

Genska struktura i raznolikost potočne pastrve, *Salmo trutta* Linnaeus, 1758 šireg područja Plitvičkih jezera

Raguž, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:099508>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Raguž

**Genska struktura i raznolikost potočne pastrve *Salmo trutta* Linnaeus, 1758
šireg područja Plitvičkih jezera**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za zoologiju kralješnjaka na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Buj. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre edukacije biologije i kemije.

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj divnoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Buj na iskazanoj dobroti, nesebičnom prenošenju znanja te strpljivom vodstvu tijekom izrade i pisanja ovog rada. Hvala dr. sc. Zoranu Marčiću na susretljivosti i pomoći oko izrade karte i grafičkog uređenja stabala. Hvala Svenu i Luciji na ugodnom društvu u našem malom labosu.

Posebno hvala najdražim kolegama Hrvoju, Danieli i Katarini, bez kojih studentski dani ne bi bili toliko zabavni, padovi brzo preboljeni i uspjesi dostojno proslavljeni. Veliko hvala mojoj obitelji što me kroz sve godine studija podržavala svojom ljubavlju i ustrajnim molitvama. Hvala svim dragim prijateljima što čine moj život ovako lijepim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genska struktura i raznolikost potočne pastrve *Salmo trutta* Linnaeus, 1758 šireg područja Plitvičkih jezera

Lucija Raguž

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Jedna od vrsta koja nastanjuje hlade i brze vodotoke rječica i potoka koji opskrbljuju vodom Plitvička jezera je potočna pastrva *Salmo trutta* Linnaeus, 1758. Osnovna taksonomija roda *Salmo* na europskoj razini još uvijek nije uređena, a unutar Hrvatske se ne zna koliki broj vrsta roda *Salmo* obitava u vodotocima, niti koliki je udio alohtonih vrsta/linija te čistih i mješovitih populacija. Cilj provedenog istraživanja bio je utvrditi: točnu taksonomsku pripadnost i filogenetski položaj potočnih pastrva šireg područja Plitvičkih jezera, gensku strukturu i raznolikost pojedinih populacija potočne pastrve na širem području Plitvičkih jezera te gensku različitost i protok gena između pojedinih populacija. Kako bi se utvrdili srodstveni odnosi među pastrvama šireg područja Plitvičkih jezera i njihov položaj unutar filogenetskog stabla roda *Salmo*, provedena je filogenetska rekonstrukcija temeljena je na sekvencama gena za citokrom *b* (*cyt b*) korištenjem sljedećih metoda: metoda najveće parsimonije (MP), metoda najveće vjerojatnosti (ML), Bayesova metode (BAY) i metoda susjednog povezivanja (MJ). Dobivena filogenetska stabla i mreža potvrdili su da na širem području Plitvičkih jezera obitavaju dvije evolucijski nezavisne linije potočne pastrve, obje vjerojatno autohtone. Pronađene su čiste populacije obje linije, ali i više mješovitih populacija, unutar kojih svaka svojta zadržava svoju gensku osebnost. Utvrđena je niska intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost pronađenih svojti, a statistički testovi interspecijske genske različitosti ukazali su na gensku izoliranost populacija i onemogućen protok gena. Procijenjene su male efektivne veličine populacija i slaba povezanost populacija što je posljedica fragmentacije i degradacije staništa.

(45 stranica, 13 slika, 11 tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornik: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: potočna pastrva, Plitvička jezera, filogenija, genska raznolikost

Voditelj: doc. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelj: doc. dr. sc. Ivana Buj

Rad prihvaćen: 1. ožujka 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Genetic structure and diversity of the brown trout *Salmo trutta* Linnaeus, 1758 from the wider area of Plitvice Lakes

Lucija Raguž

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

One of the species that inhabits cold and fast watercourses and streams that supply Plitvice Lakes is brown trout *Salmo trutta* Linnaeus, 1758. Basic taxonomy of genus *Salmo* in Europe is not settled, also it's still not clear neither how many species of genus *Salmo* inhabits the watercourses of Croatia nor the proportion of allochthonous species/lineages, pure and admixed populations. The aim of this study was to determine: exact taxonomic status and phylogenetic position of the brown trout from the wider area of Plitvice Lakes, genetic structure and diversity of the brown trout populations, genetic differentiation and gene flow between populations. To determine relations between trouts from wider area of Plitvice Lakes and their position in phylogenetic tree of *Salmo* genus, phylogenetic reconstruction based on cytochrome b (*cyt b*) sequences was conducted using following methods: maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML), Bayesian method (BAY) and median joining (MJ). Phylogenetic trees and network revealed that the wider area of Plitvice Lakes is inhabited by two evolutionary independent lineages of the brown trout, both of them probably autochthonous. Pure populations of both lineages were found and several admixed populations in which both lineages retain their genetic uniqueness. Low intraspecific and intrapopulation diversity of both lineages are determined, furthermore statistic tests of genetic differentiation indicate isolation of populations and restricted gene flow. Small effective sizes of populations and weak interconnections between populations are estimated, and are most likely consequence of fragmentation and habitat degradation.

(45 pages, 13 figures, 11 tables, 45 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: brown trout, Plitvice Lakes, phylogeny, genetic diversity

Supervisor: doc. dr. sc. Ivana Buj

Reviewers: doc. dr. sc. Ivana Buj

Thesis accepted: 1 March 2018

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Plitvička jezera.....	1
1.2. Slatkovodna ihtiofauna Hrvatske.....	2
1.3. Potočna pastrva, <i>Salmo trutta</i> Linnaeus, 1758.....	3
1.3.1. Razred Actinopterygii (zrakoperke).....	3
1.3.2. Red Salmoniformes (lososi).....	3
1.3.3. Porodica Salmonidae (pastrvke).....	4
1.3.4. Rod <i>Salmo</i>	5
1.3.5. Opće značajke vrste <i>Salmo trutta</i> (Linnaeus, 1758).....	6
1.4. Primjena suvremenih metoda filogeografije, molekularne filogenije i populacijske genetikе u istraživanjima ribljih populacija.....	7
1.4.1. Osnovni principi filogeografije, molekularne filogenije i populacijske genetikе.....	7
1.4.2. Molekularni genski markeri i filogenetska rekonstrukcija.....	7
1.5. Cilj istraživanja.....	9
2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA.....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Uzorkovanje.....	16
3.2. Laboratorijski postupci (izolacija DNA, umnažanje lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje).....	17
3.3. Filogenetska rekonstrukcija.....	18
3.4. Intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost te interspecijska različitost.....	20
3.5. Efektivna veličina i povezanost populacija.....	21
4. REZULTATI.....	22
4.1. Prisutnost potočne pastrve i ostalih vrsta na obrađenim lokalitetima.....	22
4.2. Filogenetski položaj plitvičkih pastrva.....	22
4.3. Rasprostranjenost i razlikovanje svojti.....	27
4.3.1. Rasprostranjenost i zastupljenost pojedinih haplotipova.....	27
4.3.2. Morfološko razlikovanje svojti.....	29

4.4. Intraspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost te interspecijska genska različnost svojti.....	30
4.5. Efektivna veličina i povezanost populacija utvrđenih svojti	32
5. RASPRAVA	36
6. ZAKLJUČAK.....	40
7. LITERATURA	41
8. ŽIVOTOPIS.....	45

1. UVOD

1.1. Plitvička jezera

Poseban zemljopisni položaj Plitvičkih jezera te složena geološka prošlost doprinijeli su njihovoj bogatoj biološkoj raznolikosti. Ona predstavljaju šumovit planinski kraj u kojem se nalazi 16 jezera koja se opskrbljuju vodom iz brojnih rječica i potoka, a međusobno su povezana slapovima i kaskadama. Nalaze se na istoku Like, između Male Kapele i Ličke Plješivice izgrađenih od karbonatnih stijena mezozojske starosti (Meaški i sur. 2016).

Od 16 Plitvičkih jezera koja se pružaju u nizu, 12 ih pripada uzvodnim Gornjim jezerima, a 4 nizvodnim Donjim jezerima koja su uža jer su usječena u kanjon rijeke Korane. Gornja jezera se sastoje od dolomita manje vodopropusnosti, a Donja jezera od vapnenačkih stijena koje su kompaktnije, ali i vodopropusnije. Osim samih jezera, sustavu Plitvičkih jezera pripada i niz rijeka, potoka i izvora. Najveći tokovi su Crna i Bijela rijeka koje se spajaju u Maticu, ona se ulijeva u najjužnije Prošćansko jezero koje je ujedno i najviše (636 m), a najsjevernije jezero je i najniže, Novakovića brod (503 m). Voda se iz Prošćanskog jezera kaskadno prelijeva preko sedrenih barijera u niz Gornjih jezera: Ciganovac Okrugljak, Batinovac, Veliko jezero, Malo jezero, Vir jezero, Galovac, Milino, Gradinsko, Burgeti i Kozjak. Jezero Kozjak je posljednje u nizu Gornjih jezera te je ujedno najveće (0,83 km²) i najdublje (46 m) jezero Plitvičkih jezera, ono s juga prima malu pritoku, Rječicu. Voda iz jezera Kozjak dalje se prelijeva u niz Donjih jezera: Milanovac, Gavanovac, Kaluđerovac i Novakovića brod (<http://www.geografija.hr/hrvatska/plitvicka-jezera-tamo-gdje-voda-prkosikrsu/>).

Vodotok Plitvica, kojem je najznačajniji pritok, potok Sartuk, prelijeva se niz 78 m visoku liticu formirajući Veliki slap. Vode iz vodotoka Plitvice i jezerskog sustava Plitvičkih jezera spajaju se na mjestu zvanom Sastavci, što je ujedno i izvorišno područje rijeke Korane koja se kod Karlovca ulijeva u Kupu, a pripada rijekama crnomorskog (dunavskog) slijeva (Meaški i sur. 2016).

Unatoč blizini mediteranske klimatske regije, na širem području Plitvičkih jezera prevladava planinska klima zbog utjecaja Velebita, koji klimatski odjeljuje primorje od visoravni Like. Najveća količina kiše pada u proljeće i jesen. Prosječna godišnja temperatura iznosi 7,9 °C, a temperatura vode na izvorima obično je ispod 10 °C, dok u rječicama i jezerima može rasti do 20 °C (Gušić i Marković, 1974).

Ljepotu i značaj Plitvičkih jezera prepoznali su mnogi prirodoslovci pa se već u 19. stoljeću pojavljuju inicijative za njihovom zaštitom, a prva zakonska zaštita datira iz 1928. godine. Nacionalnim parkom Plitvička jezera su proglašena 1949. godine, na površini od 192 km². Godine 1979. NP Plitvička jezera stavljena su na Listu svjetske kulturne i prirodne baštine UNESCO-a, čime je potvrđena jedinstvenost i svjetsko značenje ovog fenomena. Godine 1997. područje Nacionalnog parka prošireno je te obuhvaća površinu od 296,85 km² (Meaški i sur. 2016).

1.2. Slatkovodna ihtiofauna Hrvatske

Ribe su najbrojnija i najslabije istražena skupina kralješnjaka u svijetu (Maitland i Crivelli 1996), nastanjuju vodene ekosustave koji su pod izrazitim utjecajem čovjeka, stoga se smatra da su ribe i najugroženija skupina kralješnjaka. Raznolikost hrvatske ihtiofaune, s obzirom na bogatstvo vrsta i udio endema, svrstava Hrvatsku u jednu od ihtiološki najraznolikijih zemalja Europe (Ćaleta i sur. 2015). Iako su slatke vode tek maleni postotak ukupne površine svjetskih voda, jedna trećina svih riba primarno pripada slatkovodnim vrstama (Mrakovčić i sur. 2006).

Razlozi izuzetne raznolikosti naše slatkovodne ihtiofaune nalaze se u postojanju dva riječna slijeva, jadranskog i crnomorskog (dunavskog) na relativno malom području koji su međusobno odijeljeni Dinaridima (Mrakovčić i sur. 1995), ali i vrlo bogatoj i složenoj geološkoj prošlosti (Buj i sur. 2017). Prema ukupnom broju slatkovodnih vrsta riba Hrvatska zauzima drugo mjesto u Europi, procjenjuje se da u našim slatkim vodama obitava 150 vrsta i podvrsta riba, od kojih 21 vrsta živi i u slatkoj i u morskoj vodi. Crnomorski (dunavski) slijev Hrvatske nastanjuje 87 ribljih svojti od čega je 67 autohtonih vrsta. Preostalih 20 vrsta su strane, alohtone vrste, koje su unesene ili su se samostalno proširile u hrvatska slatkovodna staništa. U rijekama jadranskog slijeva obitava čak 80 vrsta riba, 10 stranih i 13 unesenih iz crnomorskog (dunavskog) slijeva (Ćaleta i sur. 2015).

1.3. Potočna pastrva, *Salmo trutta* Linnaeus, 1758

1.3.1. Razred Actinopterygii (zrakoperke)

Zrakoperke (grč. *actino* = zraka, *ptero* = krilo ili peraja), se zajedno s mesoperkama (Sarcopterygii) smatraju ribama u užem smislu. U starijoj literaturi klasificirale su se kao jedan od podrazreda unutar koštunjača (Osteichthyes), no kasnije su zrakoperke i mesoperke podignute na višu taksonomsku razinu te se danas smatraju zasebnim razredima (Nelson 2006). Do sada je u svijetu opisano 27 000 vrsta zrakoperki, što je samo djelić vrsta koje su postojale kroz povijest (Helfman i sur. 2009). Prvi cjeloviti fosilizirani kosturi izumrlih zrakoperki datiraju iz razdoblja srednjeg i kasnog devona, geološkog perioda koji je završio prije 359 milijuna godina, u kojem su zavladaile vodenim staništima te potisnule do tada brojnije mesoperke (Pough i sur. 2012).

