleoptera, Lucanidae) on the Subtropical Taiwan Island. *Insects* 12: 227.
- Turan D., Doğan E., Kaya C., Kanyılmaz M. (2014): *Salmo kottelati*, a new species of trout from Alakır Stream, draining to the Mediterranean in southern Anatolia, Turkey (Teleostei, Salmonidae). *ZooKeys* 462: 135–151.
- Valić D., Mesarić M., Teskeredžić E. (2008): Farming of endangered and indigenous freshwater fish. *Stočarstvo* 62: 75–77.
- Valiquette E., Perrier C., Thibault I., Bernatchez L. (2014): Loss of genetic integrity in wild trout populations following stocking: Insight from an exhaustive study of 72 lakes from Quebec, Canada. *Evolutionary Applications* 7: 625–644.

- Vredenberg V. (2004): Reversing introduced species effects: experimental removal of introduced fish leads to rapid recovery of a declining frog. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 7646–7650.
- Weigel D. E., Peterson J. T., Spruell P. (2003): Introgressive hybridization between native cutthroat trout and introduced rainbow trout. *Ecological Applications* 13: 38–50.
- Whiteley A. R., Penaluna B. E., Taylor E. B., Weiss S., Abadia–Cardoso A., Gomez–Uchida D., Koizumi I., Trotter P. (2019): Trout and Char: Taxonomy, Systematics, and Phylogeography. U: Kershner J. L., Williams J. E., Gresswell R. E., Lobón–Cerviá J. (ur.) *Trout and Char of the World*. American Fisheries Society, str. 95–140.
- Wikimedia Commons (2022): <https://commons.wikimedia.org/> (pristupljeno 11.07.2022.)
- Yoshiyama R. M., Moyle P. B. (2010): Historical review of Eel River anadromous salmonids, with emphasis on chinook salmon, coho salmon and steelhead. Davis, CA: California Trout.
- Zhang D. X., Hewitt G. M. (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 247–251.
- Zhang L., Hua Y., Wei S. (2021): High Genetic Diversity of an Invasive Alien Species: Comparison between Fur–Farmed and Feral American Mink (*Neovison vison*) in China. *Animals* 11: 472.

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. travnja 1995. godine u Zagrebu. Ondje sam započela svoje obrazovanje 2002. godine u Osnovnoj školi Silvija Strahimira Kranjčevića. Već tada sam razvila zanimanje za znanost, ali i glazbu, te sam 2005. upisala Osnovnu glazbenu školu Pavla Markovca gdje sam do 2009. godine učila svirati violinu. S druge strane, zbog interesa za prirodoslovne znanosti, nakon završetka osnovne škole 2010. godine upisala sam XV. gimnaziju. Ondje sam razvila posebni interes za biologiju, ali i kemiju, te sam 2014. godine, nakon završetka srednjoškolskog obrazovanja, upisala integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Ipak, zbog velike ljubavi prema životinjama te želje za radom u području zaštite prirode, 2017. godine odlučila sam upisati preddiplomski sveučilišni studij znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Ondje sam nastavila razvijati svoj interes za životinje, konkretnije kralješnjake, kao i zaštitu okoliša i prirode, ali i druga područja biologije, kao što su genetika, evolucija te molekularna biologija. Moje zanimanje za široki spektar područja odrazilo se i na akademskom uspjehu te sam od 2018. do 2021. bila nagrađivana stipendijama za izvrsnost. No, svoje interese sam razvijala i izvan fakultetskog obrazovanja te sam od 2018. do 2020. godine volontirala u organizaciji Greenpeace, a od 2019. do 2020. u udruzi BIOM. Nadalje, za vrijeme preddiplomskog studija, u akademskog godini 2018./2019. odradila sam laboratorijsku stručnu praksu u Laboratoriju za ekologiju životinja i biogeografiju na Zoologijskom zavodu, radeći na determinaciji vodenih kukaca. Iduće akademske godine, na zadnjoj godini preddiplomskog studija (2019./2020.) posvetila sam se i izvannastavnim aktivnostima te predstavljala Prirodoslovno-matematički fakultet na Smotri Sveučilišta. Također, postala sam aktivni član udruge BIUS i sudjelovala na više istraživačkih i istraživačko-edukacijskih projekata, kao što su „Žumberak 2020.“ i „Rasprostranjenost puha orašara (*Muscardinus avellanarius*) u Parku prirode Medvednica“. Preddiplomski studij završila sam 2020. godine s temom „Ugroženi šišmiši u Republici Hrvatskoj i njihova zaštita“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Buj. Iste godine upisala sam diplomski sveučilišni studij znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nastavila sam s radom u udruzi BIUS te kao članica ponovno sudjelovala na raznim istraživačkim i istraživačko-edukacijskim projektima, kao što su „Dabar i voda 2021“ i „Mala škola mamalogije u Gorskom kotaru 2021.“. Također, sudjelovala sam na znanstveno-popularnoj manifestaciji „Noć Biologije 2021.“ u pripremi predavanja i radionica. Osim toga, 2021. godine sam kao voditeljica sekcije za održivi razvoj u udruzi BIUS sudjelovala u provođenju edukacija na projektu Zeleni eMJESec u suradnji s

udrugom eSTUDENT, a 2022. provodila istraživanje na istraživačko-edukacijskom projektu „Histrion 2022“. Osim sudjelovanja u projektima udruge, 2021. godine sam osmislila, organizirala te vodila projekt „RE: Regionalno Izumrli“ kojim sam kroz edukativnu izložbu na kojoj su bile prikazane recentno izumrle životinjske vrste Hrvatske htjela naglasiti važnost bioraznolikosti, ali i njezinu ugroženost antropogenim utjecajima. Nadalje, stručnu praksu odradila sam 2020./2021. akademske godine u tvrtki Geonatura gdje sam radila na monitoringu velikih zvijeri i invazivnih sisavaca te determinaciji šišmiša na temelju eholokacije. Rektorovu nagradu za timski znanstveni rad „Poznavanje i primjena praksi biosigurnosti u terenskim istraživanjima“ dobila sam 2021. godine te sam ga iste godine predstavila na 4. Hrvatskom simpoziju o invazivnim vrstama s međunarodnim sudjelovanjem. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu sam 2021./2022. akademske godine radila kao demonstratorica na kolegiju Kralješnjaci te u laboratoriju na provođenju genskih analiza uzoraka. Osim toga, sudjelovala sam na stručnim projektima „Uklanjanje invazivnih ribljih vrsta u Nacionalnom parku Plitvička jezera“, „Obnova populacije potočne pastrve“ te „Usluga razvoja programa praćenja za vrste i stanišne tipove od interesa za EU“.