Zrakoperke su izuzetno važna komponenta cjelokupne bioraznolikosti Zemlje. Dijelimo ih na štitonoše (Chondrostei) koje predstavljaju neke od najranijih oblika koštunjača i broje oko 27 vrsta te moderne zrakoperke, novozrakoperke (Neopterygii), unutar kojih prave koštunjače (Teleostei) obuhvaćaju većinu današnjih koštunjača, raznolikih veličina i oblika (Nelson 2006). Prave koštunjače danas, zahvaljujući intenzivnoj evoluciji i adaptivnoj radijaciji, zauzimaju gotovo svaku slobodnu ekološku nišu u vodenim staništima, dok neke vrste povremeno naseljavaju i kopnena staništa s dnevnom promjenom vodene razine (Pough i sur. 2012).

1.3.2. Red Salmoniformes (lososi)

Prema starijim autorima (npr. Johnson i Patterson 1996), red Salmoniformes (lat. *salmo* = losos) spada u grupu primitivnih riba (Euteleostei) i sastoji se od dva podreda Osmeroidei i Salmonoidei. Vrste podreda Osmeroidei razvrstane su u šest porodica, a nastanjuju sjeverne dijelove Atlantskog i Tihog oceana. Žive u priobalnim zonama, odakle za vrijeme mrijesta odlaze u rijeke. Prema Nelsonu (2006) red Salmoniformes, ograničen je samo na podred Salmonoidei, odnosno porodicu Salmonidae.

1.3.3. Porodica Salmonidae (pastrvke)

Unutar porodice Salmonidae nalazimo tri potporodice: Coregoninae (ozimice), Thymallinae (lipljene) i Salmoninae (lososi i pastrve), unutar kojih postoji 11 redova i 66 dosad opisane vrste (Nelson 2006). Prema njihovoj morfologiji, Coregoninae i Thymallinae su stare skupine, dok su Salmoninae noviji oblici. Osnovna obilježja zajednička vrstama ove porodice su: sitna masna peraja smještena iza leđne peraje; kratka leđna peraja; čitavo tijelo izuzev glave prekriveno sitnim ljuskama; dodatna kost na gornjoj čeljusti; velika usta; šiljasti zubi koji su prošireni na jezik; izražena bočna pruga; velik broj piloričkih nastavaka (između 17 i 210); velik riblji mjehur; te mrijest koji se odvija se u slatkoj vodi (Odak 2004).

Vrste porodice Salmonidae obitavaju u morima i rijekama Europe, sjeverne i zapadne Azije, sjeverne Amerike i Afrike. S obzirom na velik areal i brojnost od ekonomske su i športske važnosti za čovjeka (Nelson 2006). Obitavaju u hladnim, bistrim i nezagađenim potocima, rječicama ili rijekama brzog toka, koje su bogate otopljenim kisikom ili u planinskim jezerima u kojima se temperatura kreće oko 10 °C, a za najtoplijeg vremena ne prelazi 20 °C. To su reofilne vrste riba, vretenastog oblika tijela prilagođenog za život u brzim riječnim tokovima. Izraziti su predatori, nalaze se na vrhu hranidbene piramide hladnovodnih ekosustava (Georgiev 2011), jedu živu hranu, stoga im je želudac širok i mišićav (Ćaleta i sur. 2015).

Salmonidae su slatkovodne ribe, mnoge imaju hranidbene migracije u more, ali anadromne su pa se vraćaju u slatke vode kad su zrele za mrijest. Reprodukcijski potencijal pastrva je relativno nizak, broj jaja prema kilogramu tjelesne mase ženke potočne pastrve kreće se oko 1 500. Sve pastrve mrijeste se u izvorišnim područjima slatkih voda, u razdoblju od listopada do siječnja, izuzev mekousne koja se mrijesti u rano proljeće (Ćaleta i sur. 2015).

Nagon odlaska u more nakon izvaljivanja više je izražen u sjevernim predjelima, stoga Salmonidae arktičkih rijeka migriraju u more, dok su one s južnih predjela ograničene na slatke vode, jezera i rijeke, koje su kolonizirale tijekom perioda širenja polarnog leda i u kojima su kasnije ostale zarobljene podizanjem temperature mora. Razlike u njihovim staništima utjecale su veliku fenotipsku različitost te gensku izolaciju populacija, zbog čega je sistematika ove porodice izuzetno složena (Odak 2004).

Potporodica Salmoninae prema Nelsonu (2006) obuhvaća sedam rodova: *Brachymystax* Günther, 1866, *Hucho* Günther, 1866, *Oncorhynchus* Suckley, 1861, *Parahucho* Vladykov, 1963, *Salmo* Linnaeus, 1758, *Salvelinus* Richardson, 1836 i *Salvethymus* Chereshnev & Skopets, 1990.

1.3.4. Rod *Salmo*

Rod *Salmo* danas, prema Kottleat i Freyhof (2007), broji 29 vrsta, ali točan broj vrsta roda *Salmo* koje nastanjuju hrvatske vodotoke još je nepoznat (Ćaleta i sur. 2015). Prema starijim podacima u Hrvatskoj vjerojatno obitavaju: *Salmo obtusirostris* (Heckel, 1851), *Salmo (trutta) dentex* (Heckel, 1851), *Salmo (trutta) marmoratus* (Cuvier, 1829), endemi te *Salmo (trutta) visovacensis* (Taler, 1950) i *Salmo (trutta) zrmanjaensis* (Karaman, 1938), stenoendemi jadranskoga slijeva.

Taksonomski položaj potočne pastrve (Nelson 2006):

CARSTVO Animalia (životinje)

KOLJENO Chordata (svitkovci)

PODKOLJENO Vertebrata (kralješnjaci)

MEĐUKOLJENO Gnathostomata (čeljustouste)

NADRAZRED Actinopterygii (zrakoperke)

RAZRED Teleostei (prave koštunjače)

NADRED Protacanthopterygii

RED Salmoniformes (lososi)

PORODICA Salmonidae (pastrvke)

POTPORODICA Salmoninae

ROD *Salmo*

VRSTA *Salmo trutta* (potočna pastrva)

1.3.5. Opće značajke vrste *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758)

Potočnu pastrvu kao autohtonu vrstu nalazimo na širokom području Europe, Azije i Sjeverne Amerike. Obuhvaća brojne, geografski udaljene populacije velike fenotipske različitosti (Bernatchez i sur. 1992). Ima vretenasto, izduženo tijelo, odličan je i brz plivač. Na trupu i iznad bočne pruge nalaze se mnogobrojne crne i/ili crvene točkice. Na glavi su izražena velika usta sa zubima raspoređenim u dva reda, koje zadržava cijeloga života. Gornja vilica doseže do zadnjeg oboda oka, na prvom škržnom luku ima od 18 do 24 škržnih šipčica, a broj piloričkih nastavaka varira od 40 do 100.

Spolno sazrijeva u drugoj ili trećoj godini života. Za vrijeme mrijesta koji se odvija između studenog i siječnja, izražen je spolni dimorfizam. Ženke imaju zaobljen trbuh i crven, nabubren spolni otvor. Ikru odlaže na kamenito dno s brzim tokom vode, inkubacijski period traje od 60 do 90 dana, ovisno o temperaturi vode. Kada mlađ dosegne dužinu od 10 cm seli se nizvodno, u mirnije vode u potrazi za hranom. Predator je, hrani se različitim organizmima: ribama, sitnim beskralješnjacima, ikrom drugih riba, ličinkama vodenih kukaca i kukcima koji se nalaze na površini vode (Odak 2004).

Naseljava brze, hladne i kisikom bogate tokove kamenitog i šljunkovitog dna, koji se po longitudinalnoj podjeli riječnih sustava i nazivaju zonom pastrve. Izuzetno je prilagodljiva na različite uvjete staništa, prilagodljivost se odražava i u različitim morfološkim oblicima (Wheeler 1992). Upravo ta karakteristika koja joj omogućuje preživljavanje u promjenjivom okolišu otežava znanstvenicima uređenje taksonomije vrste, jer genski različite populacije mogu izgledom nalikovati jedne drugoj, a genski slične potpuno se razlikovati. Danas još uvijek nije poznato koliko vrsta i linija potočne pastrve postoji što Kottelat i Freyhof (2007) nazivaju „sramotom europske ihtiologije“, s obzirom da je ona bila među prvim istraživanim vrstama na kojima su rađena filogeografska istraživanja na paneuropskoj razini (Bernatchez 2001).

Veliki broj radova na potočnoj pastrvi, starijih morfoloških, ali i novijih temeljenih na metodama molekularne genetike govori o prisutnosti većeg broja linija unutar ove vrste. Bernatchez i sur. (1992) utvrđuju postojanje pet linija: dunavske, atlantske, mediteranske, jadranske i tzv. *marmoratus* linije. Spominjanje tih linija nastavilo se i u novijim radovima (Bernatchez 2001, Snoj i sur. 2002, Jug i sur. 2004, Apostolidis i sur. 2007).

1.4. Primjena suvremenih metoda filogeografije, molekularne filogenije i populacijske genetike u istraživanjima ribljih populacija

1.4.1. Osnovni principi filogeografije, molekularne filogenije i populacijske genetike

Filogeografija je znanstvena disciplina koja proučava principe i procese geografske distribucije genealoških linija (Avisé 1998, Hewitt 2001, Emerson i Hewitt 2005). Analize komparativne filogeografije omogućile su detaljne studije evolucije okoliša, širenja vrsta (i drugih taksonomskih jedinica) u prostoru, specijacije, adaptivne radijacije i izumiranja. Drugim riječima, omogućile su istraživanje poveznica između populacijskih procesa, raznolikosti živog svijeta i biogeografije na nekom prostoru (Bermingham i Moritz, 1998).

Molekularna filogenija, poznata još kao filogenetika ili molekularna sistematika je znanstvena disciplina koja opisuje i rekonstruira obrasce genetskih veza među vrstama i višim sistematskim kategorijama. Filogenija nekog organizma, vrste ili druge taksonomske kategorije jest zapravo njena evolucijska povijest (Lipscomb 1998). Proizašla je iz metodologije koje se počela upotrebljavati 80-ih godina prošlog stoljeća, a omogućila je utvrđivanje varijabilnosti sekvenci DNK (deoksiribonukleinske kiseline) između jedinki, a time i rekonstrukciju genealogije gena (Emerson i Hewitt 2005). Kada se u istraživanjima želi obuhvatiti dalja filogenetska prošlost koriste se sekvence koje sporo evoluiraju, a za bliže događaje potrebni su varijabilniji biljezi (Hewitt 2001).

Populacijska genetika bavi se proučavanjem genetičke strukture populacija odnosno analizom učestalosti gena i genotipova u prirodnim populacijama kao i čimbenicima koji ih određuju (Pavlica 2012). Pokušava odrediti razinu i rasprostranjenost genetskog polimorfizma u prirodnim populacijama, kao i otkriti evolucijske sile (mutacija, migracija, selekcija i drift) koji određuju obrazac genetske raznolikosti primijećen u prirodnim populacijama.

1.4.2. Molekularni genski markeri i filogenetska rekonstrukcija

S obzirom da mitohondrijska DNK (mtDNK) brzo evoluirala kod viših životinja, a prenosi se samo majčinskom linijom bez međumolekulskih rekombinacija ona se najčešće koristi u filogeografskim istraživanjima (Avisé 1998, Emerson i Hewitt 2005). Mitohondrijska DNK izuzetno je vrijedan genski marker u populacijskoj i evolucijskoj biologiji. Razlog tome je što je relativno lako izolirati čiste homologne sekvence, budući da je prisutna sa velikim brojem kopija, do 1000 po stanici. Jednostavna organizacija, majčinsko nasljeđivanje i

odsutnost rekombinacija uz visoki stupanj mutacija, čine mtDNK idealnim markerom za istraživanje strukture populacija (Zhang i Hewitt 1996).

Najčešće korišteni genski markeri u filogenetskim istraživanjima su prema Patwardhan (2014) mitohondrijski geni citokrom *b* (*cyt b*), kontrolna regija (CR), citokrom oksidaza I/II (CO I/II) i 12S rRNK. Citokrom *b* (*cyt b*) smatra se najkorisnijim genskim markerom korištenim za otkrivanje filogenetskih veza među bliskim taksonomskim jedinicama. On ima ulogu u kodiranju proteina važnih u procesu disanja kod staničnog metabolizma, vrlo često se koristi u istraživanjima strukture i porijekla ribljih populacija (Buj i sur. 2014, Buj i sur. 2017, Schenekar i sur. 2014). Danas se u filogenetskim istraživanjima paralelno koristi više genskih markera jer kada se koristi samo jedan često se ne mogu primijetiti pojave poput hibridizacije, horizontalnog prijenosa gena i utjecaja selekcije što dovodi do donošenja krivih zaključaka (Bermingham i Moritz 1998). Stoga, da bi se vjerodostojno rekonstruirala filogenetska povijest neke vrste, potrebno je analizirati niz različitih sekvenci, onih s višom i onih s nižom stopom mutacija (Emerson i Hewitt 2005).

Filogenetska rekonstrukcija temelji se na izradi filogenetskih stabala i filogenetskih mreža od haplotipskih sekvenci korištenjem neke od filogenetskih metoda (metoda najveće parsimonije, metoda najveće vjerojatnosti, Bayesove metode, metoda susjednog povezivanja). Filogenetska stabla su prikladan način prikazivanja evolucijske povijesti nekog organizma jer je u njima moguće ilustrirati odnose između organizama, kao i redoslijed specijacijskih događaja kojima su od ranijih predaka nastali današnji potomci. Preciznosti stabala ovisi o tome koliko taksonomske jedinice s kojima se radi odgovaraju povijesti grananja linija, s tim da nema protoka gena, a preci više nisu prisutni u recentnoj raznolikosti. Ukoliko ti uvjeti nisu zadovoljeni, haplotipske sekvence moguće je posložiti u filogenetsku mrežu (Emerson i Hewitt 2005). Filogenetska mreža se od stabla razlikuje po tome što dopušta poprečne veze između vrsta koje su u direktnom srodstvu te na taj način ne isključuje rekombinaciju, hibridizaciju i lateralni prijenos gena, što su fenomeni koje je u filogenetskim stablima nemoguće prikazati (Nakhleh i sur. 2005, Posada i Crandall 2001).

1.5. Cilj istraživanja

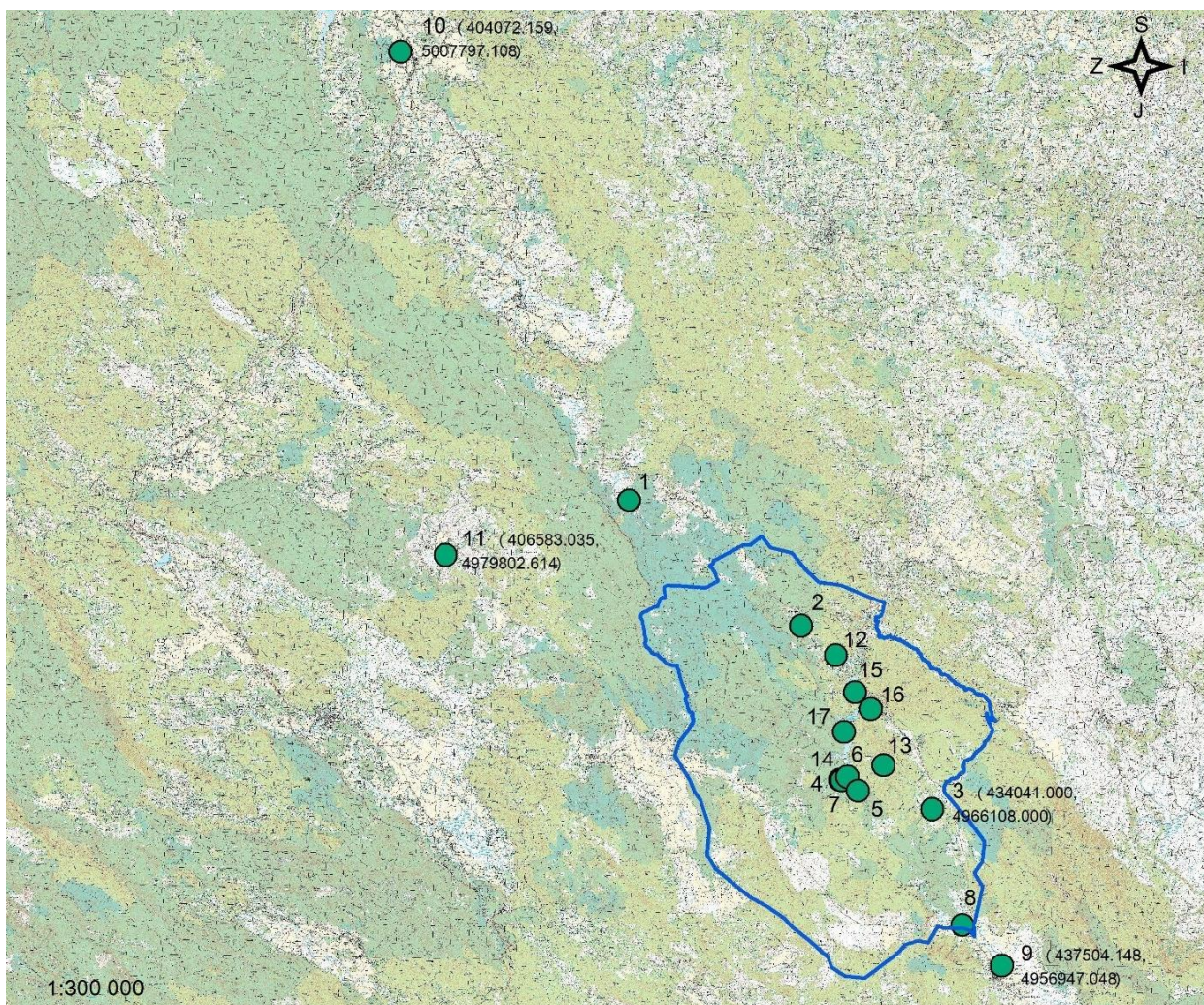
Poznati ihtiolog Stanko Karaman je 1932. godine, uspoređujući potočne pastrve s područja Plitvičkih jezera i okolnih vodotoka, zaključio kako se one razlikuju, prema morfološkim i anatomskim značajkama, od pastrva iz drugih vodotoka. Opisao je novu vrstu, koju je nazvao ličkom pastrvom (*Trutta likana*), a kao tipsko područje (*locus typicus*) naveo je rijeku Ličku Jesenicu. Spominje ju još i 1938., ali kao *Salmo taleri* subsp. *likana*.

Ideja o postojanju zasebne taksonomske jedinice na širem području Plitvičkih jezera je s vremenom pala u zaborav te detaljna i sveobuhvatna filogeografska i taksonomska istraživanja pastrva tog područja nisu provedena; sve do projekta „Očuvanje prirodne baštine NP Plitvička jezera: program istraživanja, obnove i zaštite autohtone potočne pastrve“ koji je pokrenut 2016. godine, u suradnji Hrvatskog ihtiološkog društva i Javne ustanove NP Plitvička jezera, u sklopu kojeg je i izrađen ovaj rad s ciljem utvrđivanja:

1. točne taksonomske pripadnosti i filogenetskog položaja potočnih pastrva šireg područja Plitvičkih jezera
2. genske strukture i raznolikosti pojedinih populacija potočne pastrve šireg područja Plitvičkih jezera
3. genske različitosti i protoka gena između pojedinih populacija šireg područja Plitvičkih jezera.

2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje je obuhvatilo vodotoke na području NP Plitvička jezera, ali i izvan granica Nacionalnog parka, unutar šireg područja Plitvičkih jezera (Slika 1.), kako bi se dobila što potpunija slika o taksonomskom statusu i rasprostranjenosti autohtonih potočnih pastrva. Uzorkovanje potočne pastrve izvršeno je na ukupno 17 lokaliteta, u nastavku slijedi kratak opis abiotičkih i biotičkih značajki staništa na lokalitetima uzorkovanja. Uzorkovanje je vršeno primarno zbog pastrva, ali zabilježene su i druge ulovljene vrste riba.



Slika 1. Karta područja istraživanja s označenom granicom NP Plitvička jezera (plava crta) te postajama uzorkovanja (zelene točke).

Postaja 1: Lička Jesenica

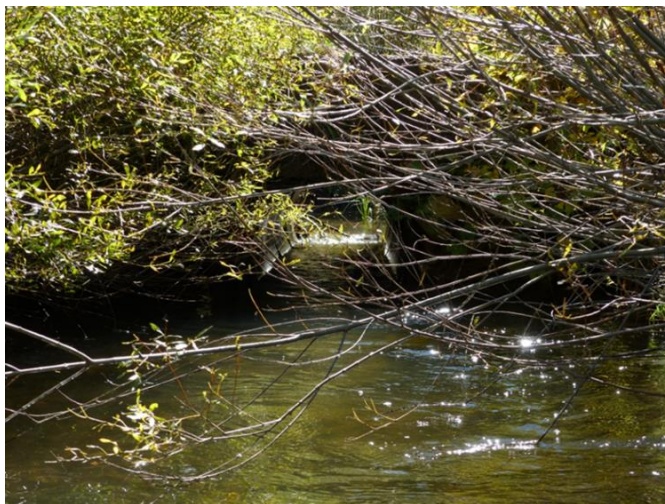
Uzorkovanje je obavljeno kod mjesta Mlin, na tom se lokalitetu nalazi veliko slapište te je rijeka ujezerena iznad umjetnog praga. Vodena vegetacija dobro je razvijena, na lokalitetu su ulovljene samo potočne pastrve različitih veličina i fenotipova.

Postaja 2: Potok Sartuk

Potok Sartuk protječe kroz Sertić poljanu, a okružen je livadom. Potočne pastrve su jedine ribe ulovljene u ovom potoku.

Postaja 3: Čujića Krčevine

Na lokalitetu se nalazi potok koji dosta brzo teče (Slika 2.), s kamenitim dnom različite dubine i gustom okolnom vegetacijom. Također su prisutni potoci i bare po livadi. Uzorkovanje je izvršeno i u potoku i u okolnim barama te su ulovljene potočne pastrve, ali i kalifornijske pastrve te pijori.



Slika 2. Potok na području Čujića Krčevina

Postaja 4: Bijela rijeka

Na Bijeloj rijeci uzorkovanje je izvršeno na dva mjesta, u Plitvičkom Ljeskovcu te kod Stipanova mlina. Bijela rijeka je izvrsno stanište za pastrvu, no vidljivi su antropogeni zahvati na obalama i koritu, koji su doveli do promjena ovog salmonidnog staništa. Ulovljene su potočne, ali i kalifornijske pastrve.

Postaja 5: Crna rijeka

Protječe kroz šumu, različite je dubine, a dno joj je velikim dijelom prekriveno mahovinom. U njoj su ulovljene i potočne i kalifornijske pastrve, s tim da je potočna pastrva prisutna u većem broju.

Postaja 6: Matica

Matica nastaje spajanjem Crne i Bijele rijeke u Plitvičkom Ljeskovcu. U njoj prevladavaju potočne pastrve, ali su ulovljeni i pijori i klenovi.

Postaja 7: Potok Ljeskovac

Potok protječe mjestom Plitvičkim Ljeskovcem. U njemu su također ulovljene potočne, ali i manji broj kalifornijskih pastrva.

Postaja 8: Korenička rijeka

Uzorkovano je u nizvodnom dijelu Koreničke rijeke (Slika 3.) s velikom brzinom protoka. Dubina na mjestu uzorkovanja je oko 1 m, a dno je muljevito-pjeskovito s malo vegetacije. Ulovljene su samo potočne pastrve.



Slika 3. Mjesto uzorkovanja na Koreničkoj rijeci

Postaja 9: Matica korenička

Rijeka koja polako teče kroz dolinu (Slika 4.), na nekim je mjestima široka i preko 3 m. Različita dubina na pojedinim dijelovima, ali uglavnom je prilično plitko, dno je šljunkovito. Slabo je razvijena vodena i obalna vegetacija. Ulovljene su potočne pastrve i pijori.



Slika 4. Matica korenička

Postaja 10: Potok kod Josipdola

Radi se o plitkom potoku koji sporo teče u blizini kuća i razlijeva se po livadi. Dno je kamenito i šljunkovito. U potoku su ulovljeni peševi, pijori, brkice te potočne pastrve.

Postaja 11: Klješčina Žljeba u polju Dabar

Potok Klješčina Žljeba protječe kroz polje Dabar (Slika 5.), najvećim dijelom teče po livadi. Uz potok raste drveće, dok je livada uglavnom prekrivena suhom travom. Ulovljene su potočne pastrve različite morfologije i veličine.



Slika 5. Potok Klješćina Žljeba u polju Dabar

Postaja 12: Potok Plitvica

Plitvica je velik potok, bogat vodom i brzog protoka (Slika 6.). Stanište je idealno za potočnu pastrvu, što je i potvrđeno uzorkovanjem. U potoku je ulovljena samo potočna pastrva, koja je prisutna u većem broju.



Slika 6. Uzvodni dio potoka Plitvica

Postaja 13: Rječica

Ovaj se potok ulijeva u jezero Kozjak, u njemu su ulovljene samo potočne pastrve.

Postaja 14: Vrelo

Na ovom su lokalitetu ulovljene samo potočne pastrve. Radi se o izvorišnom području Crne rijeke.

Postaja 15: Potok Matijaševac

Potok Matijaševac također je pritoka jezera Kozjak. U njemu su ulovljene potočne i kalifornijske pastrve, s tim da dominira kalifornijska pastrva, prisutni su i pijori, crvenperke, štuke te zlatovčice.

Postaja 16: Jezero Kozjak

Jezero Kozjak nalazi se na granici Gornjih i Donjih jezera. Dubina mu doseže i preko 40 m. Osim potočnih pastrva, u jezeru Kozjak ulovljen je klen prisutan u većem broju, a primijećena je i kalifornijska pastrva.

Postaja 17: Jezero Prošće

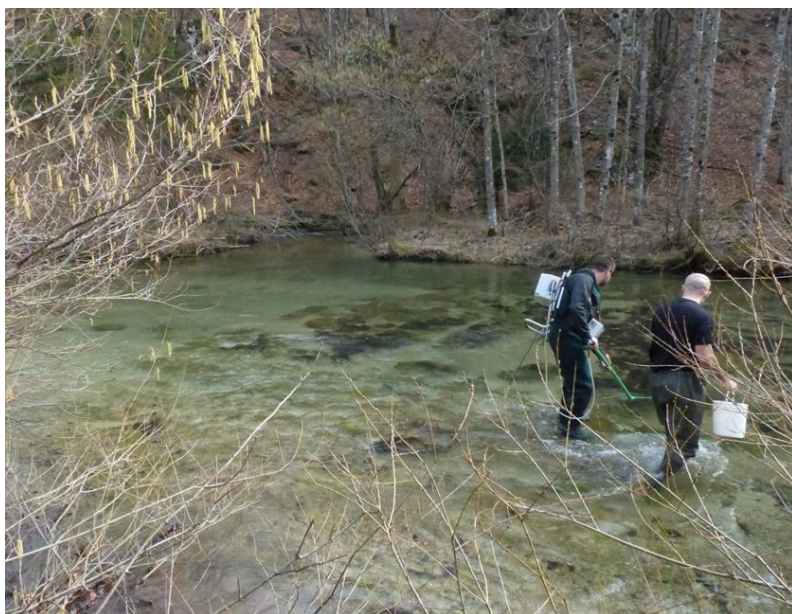
Dubina Proščanskog jezera doseže 36 m, a u njega se ulijeva Matica. Slično kao i u Kozjaku, u Prošću su ulovljene potočne pastrve, ali u ihtiofauni prevladavaju alohtone vrste (klen i crvenperka).

3. MATERIJALI I METODE

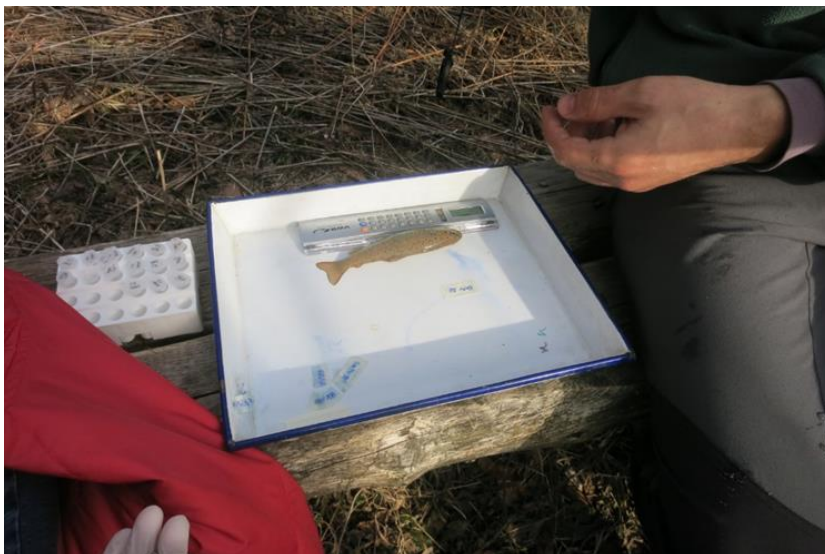
3.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je u potocima i rijekama izvršeno pomoću leđnog elektroagregata (Slika 7.) marke Hans Grassl model IG-200-1, a u jezerima postavljanjem mreža. Za ovo istraživanje primarno je odabrana metoda elektroribolova zbog minimalnog utjecaja na jedinke i populacije te neselektivnosti. Naime, nakon kratkotrajne paralize mišića uzrokovane električnom strujom, ribe se vrlo brzo oporavljaju te nemaju nikakvih trajnih posljedica. Ovom je metodom djelotvoran lov većih, ali i manjih jedinki zbog čega je moguće utvrditi prisutnost različitih starosnih kategorija te uzorkovati čak i vrlo male jedinke na mjestima gdje, zbog ekoloških razloga, veće jedinke nisu prisutne (Sooley i sur. 1998).

Nakon ulova jedinkama je odrezan komadić prsne peraje te je nekoliko jedinki sa svakog lokaliteta fotografirano (Slika 8.). Uzorci tkiva pohranjeni su u označene epruvetice, a zatim u prijenosni hladnjak. Po povratku s terena uzorci su premješteni u zamrzivač i čuvani na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kako ne bi došlo do razgradnje DNK. Manipulacija jedinkama na terenu provedena je vrlo brzo, nakon čega su žive vraćene na mjesto ulova. Broj uzorka uzetih na pojedinom lokalitetu ovisio je o uspješnosti lova (u korelaciji s gustoćom populacija), ali i pretpostavljenoj važnosti područja za nativnu pastrvu.



Slika 7. Lov pomoću leđnog elektroagregata na potoku Plitvica



Slika 8. Fotografiranje jedinki i uzimanje uzoraka za molekularne analize

3.2. Laboratorijski postupci (izolacija DNA, umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje)

Ukupna genomska DNK izolirana je iz uzoraka tkiva pomoću *DNeasy Blood i Tissue* kompleta za izolaciju (QIAGEN), prema protokolu proizvođača. Uzorcima tkiva u eprueticama dodano je 180 μL pufera ATL, 20 μL protein kinaze, sadržaj eprueticice promiješan je *vortex* mješalicom te su ostavljene 24 h u kupelji na 56 °C. Sljedeći dan uzorci su izvađeni iz kupelji, promješani *vortex* mješalicom dodano im je 200 μL pufera AL te 200 μL etanola (96 %). Sadržaj eprueticica prebačen je u eprueticice s kolonom (*pipet spin column*) te centrifugiran na 8000 rpm 1 minutu. Kolone su potom prebačene u nove eprueticice, dodano je 500 μL pufera AW1, ponovljeno je centrifugiranje pri istim uvjetima. Kolone su ponovno prebačene u nove eprueticice, dodano je 500 μL pufera AW2 te je sadržaj centrifugiran na 14 000 rpm 3 minute. Posljednji put su kolone prebačene u nove eprueticice, dodano je 150 μL pufera AE za čije elucijsko djelovanje je potrebno pričekati minutu, potom je sadržaj centrifugiran na 8000 rpm 1 minutu. Uzorcima su pridružena imena te su pohranjeni u zamrzivač.

Za polimerazne lančane reakcije (PCR) korišten je komplet kemikalija *HotStarTaq Plus Master Mix Kit* (QIAGEN) te početnice, sintetizirane u servisima *Eurofins Genomics* i *Macrogen Europe*. Analizirani genski marker jest gen za citokrom *b* (*cyt b*), on je kodirajući gen unutar mitohondrijske DNK (mtDNK). Kako bi se dobili čitavi geni ili što već odsječci gena koji mogu vjerno odraziti raznolikost među populacijama i taksonomskim jedinicama, protokol za PCR reakciju optimiziran je i korištene su početnice za koje se utvrdilo da daju najbolje produkte. Protokoli PCR reakcija te početnice za PCR navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Laboratorijski protokol i početnice za analizirani genski marker citokrom *b* (*cyt b*)

gen	<i>cyt b</i>
PCR uvjeti	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
početnice za PCR	H-cyp: CCTAGCTTTGGGAGYTAGG L-cyp: GAYTTGAARAACCACGTTG

Uspješnost PCR reakcija provjerena je metodom elektroforeze na agaroznom gelu. Gel je pripremljen od 1 g agaroze i 100 mL pufera TAE (1 %). Pufer TAE po svom sastavu je tris (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Uzorci su nanoseni na gel te je provedena elektroforeza na 120 V, 30 minuta. Gel je potom prebačen u otopinu etidijevog bromida te fotografiran pod ultraljubičastim osvjetljenjem. Pročišćavanje i sekvenciranje PCR produkata provedeno je u servisu *Macrogen Europe*. Za sravnjivanje sekvenci korišten je računalni program BioEdit 7.2.5 (Hall 1999), a kromatogrami svih sekvenci vizualno su provjereni prilikom sravnjivanja.

3.3. Filogenetska rekonstrukcija

Za utvrđivanje srodstvenih odnosa među pastrvama šireg područja Plitvički jezera te njihovog položaja unutar filogenetskog stabla roda *Salmo* provedena je filogenetska rekonstrukcija korištenjem sljedećih metoda: metoda najveće parsimonije (MP), metoda najveće vjerojatnosti (ML), Bayesova metode (BAY) i metoda susjednog povezivanja (MJ). Prve tri metode rezultiraju filogenetskim stablima, dok MJ metoda daje filogenetsku mrežu,

što je osobito pogodno za blisko srodne jedinke, među čijim populacijama je moguć horizontalan transfer gena.

MP i ML analize provedene su pomoću programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) i MEGA6.06 (Tamura i sur. 2007), dok je za BAY analizu korišten program MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck i Ronquist 2003) te standardne postavke (dva simultana programa, a za svaki je *Markov Chain Monte Carlo* algoritam proveden četiri puta tijekom tri milijuna generacija, stabla su skupljana svakih 100 generacija, prvih 20% je odbačeno dok je podržanost stabla, izražena preko Bayesovih posterirnih vjerojatnosti (BPP) izračunata iz tzv. konsenzusnog stabla (*50% majority rule consensus tree*). Sve MP i ML analize provedene su pod heurističkim modelom uz 100 ponavljanja, uz nasumičan redoslijed unošenja taksa, preklapanje grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem (TBR, od engleskog izraza *tree bisection-reconnection*). Tom se metodom traži stablo najkraće topologije preraspodjeljivanjem grana na način da se prvotni kladogram podijeli na više manjih potkladograma, koji se zatim preslaguju u nova stabla. Sva mjesta kodona, kao i sve nukleotidne supstitucije, imala su jednaku težinu. Podržanost grananja utvrđena je analizom samopodržanja (BS, od engleskog *Bootstrap analysis*), uz 1 000 BS ponavljanja i 10 replika dodatnih sekvenci.

Osim haplotipova dobivenih ovim istraživanjem, u filogenetsku su rekonstrukciju uključene su i sekvence potočne pastrve s drugih lokaliteta te iz Banke gena (Tablica 2.), dok su za ukorijenjenje stabala korištene sekvence vrste *Thymallus thymallus*, koja pripada u istu porodicu, ali različit rod od analiziranih sekvenci prema Crete-Lafreniere i sur. (2012) najbliži rodu *Salmo*. MJ analiza provedena je pomoću računalnog programa Network 4.5.1.6. (Fluxus Technology Ltd.) i temeljila se na haplotipovima iz ovog istraživanja te predstavnicima do sada utvrđenih linija iz Hrvatske, a nije uključivala sekvence iz geografski udaljenijih populacija, s obzirom da je njen osnovni cilj bio potvrda filogenetskog položaja plitvičkih pastrva, ako se u obzir uzme i horizontalni transfer gena.

Tablica 2. Sekvence potočne pastrve iz Banke gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) koje su uključene u filogenetsku rekonstrukciju

ime sekvence	pristupni kod	referenca
LOH349	KF985737	Schenekar i sur. 2014.
LOH350	KF985738	Schenekar i sur. 2014.
LOH347	KF985736	Schenekar i sur. 2014.
LB021	KF985714	Schenekar i sur. 2014.
LB022	KF985715	Schenekar i sur. 2014.
LB023	KF985716	Schenekar i sur. 2014.
KK7028	KF985706	Schenekar i sur. 2014.
KK7025	KF985705	Schenekar i sur. 2014.
KK7023	KF985704	Schenekar i sur. 2014.
HaH013	KF985681	Schenekar i sur. 2014.
HaH014	KF985682	Schenekar i sur. 2014.
HaH015	KF985683	Schenekar i sur. 2014.
DLZ011	KF985675	Schenekar i sur. 2014.
DLZ012	KF985676	Schenekar i sur. 2014.
DLZ013	KF985677	Schenekar i sur. 2014.
CZR013	KF985672	Schenekar i sur. 2014.
CZR014	KF985673	Schenekar i sur. 2014.
CZR015	KF985674	Schenekar i sur. 2014.
AND006	KF985668	Schenekar i sur. 2014.
AND007	KF985669	Schenekar i sur. 2014.

3.4. Intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost te interspecijska različitost

Razina genske raznolikosti sadržana unutar pojedine populacije te unutar čitave primijećene svojte procijenjena je određivanjem mjera DNA polimorfizma korištenjem programa DnaSP 5.10 (Librado i Rozas 2009). Određene su sljedeće mjere:

- broj haplotipova (h)
- raznolikost haplotipova (H_d)
- broj polimorfni mjesta (S)
- ukupan broj mutacija (η)
- raznolikost haplotipova (H_d)
- prosječan broj razlika nukleotida (K)
- nukleotidna raznolikost (π).

Podaci o genskoj raznolikosti koju posjeduje određena populacija, odnosno svojta bitni su za procjenu njene sposobnosti suočavanja s promjenama u okolišu. U istom programu napravljeni su i statistički testovi interspecijske genske različitosti populacija utvrđenih svojti koji su nam dali podatke o protoku gena i genskoj uniformnosti populacija.

3.5. Efektivna veličina i povezanost populacija

Procjena efektivne veličine populacije, bitna za određivanje rizika od izumiranja, napravljena je pomoću programa MIGRATE 3.2.1 (Beerli 2009) korištenjem Bayesove metode. Međudjelovanja populacija autohtonih svojti pastrva na širem području Plitvičkih jezera analizirana su u programu DnaSP 5.10 (Librado i Rozas 2009), pomoću kojeg je određen broj migranata po generaciji iz pojedine populacije u sve ostale.

4. REZULTATI

4.1. Prisutnost potočne pastrve i ostalih vrsta na obrađenim lokalitetima

Tijekom terenske obrade lokaliteta najveći broj pastrva ulovljen je u Bijeloj rijeci, Koreničkoj rijeci, Matici koreničkoj i potoku kod Josipdola, a najmanji na lokalitetima Vrelo, potok Matijaševac i jezero Prošće. Ulovljene su i druge vrste riba: kalifornijska pastrva, pijor, klen, crvenperka, peš, brkica, štika i zlatovčica. Kalifornijska pastrva (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), najbrojnija je alohtona i invazivna vrsta na širem području Plitvičkih jezera jer je u direktnoj kompeticiji s potočnom pastrvom za prostor i resurse, prisutna je na 7 lokaliteta obuhvaćenih ovim istraživanjem, a pronađene su i najmlađe starosne kategorije. Osim nje, u velikoj mjeri prisutan je klen (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758), također alohotona vrsta za šire područje Plitvičkih jezera koji je izravna prijetnja potočnoj pastrvi jer se hrani njenim jajima i mladi. Najraznolikija ihtiofauna zabilježena u potoku Matijaševcu gdje su ulovljene sve navedene vrste riba, osim klena i peša, a tamo je ulovljen i najmanji broj potočnih pastrva jer staništem dominira kalifornijska pastrva.

4.2. Filogenetski položaj plitvičkih pastrva

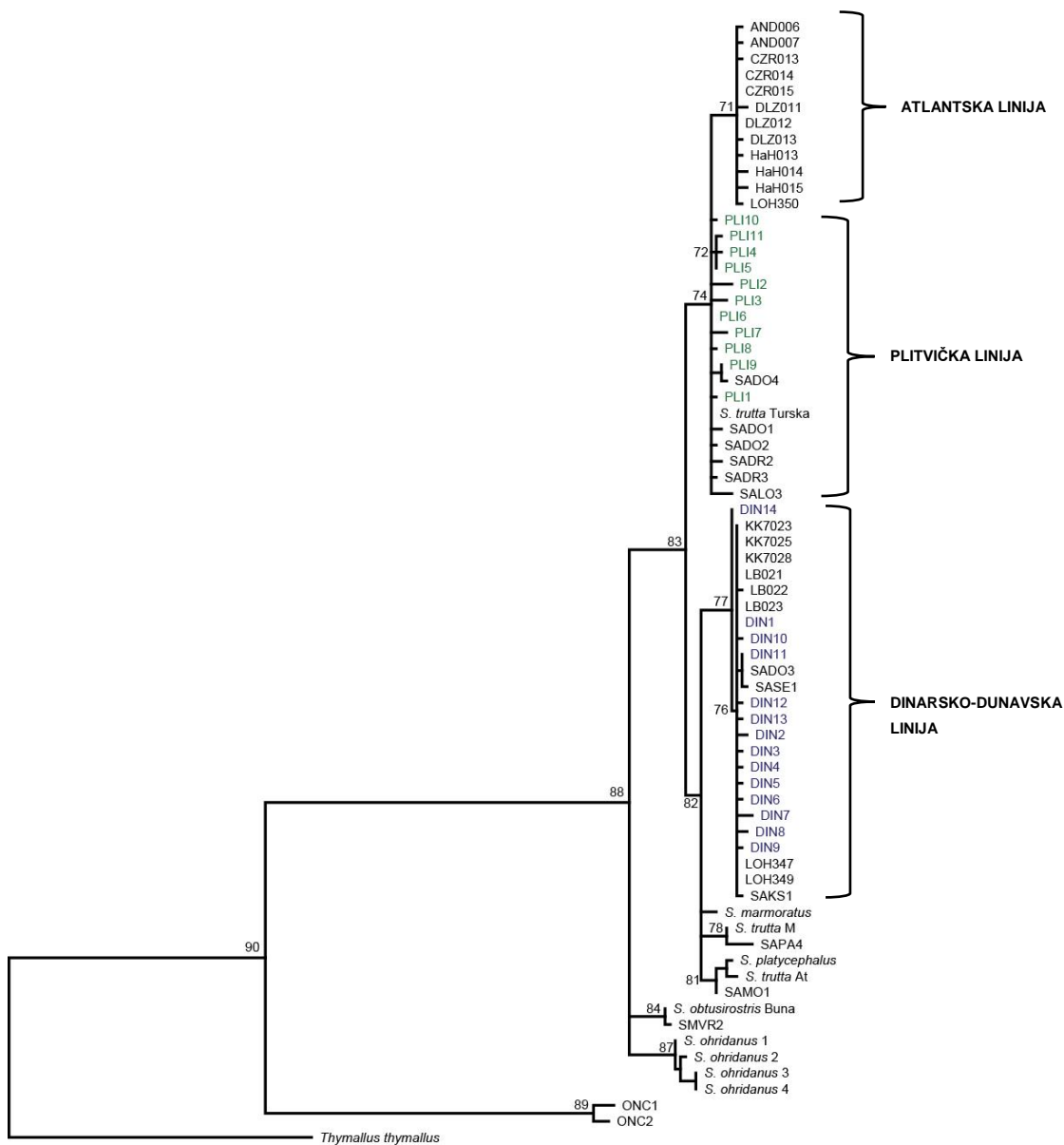
Filogenetska rekonstrukcija temeljena je na sekvencama gena za citokrom *b* (*cyt b*) dugim 1141 parova baza, od kojih je 876 konstantnih, 265 varijabilnih. Parsimonijski značajnih mjesta, tj. mjesta koja imaju bar dva nukelotida koja se pojavljuju bar dva puta je 176, a ostalih 89 varijabilnih mjesta nisu nositelji filogenetskog signala. Analize su provedene na 150 sekvenci potočne pastrve iz jedinki sa šireg područja Plitvičkih jezera, a radi dobivanja točnijih podataka i preciznijeg pozicioniranja naših pastrva u filogenetsku rekonstrukciju uključene sekvence gena za *cyt b* potočne pastrve s drugih lokaliteta iz prethodno provedenih istraživanja u Hrvatskoj te iz Banke gena. U ukupnom je uzorku utvrđeno 69 različitih haplotipova roda *Salmo*.

Dobivena stabla pokazuju jednaku topologiju, ukazuju na izrazitu strukturiranost vrste *S. trutta*, postojanje nekoliko evolucijski odvojenih linija, neobičnu geografsku rasprostranjenost haplotipova te naglašavaju taksonomsku problematiku roda *Salmo*. Gen za citokrom *b* (*cyt b*), pokazao je kako potočne pastrve šireg područja Plitvičkih jezera pripadaju u dvije nezavisne, evolucijski odvojene linije.

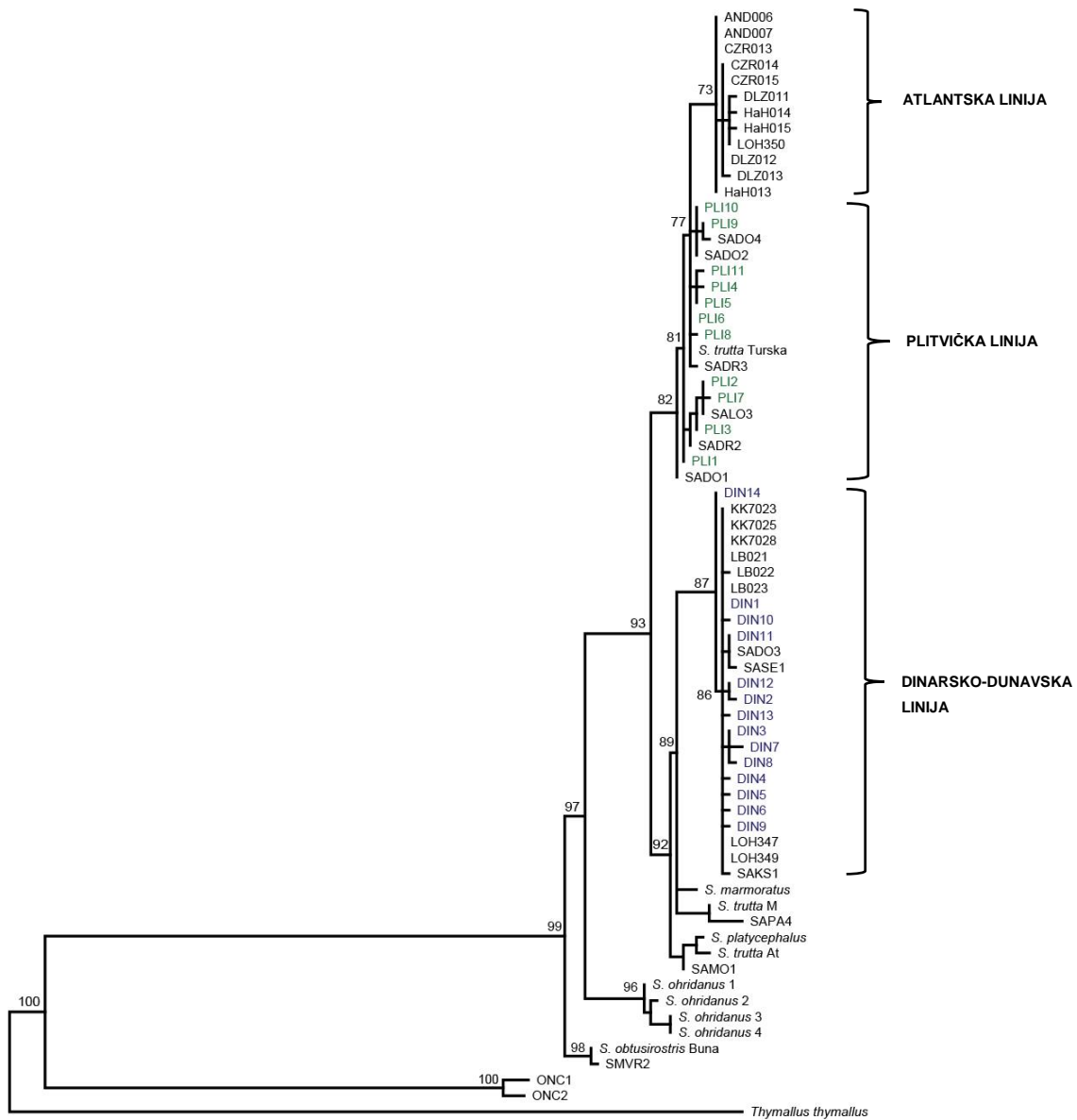
Prvoj liniji pripada polovica haplotipova šireg područja Plitvička jezera te nekoliko austrijskih haplotipova dunavskog slijeva iz Banke gena. Kako je evolucijski razvoj te linije, prema do sada provedenim analizama, krenuo upravo iz dinarskog područja, a centar njenog areala vezan uz područje Like, ova jedinica je nazvana **dinarsko-dunavskom**. Na širem području Plitvičkih jezera postoji nekoliko čistih populacija te linije: Sartuk, potok Plitvica, jezero Kozjak i Lička Jesenica.

Preostali haplotipovi šireg područja Plitvičkih jezera, uz dio hrvatskih haplotipova s drugih područja izdvojili su se u zasebnu liniju. Ta linija označena je kao **plitvička**, iako se bez detaljnog taksonomskog istraživanja ne može ustanoviti točno o kojoj se taksonomskoj razini radi. Topologija dobivenih filogenetskih stabala, različitost haplotipova u odnosu na do sada zabilježene, stupanj intrapopulacijske genske raznolikosti te postojanje čistih populacija plitvičke linije (Korenička rijeka, Klješčina Žljeba u polju Dabar) govore u prilog pretpostavci kako je i ta linija autohtona za šire područje Plitvičkih jezera.

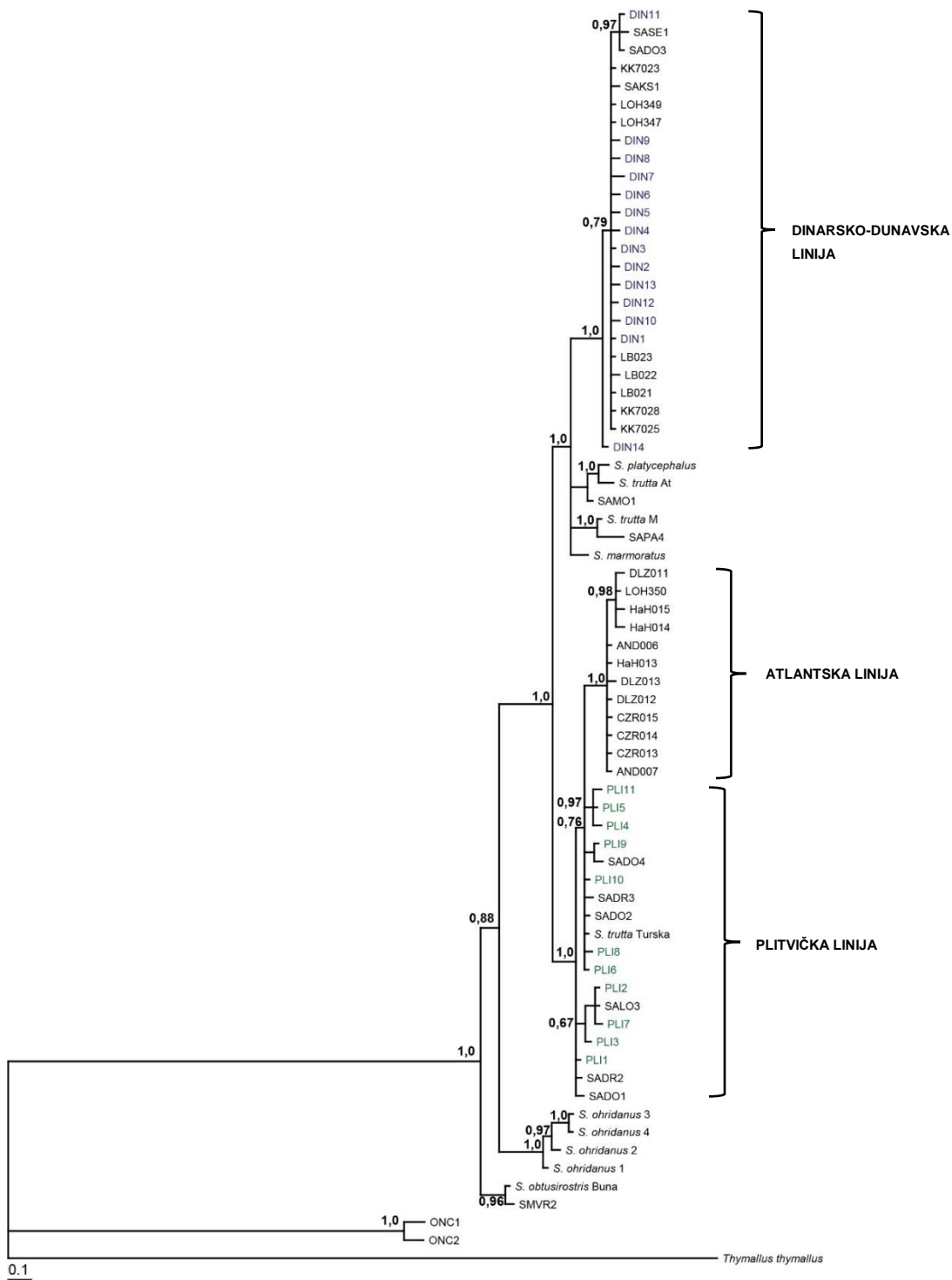
Sestrinska linija plitvičkoj liniji, kojoj pripada dio haplotipova dunavskog slijeva Austrije i Češke, prema tradicionalnom nazivlju označena je kao *atlantska*. Međutim, noviji autori (Schenekar i sur. 2014), kritiziraju taj naziv i protive se uvriježenom mišljenju da su atlantski haplotipovi alohtoni u dunavskom slijevu srednje Europe.



Slika 9. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju *cyt b* gena, brojevi pored grananja označavaju podržanost u postotcima. Haplotipovi dobiveni ovim istraživanjem grupirali su se u dvije linije, a označeni su slovima DIN i PLI te plavom i zelenom bojom.

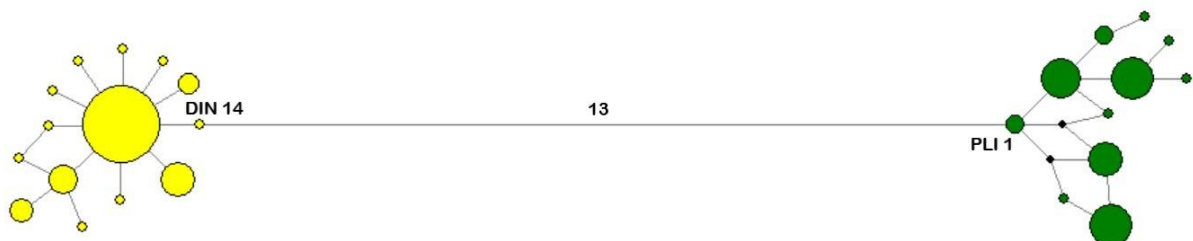


Slika 10. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju *cyt b* gena, brojevi pored grananja označavaju podržanost u postotcima. Haplotipovi dobiveni ovim istraživanjem grupirali su se u dvije linije, a označeni su slovima DIN i PLI te plavom i zelenom bojom.



Slika 11. Filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom metodom (BAY) na temelju *cyt b* gena, brojevi pored grananja označavaju podržanost. Haplotipovi dobiveni ovim istraživanjem grupirali su se u dvije linije, a označeni su slovima DIN i PLI te plavom i zelenom bojom.

Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) jasno pokazuje odvajanje dviju linija prisutnih na širem području Plitvičkih jezera, tj. haplotipova PLI 1 i DIN 14 iz kojih su daljnjim mutacijama nastali novi haplotipovi unutar svake linije (Slika 12.).



Slika 12. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ), naveden je broj mutacija na liniji ako je ≥ 3 . Haplotipovi dinarsko-dunavske linije označeni su žutim točkama, plitvičke linije zelenim, a crne točke predstavljaju haplotipove neprimjećene u ovom istraživanju. Promjer točaka proporcionalan je broju sekvenci tog haplotipa.

4.3. Rasprostranjenost i razlikovanje svojti

4.3.1. Rasprostranjenost i zastupljenost pojedinih haplotipova

Rasprostranjenost haplotipova na lokalitetima i broj jedinki u kojima je pronađen pojedini *cyt b* haplotip prikazani su u tablicama 3. i 4. Može se vidjeti kako su na lokalitetima Sartuk, potok Plitvica, jezero Kozjak i Lička Jesenica prisutne čiste populacije prve dinarsko-dunavske svojte, dok su čiste populacije plitvičke svojte pronađene u Koreničkoj rijeci i Klješćinoj Žljebi u polju Dabar. Na svim ostalim lokalitetima (Čujića Krčevine, potok Ljeskovac, Matijaševac, Matica korenička, Bijela rijeka, Crna rijeka, Matica, Prošće, Vrelo, Rječica te potok kod Josipdola) obitavaju dvije pastrvske svojte.

Tablica 3. Broj jedinki na istraživanim lokalitetima u kojima je prisutan pojedini *cyt b* haplotip dinarsko-dunavske linije

LOKALITET/ HAPLOTIP	DIN 1	DIN 2	DIN 3	DIN 4	DIN 5	DIN 6	DIN 7	DIN 8	DIN 9	DIN 10	DIN 11	DIN 12	DIN 13	DIN 14
Lička Jesenica	8													
Potok Sartuk	5			1										
Čujića Krčevine	1	1	5											
Bijela rijeka	5										1			
Crna rijeka	3									1				
Matica	5				1	1								
Potok Ljeskovac	3											1		
Korenička rijeka														
Matica korenička	3													1
Potok kod Josipdola								4					4	
Klješčina Žljeba														
Potok Plitvica	13													
Rječica	2				6									
Vrelo							1							
Matijaševac					1									
Jezero Kozjak	2				1			1	1					
Jezero Prošće	1		1											

Tablica 4. Broj jedinki na istraživanim lokalitetima u kojima je prisutan pojedini cyt *b* haplotip plitvičke linije

LOKALITET/ HAPLOTIP	PLI 1	PLI 2	PLI 3	PLI 4	PLI 5	PLI 6	PLI 7	PLI 8	PLI 9	PLI 10	PLI 11
Lička Jesenica											
Potok Sartuk											
Čujića Krčevine		2									
Bijela rijeka	1	3	1			1	1				
Crna rijeka			5			1					
Matica			1								
Potok Ljeskovac		1	1								
Korenička rijeka		2			9	1		1			1
Matica korenička					6	8					
Potok kod Josipdola			1			3					
Klješčina Žljeba		5							1	3	
Potok Plitvica											
Rječica		2									
Vrelo				1	1						
Potok Matijaševac			1								
Jezero Kozjak											
Jezero Prošće		2									

4.3.2. Morfološko razlikovanje svojti

Razlikovanje svojti potočne pastrve pronađenih na širem području Plitvičkih jezera jasno je na genskoj razini, no morfološke razlike nisu vidljive na prvi pogled (Slika 13.). Da bi se utvrdile determinacijske značajke bit će potrebno provesti detaljno istraživanje vanjskog izgleda većeg broja jedinki koje pripadaju ovim svojtima. Kako su pastrve vrlo plastične i brzo se prilagođavaju na različite uvjete staništa, unutar svake svojte može se primijetiti velika morfološka varijabilnost. Njihov izgled mijenja se i sa starošću, što dodatno povećava morfološku intraspecijsku varijabilnost.



Slika 13. a) jedan od morfortipova dinarsko-dunavske svojte potočne pastrve



Slika 13. b) jedan od morfortipova plitvičke svojte potočne pastrve

4.4. Intraspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost te interspecijska genska različitost svojti

Analizom sekvenci *cyt b* gena utvrđena je intraspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost te interspecijska genska različitost svojti potočne pastrve pronađenih na širem području Plitvičkih jezera. Osnovne mjere genskog polimorfizma utvrđene na temelju *cyt b* gena za populacije dinarsko-dunavske svojte, kao i za svojtu u cjelini opisane su u tablici 5.

Tablica 5. Mjere genskog polimorfizma dinarsko-dunavske svojte na temelju *cyt b* gena. N – broj sekvenci, S – broj polimorfni mjesta, η - ukupan broj mutacija, h – broj haplotipova, Hd – raznolikost haplotipova, k – prosječan broj razlika nukleotida, π - nukleotidna raznolikost.

populacija	N	S	η	h	Hd	k	π
Lička jesenica	8	0	0	1	0	0	0
Čujića krčevina	7	2	2	3	0,524	0,571	0,0005
Potok Sartuk	6	1	1	2	0,333	0,333	0,0003
Rječica	8	1	1	2	0,429	0,429	0,0004
Potok Plitvica	13	0	0	1	0	0	0
Matica	7	17	17	3	0,524	4,857	0,0043
Jezero Kozjak	5	4	4	4	0,9	1,6	0,0014
Crna rijeka	4	1	1	2	0,5	0,5	0,0004
Bijela rijeka	6	1	1	2	0,333	0,333	0,0003
Potok Ljeskovac	4	1	1	2	0,5	0,5	0,0004
Matica korenička	4	1	1	2	0,5	0,5	0,0004
Potok kod Josipdola	8	3	3	2	0,517	1,714	0,0015
ukupan uzorak	84	13	13	14	0,615	0,901	0,0008

Na preostalim lokalitetima sakupljen je nedovoljan broj jedinki pa utvrđivanje mjera genskog polimorfizma nije provedeno, to su lokaliteti: Prošće (2), Vrelo (1) i Matijaševac (1), no oni su uključeni u ukupni uzorak. Dobiveni podaci ukazuju na to da je genska raznolikost čitave svojte i zasebnih populacija vrlo niska. Na dva lokaliteta pronađen je samo jedan haplotip, a na sedam lokaliteta dva haplotipa. Genski najraznolikiji lokalitet je jezero Kozjak na kojem su prisutna četiri haplotipa.

Utvrđene su i mjere genskog polimorfizma na temelju cyt *b* gena unutar populacija te cjelokupne plitvičke linije potočne pastrve (Tablica 6.). Zasebna analiza nije provedena za populacije s nedovoljnim brojem jedinki: Čujića Krčevine (2), Rječica (2), Matica (1), Prošće (2), potok Ljeskovac (2), Vrelo (2) i Matijaševac (1), ali su one pridružene ukupnom uzorku.

Tablica 6. Mjere genskog polimorfizma plitvičke svojte na temelju cyt *b* gena. N – broj sekvenci, S – broj polimorfnih mjesta, η - ukupan broj mutacija, h – broj haplotipova, Hd – raznolikost haplotipova, k – prosječan broj razlika nukleotida, π - nukleotidna raznolikost.

populacija	N	S	η	h	Hd	k	π
Crna rijeka	6	3	3	2	0,333	1	0,0008
Bijela rijeka	7	4	4	5	0,857	1,905	0,0017
Korenička rijeka	14	6	6	5	0,593	1,736	0,0015
Matica korenička	14	1	1	2	0,527	0,527	0,0005
Potok kod Josipdola	4	3	3	2	0,5	1,5	0,0013
Klješčina Žljeba	9	6	6	3	0,639	3	0,0026
ukupan uzorak	66	9	9	11	0,816	2,504	0,0022

Iako je manji ukupni uzorak plitvičke linije potočne pastrve na istraživanom području postoji veća genska raznolikost. Visoka genska raznolikost primijećena je u Bijeloj rijeci i Koreničkoj rijeci gdje je utvrđena prisutnost pet haplotipova te u Klješćinoj Žljebi u polju Dabar gdje su prisutna tri haplotipa.

Provedeni su i testovi genske različitosti koju su potvrdili da među populacijama obje linije potočne pastrve postoji genska različitost (Tablica 7.). Testovi permutacije pokazali su statistički značajnu p-vrijednost pa možemo zaključiti kako se populacije dinarsko-dunavske, ali i plitvičke pastrve međusobno genski razlikuju. Genska različitost rezultat je izoliranosti populacija te posljedica onemogućenog protoka gena uslijed fragmentacije staništa.

Tablica 7. Rezultati testova interspecijske genske različitosti za dinarsko-dunavsku i plitvičku liniju potočne pastrve

	dinarsko-dunavska linija		plitvička linija	
	statistika genske različitosti	p-vrijednost	statistika genske različitosti	p-vrijednost
χ^2	307,960	0,0000	132,161	0,0025
H _{ST}	0,38955	0,0000	0,10382	0,0000
K _{ST}	0,16450	0,0000	0,19055	0,0000
K _{ST} *	0,28498	0,0000	0,13081	0,0000
Z	1359,87179	0,0000	3516,92617	0,0000
Z*	6,99065	0,0000	7,86605	0,0000

4.5. Efektivna veličina i povezanost populacija utvrđenih svojti

Gen za cyt *b* pogodan je za analize populacijske genetike zbog svoje varijabilnosti, informativnosti i duljine. Prikupljeni broj uzoraka po lokalitetu omogućio je precizne procjene raznolikosti i veličine pojedinih populacija i utvrđenih svojti unutar istraživanog područja.

Tablica 8. Procjena efektivne veličine populacija dinarsko-dunavske linije potočne pastrve na širem području Plitvičkih jezera, prikazana je procjena efektivnih veličina populacija za koje je bilo moguće dobiti vjerodostojnu procjenu.

populacija	efektivna veličina (Ne)
Lička Jesenica	456
Čujica Krčevine	646
Bijela rijeka	1633
Matica	9276
Potok Ljeskovac	2786

Efektivna veličina populacija dinarsko-dunavske pastrve (Tablica 8.) kreće se od samo 456 jedinki, koliko je procijenjeno za populaciju iz Ličke Jesenice pa do oko 9276 jedinki, što je procjena za Maticu. Za pastrve, kao predatorske vrste u hladnovodnim ekosustavima, ne očekuje se visoka gustoća populacija, no dobivene vrijednosti efektivne veličine populacija dosta su niske te ukazuju na ugroženost dinarsko-dunavske linije potočne pastrve. Populacije Čuića Krčevine i Ličke Jesenice imaju jako male efektivne veličine te je njihov evolucijski opstanak pod velikim upitnikom.

Prema procjeni broja migranata iz pojedine populacije u ostale (Tablica 9.), populacije Lička Jesenica, Sartuk i Plitvica ističu se kao populacije „izvori“, iz njih migriraju jedinke u „prijelazne“ populacije poput potoka Ljeskovca i Matice koreničke ili u populacije „primatelje“ kao što je Matica. Ovakvi rezultati ukazuju na to da dinarsko-dunavska linija potočne pastrve ima metapopulacijsku strukturu, odnosno strukturu unutar koje postoji više odvojenih populacija koje izmjenjuju jedinke migracijama, disperzijom ili djelovanjem čovjeka (Akçakaya i sur. 2007).

Tablica 9. Procjena broja migranata po generaciji u populacijama dinarsko-dunavske linije prema Nei 1873, Nei 1962, Lynch i Crease 1990 i Hudson 1992; LJ – Lička Jesenica, ČK – Čujića Krčevine, SA – potok Sartuk, RJ – Rječica, MA – Matica, KO – Jezero Kozjak, BR – Bijela rijeka, PL – potok Ljeskovac, MK – Matica korenička, JO – potok kod Josipdola, PV – potok Plitvica. Negativne vrijednosti ukazuju da se migracija odvija u suprotnom smjeru.

	Nei 1873	Nei 1962	Lynch i Crease 1990	Hudson 1992		Nei 1873	Nei 1962	Lynch i Crease 1990	Hudson 1992
LJ-ČK	0,68	2,67	2,08	2,06	SA-PL	-10,91	3,65	/	/
LJ-SA	336	4,83	/	/	SA-JO	0,87	1,28	0,80	0,80
LJ-RJ	0,40	0,33	0,20	0,20	RJ-PV	0,32	0,27	0,20	0,20
LJ-MA	10,25	5,63	/	/	RJ-MA	1,99	3,10	4,12	4,11
LJ-KO	2,39	4,38	/	/	RJ-KO	7,06	1,81	2,15	2,15
LJ-BR	336	4,38	/	/	RJ-PL	1,42	0,68	0,43	0,43
LJ-PL	48,0	2,25	/	/	RJ-MK	1,42	0,68	0,43	0,43
LJ-MK	48,0	4,25	/	/	RJ-JO	1,00	0,71	0,45	0,45
ČK-SA	1,44	3,16	2,17	2,16	PV-MA	7,81	4,62	/	/
ČK-RJ	1,39	1,96	1,37	1,36	PV-KO	1,97	2,77	/	/
ČK-PV	0,54	2,13	2,08	2,06	PV-PL	21,83	1,97	/	/
ČK-MA	2,01	8,89	23,03	24,00	PV-MK	21,83	1,97	/	/
ČK-KO	4,95	4,25	3,59	3,59	PV-JO	0,32	0,81	0,67	0,67
ČK-BR	1,44	3,16	2,17	2,16	MA-KO	-30,6	6,77	-29,22	-28,25
ČK-PL	2,19	4,17	2,37	2,35	MA-BR	-18,73	6,36	/	/
ČK-MK	2,19	4,35	2,54	2,52	MA-MK	-14,0	8,90	-18,62	-18,75
ČK-JO	1,74	3,02	2,61	2,61	MA-JO	1,22	2,51	2,56	2,56
SA-PV	60,49	3,65	/	/	KO-JO	4,32	2,93	3,42	3,41
SA-MA	-18,73	6,36	/	/	BR-JO	0,87	1,28	0,80	0,80
SA-KO	11,71	3,94	/	/	PL-JO	1,29	1,56	0,86	0,86
SA-BR	-12,00	5,00	/	/	MK-JO	1,29	1,56	0,86	0,86

Procjene efektivne veličine populacija plitvičke linije potočne pastrve pokazale su zabrinjavajuće vrijednosti (Tablica 10.), sve populacije za koje su se mogli izračunati valjani rezultati s obzirom na broj jedinki i prisutnih haplotipova, broje manje od 1000 jedinki. Prema Frankham i sur. (2014) broj jedinki manji od 1000 smatra se nedovoljnim za osiguranje evolucijskog opstanka populacije, osobito ako nema obnove putem imigracija.

Tablica 10. Procjena efektivne veličine populacija plitvičke linije potočne pastrve na širem području Plitvičkih jezera, prikazana je procjena efektivnih veličina populacija za koje je bilo moguće dobiti vjerodostojnu procjenu.

populacija	efektivna veličina (Ne)
Crna rijeka	593
Josipdol	803
Korenička rijeka	293
Klješčina Žljeba	350

S obzirom na manji broj čistih populacija plitvičke linije potočne pastrve te procijenjene efektivne veličine populacija, rezultati povezanosti populacija (Tablica 11.) u skladu s time ukazuju na vrlo ograničen i jednosmjernan protok gena te postojanje metapopulacije. Jedine značajnije migracije jesu iz Bijele rijeke u Klješčinu Žljebu u polju Dabar, iz Koreničke rijeke u Maticu koreničku pa iz nje u potok kod Josipdola. Iz Bijele rijeke postoje i migracije u Koreničku rijeku, Maticu i potok kod Josipdola pa može se zaključiti da se radi o populaciji „izvoru“, ostale su „prijelazne“ populacije, jedino je Klješčina Žljeba u polju Dabar isključivo populacija „primatelj“.

Tablica 11. Procjena broja imigranata po generaciji u populacijama plitvičke linije prema Nei 1873, Nei 1962, Lynch i Crease 1990 i Hudson 1992. BR – Bijela rijeka, CR – Crna rijeka, MK – Matica korenička, JO – potok kod Josipdola, DP – Klješčina Žljeba u polju Dabar, RK – Korenička rijeka.

	Nei 1873	Nei 1962	Lynch i Crease 1990	Hudson 1992
CR-BR	2,36	3,10	3,82	3,81
CR-RK	1,14	0,88	0,40	0,40
CR-MK	1,15	0,31	0,18	0,18
CR-JO	1,64	0,97	0,83	0,83
BR-RK	3,61	1,10	0,62	0,62
BR-MK	3,06	0,47	0,32	0,32
BR-JO	4,13	1,54	1,23	1,23

	Nei 1873	Nei 1962	Lynch i Crease 1990	Hudson 1992
BR-DP	48,54	6,89	51,92	51,50
RK-MK	4,55	5,42	5,02	5,01
RK-JO	1,88	3,88	2,61	2,61
RK-DP	2,09	1,57	1,05	1,05
MK-JO	7,93	2,46	3,07	3,08
MK-DP	1,43	0,86	0,61	0,61
JO-DP	1,56	3,22	2,54	2,53

5. RASPRAVA

Dobiveni rezultati, filogenetska stabla i mreža, jasno ukazuju na prisutnost dvije evolucijski nezavisne linije potočne pastrve na širem području Plitvičkih jezera koje su tijekom duge evolucijske prošlosti došle u sekundarni kontakt na području Plitvičkih jezera te ondje ostale u složenom suživotu. One obitavaju u osjetljivom ekosustavu, jedinstvenom po svojoj strukturi jer su prisutne čiste populacije obje linije, ali i njihove mješovite populacije. S obzirom da su u filogenetske analize uključeni haplotipovi s drugih područja Hrvatske te iz Banke gena, a naše linije se izdvajaju kao zasebne, velika je vjerojatnost da se radi o linijama autohtonima za šire područje Plitvičkih jezera. Razlikovanje linija jasno je na molekularnoj razini, međutim njihov vanjski izgled jako je sličan, a prisutno je i više morfotipova svake linije što je karakteristično za pastrve s obzirom na njihovu veliku morfološku plastičnost i varijabilnost.

Kako sistematika roda *Salmo* nije ni približno uređena te ne odgovara stvarnoj situaciji u prirodi (Kottelat i Freyhof 2007), utvrđenim svojstama teško je odrediti točan taksonomski status. Broj vrsta roda *Salmo* koje nastanjuju hrvatske vodotoke još je nepoznat, prema starijim podacima u Hrvatskoj vjerojatno obitava pet vrsta od kojih su četiri dosad opisane kao podvrste potočne pastrve (Čaleta i sur. 2015). Na dobivenim filogenetskim stablima vidljivo je odvajanje više od pet linija unutar *Salmo trutta* što govori o izuzetnoj strukturiranosti vrste i oprečno je mišljenju kako je ona podijeljena samo na pet linija (Bernatchez i sur. 1992, Bernatchez 2001, Snój i sur. 2002, Jug i sur. 2004, Apostolidis i sur. 2007). Linije utvrđene ovim istraživanjem unutar brojnih mješovitih populacija (11) zadržavaju svoju gensku osebnost, nisu primijećeni tragovi rekombinacije i hibridizacije što ukazuje na reproduktivnu izoliranost pa postoji mogućnost da one predstavljaju odvojene podvrste ili čak vrste.

Dinarsko-dunavska linija pronađena je na čak 15 lokaliteta obuhvaćenih ovim istraživanjem. Ona je zasigurno zasebna taksonomska jedinica, no radi li se o zasebnoj vrsti koju je Stanko Karaman opisao kao ličku pastrvu, samo šireg areala od pretpostavljenog ili je ona jedinstvena linija potočne pastrve rasprostranjena u dunavskom slijevu središnje Europe s centrom raznolikosti na području Dinarida, ne možemo sa sigurnošću potvrditi. Postoji i gledište (Kottelat i Freyhof 2007) da ta linija predstavlja zasebnu vrstu *Salmo labrax*, Pallas 1814 u velikom broju prisutnu u vodotocima dunavskog slijeva (Freyhof 2013).

Najvjerojatnija se čini prva hipoteza ako uzmemo u obzir specifične ekološke uvjete krških staništa te prilagodljivost pastrva abiotičkim i biotičkim uvjetima staništa koja se očituje u promjeni vanjskog izgleda, da je nastala jedinstvena linija koju je Karaman prepoznao kao zasebnu vrstu.

Prema dobivenim podacima plitvička linija, prvi puta primijećena u Hrvatskoj, zasigurno je sestrinska linija austrijskoj *atlantskoj* liniji potočne pastrve. Sam naziv atlantski uvelike je kritiziran u novijim radovima (Lerceteau-Köhler i sur. 2013, Schenekar i sur. 2014) kao i podjela na pet linija potočne pastrve koju su predložili Bernatchez i sur. (1992) analizama kontrolne regije (CR) mtDNK, a čije se spominjanje nastavilo u kasnijim radovima (Bernatchez 2001, Snoj i sur. 2002, Jug i sur. 2004, Apostolidis i sur. 2007). Imena tih pet utvrđenih linija trebala su odraziti alopatrijsku evolucijsku povijest kroz koju su nastale, ali ona navode na krive zaključke o rasprostranjenosti i porijeklu potočne pastrve (Schenekar i sur. 2014).

Postoji velika vjerojatnost da je plitvička linija autohtona za ovo područje što je u skladu s najnovijim nalazima koji pobijaju tvrdnje da je *atlantska* linija alohtona u srednjoj i južnoj Europi (Schenekar i sur. 2014), pogotovo jer smo utvrdili postojanje dviju čistih populacija te linije na širem području Plitvičkih jezera. Predstavlja li ona zasebnu taksonomsku jedinicu ili je ona vrsta *Salmo trutta sensu stricto*, kako se dosad i smatrala *atlantska* linija? Konačan taksonomski zaključak teško je donijeti, s obzirom da je ovo istraživanje rađeno samo na jednom genskom markeru i na ograničenom području. Da bi se riješile ove taksonomske nedoumice i utvrdio položaj obje utvrđene linije unutar roda *Salmo* potrebno je provesti daljnja morfološka istraživanja plitvičkih pastrva, ali i sveobuhvatna molekularna i morfološka istraživanja potočne pastrve ostalih vodotoka dunavskog slijeva Hrvatske, ali i Europe.

Pronađene su i četiri čiste populacije dinarsko-dunavske linije potočne pastrve te 11 mješovitih populacija. Prisutnost čistih populacija ukazuje na važnost očuvanja ovog područja i njegovih jedinstvenih ekoloških uvjeta. Najveće prijetnje opstanku autohtonih populacija potočne pastrve na širem području Plitvičkih jezera predstavlja fragmentacija i degradacija staništa, promjena ekoloških uvjeta u vodotocima te selekcijski pritisak invazivnih vrsta (kalifornijska pastrva, klen).

Genska raznolikost dinarsko-dunavske linije izrazito je niska što predstavlja prijetnju njenom opstanku zbog smanjene sposobnosti suočavanja s promjenama u okolišu. To je posljedica onemogućenog protoka gena zbog antropogenih zahvata na staništima. Problem nedovoljne genske raznolikosti osobito je naglašen na lokalitetima gdje su prisutne čiste populacije ove svojte (Lička Jesenica, Sartuk i Plitvica), gdje varijabilnosti nema (Lička Jesenica i Plitvica) ili je minimalna (Sartuk). Lokaliteti najveće genske raznolikosti plitvičke linije su Bijela rijeka gdje je prisutna i dinarsko-dunavska linija te Korenička rijeka gdje je pronađena čista populacija, unutar tih populacija prisutno je pet različitih haplotipova. Genska raznolikost ove svojte nešto je veća u odnosu na dinarsko-dunavsku, osobito u populacijama koreničkog područja pa možemo zaključiti da postoji veća vjerojatnost njenog prilagođavanja i opstanka u promijenjenim uvjetima.

Kad se pogleda ukupna genska raznolikost utvrđenih svojti čak ni ona nije velika. Niska genska raznolikost smanjuje elastičnost i otpornost populacije, a navodi se kao prijetnja opstanku vrste zbog tog što dovodi do smanjenja efektivne veličine populacija i sposobnosti suočavanja s promjenama u okolišu (Furlan i sur. 2012). Procijenjene efektivne veličine populacija male su za obje utvrđene svojte, ali pokazuju suprotan trend od genske raznolikosti jer su procjene bolje za dinarsko-dunavsku liniju nego za plitvičku. Najbrojnije populacije dinarsko-dunavske linije procijenjene su za lokalitete potok Ljeskovac i Maticu, a plitvičke linije za Josipdol i Crnu rijeku. S obzirom na broj uzoraka i broj prisutnih haplotipova najrealnije se čine vrijednosti procijenjene za Maticu i Crnu rijeku. Međutim, potrebno je istaknuti da se ove procjene temelje na jednom genskom markeru što znači da možda ne odražavaju stvarno stanje genske raznolikosti pronađenih populacija.

Analizom povezanosti populacija utvrđeno je postojanje metapopulacija obje svojte, odnosno populacija koje su međusobno povezane neravnomjernim migracijama, gdje neke populacije služe kao „izvori“ dok su ostale „prijelazne“ ili populacije „primatelji“. Populacije „izvori“ dinarsko-dunavske linije su Lička Jesenica i Plitvica gdje su prisutne čiste populacije, a plitvičke linije populacija Bijele rijeke gdje je uočena velika genska raznolikost. Za plitvičku liniju također je uočena jednosmjerna migracija uglavnom iz južnijih staništa prema sjevernijim.

Kod razmatranja migracijskih događaja važno je naglasiti da se oni ne odnose samo na ovaj povijesni trenutak već izražavaju važnost migracija za stvaranje genske varijabilnosti

kroz duže razdoblje koje završava i uključuje trenutnu situaciju, a često su posljedica recentnog antropogenog djelovanja o kojem nemamo dostupne podatke.

Ovo istraživanje ukazalo je na važnost očuvanja i zaštite prirodnog bogatstva Plitvičkih jezera, za što nije potrebno čekati razrješenje taksonomije potočne pastrve. Mjere koje bi doprinijele konzervaciji potočne pastrve su: restauracija staništa, osiguranje riječne protočnosti, smanjenje trofije, uklanjanje invazivnih vrsta te sprječavanje krivolova.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem svih dobivenih rezultata, filogenetskih stabala i mreže, prisutnosti i rasprostranjenosti linija, testova genske raznolikosti i različitosti, strukture, efektivne veličine i povezanosti populacija može se zaključiti sljedeće:

- Na širem području Plitvičkih jezera prisutne su dvije različite, evolucijski nezavisne linije roda *Salmo*, obje vjerojatno autohtone za ovo područje koje obitavaju u mješovitim populacijama, ali svaka ima nekoliko čistih populacija.
- Točan taksonomski status dviju linija ne može biti utvrđen, ali linije su u velikoj mjeri reproduktivno izolirane te na zajedničkim lokalitetima zadržavaju svoju gensku osebnost.
- Dinarsko-dunavska linija izdvaja se kao zasebna taksonomska jedinica, a haplotipovi koji pripadaju toj liniji pronađeni su i u vodotocima dunavskog slijeva u Austriji. Plitvička linija, sestrinska je linija *atlantskoj* potočnoj pastrvi.
- Primijećena je izrazito niska genska raznolikost ovih linija, niža za dinarsko-dunavsku liniju, malene efektivne veličine populacija i slab protok gena što je posljedica fragmentacije i degradacije staništa te pritiska invazivnih vrsta.

7. LITERATURA

- Akçakaya, H.R., Mills G., Doncaster G.P. (2007): The role of metapopulations in conservation. *Key Topics in Conservation Biology*: 64-84.
- Apostolidis A., Apostolou P., Georgiadis A., Sandaltzopoulos R. (2007): Rapid identification of *Salmo trutta* lineages by multiplex PCR utilizing primers tailored to discriminate single nucleotide polymorphisms (SNPs) of mitochondrial control region. *Conservation Genetics* **8**: 1025-1028.
- Avise, J.C. (1998): The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* **7**: 371-379.
- Berli 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.
- 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.
- Buj I., Marčić Z., Čaleta M., Šanda R., Geiger M.F., Freyhof J. et al. (2017): Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes). *PLoS ONE* **12** (12): e0187366.
- Buj I., Šanda R., Marčić Z., Čaleta M., Mrakovčić M. (2014): Combining Morphology and Genetics in Resolving Taxonomy—A Systematic Revision of Spined Loaches (Genus *Cobitis*; Cypriniformes, Actinopterygii) in the Adriatic Watershed. *PLoS ONE* **9** (6): e99833.
- Crete-Lafreniere A., Weir L., Bernatchez L. (2012): Framing the Salmonidae Family Phylogenetic Portrait: A More Complete Picture From Increased Taxon Sampling. *PLoS ONE* **7** (10): e46662.

- Ćaleta M., Buj I., Mrakovčić M., Mustafić P., Zanella D., Duplić A., Mihinjač T., Katavić A. (2015): Hrvatske endemske ribe. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb.
- Emerson B., Hewitt G. (2005): Phylogeography. *Current Biology* **15** (10): 367-371.
- Frankham R., Bradshaw C. J.A., Brook B.W. (2014): Genetics in conservation management: Revised recommendations for 50/500 rules, Red list criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* **170**: 56-63.
- Freyhof, J. (2013): *Salmo labrax*. The IUCN Red List of Threatened Species. e.T135658A4172650.
- Furlan E., Stoklosa J., Griffiths J., Gust N., Ellis R., Huggins R.M., Weeks A.R. (2012): Small population size and extremely low levels of genetic diversity in island populations of the platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. *Ecology and Evolution* **2** (4): 844-857.
- Georgiev S. (2011): Study of *Salmo* genus (Pisces, Salmonidae) on the Balkan Peninsula. *Ribarstvo* **69** (1): 11-20.
- Gušić. B., Marković, M. (1974): Plitvička jezera – čovjek i priroda. Nacionalni park Plitvička jezera, Zagreb.
- 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.
- Helfman G.S., Collette B.B., Facey D.E., Bowen B.W. (2009): *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution and Ecology*. John Wiley & Sons Ltd, NJ.
- Hewitt, G.M. (2001): Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**, 537-549.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. (2001): MR BAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **14**: 817-818.
- Johnson G.D., Patterson C. (1996): *Relationships of Lower Euteleostean Fishes*. Academic Press, Inc. Chapter 12.
- Jug T., Berrebi P., Snoj A. (2005): Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout populations as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation* **123**: 381-388.
- Kottelat M., Freyhof J. (2007): *Handbook of European freshwater fishes*. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin.

- Lerceteau-Köhler E., Schliewen U., Kopun T., Weiss S. (2013): Genetic variation in brown trout *Salmo trutta* across the Danube, Rhine and Elbe headwaters: a failure of phylogeographic paradigm? *BMC Evolutionary Biology* **13**:176.
- 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.
- Maitland P.S., Crivelli A.J. (1996): *Conservation of Freshwater Fish – Conservation of Mediterranean wetlands*. Tour de Valat, Arles.
- Meaški H., Marciuš M., Ptiček Širočić A. (2016): Hidrogeološke značajke vodotoka Plitvica na području Plitvičkih jezera, Hrvatska. *Inžinjerstvo okoliša* **3** (2): 21-32.
- 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.
- Mrakovčić, M., Mišetić, S., Povž, M. (1995): Status of freshwater fish in Croatian Adriatic river system. *Biological Conservation* **72**: 179-185.
- Nakhleh L., Guohua J., Fengmei Z., Mellor-Crummey J. (2005): Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony. *IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB'05)*.
- Nelson, J.S. (2006): *Fishes of the World*. 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- Odak T. (2004): Molekularno-biološka obilježja endemske mekousne pastrve (*Salmothymus obtusirosis salomitana*). Magistarski rad. Zagreb.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014): Molecular Markers in Phylogenetic Studies – A Review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology* **2**: 131 doi:10.4172/2329-9002.1000131.
- Pavlica M. (2012): *Mrežni udžbenik iz genetike*. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Udžbenici zagrebačkog sveučilišta, elektronička izdanja, I izdanje, Zagreb.
- Posada D., Crandall K.A. (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* **16** (1): 37-45.
- Pough H. F., Janis C., Heiser J.B. (2012): *Vertebrate Life*, 7th Edition. Prentice Hall, NJ.

- 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.
- Snoj A., Melkič E., Sušnik S., Muhamedagić S., Dovč P. (2002): DNA phylogeny supports revised classification of *Salmothymus obtusirostris*. *Biological Journal of the Linnean Society* **77**: 399-411.
- 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.
- Swofford D.L. (2002): *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*, Version 4 [Computer software and manual]. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007): MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24** (8): 1596-1599.
- Wheeler, A. (1992): *Freshwater fishes of Britain and Europe*. Rainbow Books, London.
- Zhang D.X., Hewitt G.M. (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution* **11** (6): 247-251.

internetski izvori:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

pristupljeno: 10.12.2017.

<http://www.geografija.hr/hrvatska/plitvicka-jezera-tamo-gdje-voda-prkosi-krsu/>

pristupljeno: 29.12.2017.

<https://www.itis.gov/servlet/>

pristupljeno: 07.01.2018.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Lucija Raguž
Mjesto rođenja: Zagreb
Datum rođenja: 29. siječnja 1993.
Email: lucijaraguz29@gmail.com

Radno iskustvo:

- rujan 2017. – danas, Biološki odsjek PMF, ispomoć u Laboratoriju za kralješnjake
- rujan 2012. – danas, instruktor kemije i matematike
- svibanj 2016. – rujan 2017. Decathlon Zageb Istok, suradnica u trgovini
- siječanj – veljača 2013. ZARA Ilica, suradnica u trgovini

Jezici:

- Engleski – aktivna uporaba jezika u govoru i pismu (C1)
- Talijanski – pasivna uporaba jezika u govoru i pismu (B1)

Obrazovanje:

- 2012. – 2018. PMF, Biološki odsjek, integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije; smjer nastavnički
- 2011. – 2012. PMF, Kemijski odsjek, preddiplomski studij kemije
- 2007. – 2011. Gimnazija Sesvete, opći smjer

Aktivnosti vezane uz obrazovanje:

- Simpozij studenata bioloških usmjerenja (SiSB) 2016.
- BIUS, Sekcija za edukaciju ak. god. 2015./2016.
- Noć biologije 2013. i 2015. godine

Ostalo:

- vozačka dozvola B kategorije
- članica AK Dinamo Zrinjevac
- članica Volonterskog centra SKAC