

Populacijska struktura i raznolikost oštrulje (Aulopyge huegeli Heckel, 1943; Cypriniformes, Actinopteri) u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini

Knjaz, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:219982>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Mia Knjaz

Populacijska struktura i raznolikost oštrulje (*Aulopyge huegelii* Heckel, 1943;
Cypriniformes, Actinopteri) u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2020.

Ovaj rad, izrađen na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Buj, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja Magistre Eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Populacijska struktura i raznolikost oštrulje (*Aulopyge huegellii* Heckel, 1943; Cypriniformes, Actinopteri) u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini

Mia Knjaz

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Aulopyge huegellii Heckel, 1943 (Cypriniformes, Actinopteri) ili oštrulja endem je vodotoka Jadranskog slijeva. Naseljava krške rijeke i jezera u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini. Zbog malog i rascjepkanog areala oštrulja se smatra ugroženom na lokalnoj i globalnoj razini. Istraživanja na ovoj vrsti su malobrojna, a molekularni podaci oskudni. Cilj ovog istraživanja bio je pomoći opisivanju strukture populacija oštrulje u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini analizom gena za citokrom *b* i mitohondrijske kontrolne regije. Uzorci su prikupljeni na lokalitetima diljem cijelog areala rasprostranjenosti ove vrste. U laboratoriju je izolirana ukupna genomska DNA, a lančanom reakcijom polimerazom umnožen je gen citokrom *b* i dio mitohondrijske kontrolne regije. Uspješnost reakcija provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu, a na uspješno izoliranim uzorcima izvršeno je sekvenciranje. Filogenetske rekonstrukcije populacija provedene su metodama maksimalne parsimonije, najveće vjerojatnosti te susjednog sparivanja. Metodom Bayesove inferencije procijenjen je protok gena između populacija te efektivne veličine populacija. Rezultati pokazuju prisutnost 13 haplotipova citokroma *b* i 11 haplotipova kontrolne regije na istraživanim lokalitetima. Vrsta pokazuje umjerenu genetičku raznolikost i slabu genetičku strukturiranost. Protok gena između populacija nije ustanovljen. Efektivne veličine populacija su male. Kao evolucijski značajne jedinice utvrđene su populacije na lokalitetima Roški slap na Krki, Ruda na Cetini te rijeka Šujica i vodotoci oko Tomislavgrada u Duvanjskom i Livanjskom polju.

(broj stranica: 35 , broj slika 8, broj tablica 8, broj literaturnih navoda 60, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: oštrulja, endem, molekularna filogenija, populacijska genetika, konzervacijski prioriteti

Voditelj: doc. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Ivana Buj, doc. dr. sc. Sunčica Bosak, izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Rad prihvaćen: 16.9.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Population structure and diversity of Dalmatian barbelgudgeon (*Aulopyge huegellii* Heckel, 1943; Cypriniformes, Actinopterygii) in Croatia and Bosnia and Herzegovina

Mia Knjaz

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Aulopyge huegellii Heckel, 1943 (Cypriniformes, Actinopterygii) or dalmation barbelgudgeon is endemic to the Adriatic Basin. It inhabits karst rivers and lakes in Croatia and Bosnia and Herzegovina. Due to its small and fragmented distribution area it is considered endangered locally and globally. Research on this species is limited, and molecular data are scarce. The aim of this study was to help describe the structure of dalmation barbelgudgeon populations in Croatia and Bosnia and Herzegovina by analysing genes for cytochrome *b* and mitochondrial control region. Samples were collected at sites along the entire distribution area of this species. Total genomic DNA was isolated in the laboratory, the cytochrome *b* gene and part of the mitochondrial control region were amplified by polymerase chain reaction. The success of the reactions was checked by agarose gel electrophoresis, and sequencing was performed on successfully isolated samples. Phylogenetic reconstructions of populations were obtained by the methods of maximum parsimony, maximum likelihood, and median joining. Bayesian inference method was used to estimate gene flow between populations and the effective size of populations. The results show the presence of 13 cytochrome *b* haplotypes and 11 control region haplotypes at research sites. The species shows moderate genetic diversity and weak genetic structuring. Gene flow between populations has not been detected. Effective population sizes are small. The populations of Roški slap on the Krka river, Ruda on the Cetina river and Šujica river with the watercourses around Tomislavgrad in Duvanjsko and Livanjsko fields have been identified as evolutionarily significant units.

(number pages 35, number figures 8, number tables 8, number references 60, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Dalmation barbelgudgeon, endemic species, molecular phylogeny, population genetics, conservation priorities*

Supervisor: doc. dr. sc. Ivana Buj

Reviewers: doc. dr. sc. Ivana Buj, doc. dr. sc. Sunčica Bosak, izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Thesis accepted: 16.9.2020.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Sistematika oštrulje	1
1.2.	Opis i biologija vrste	2
1.3.	Značajke dinarskog krša	3
1.4.	Područje rasprostranjenosti	4
1.5.	Ugroženost oštrulje	4
1.6.	Molekularne metode u filogenetskoj rekonstrukciji i populacijskoj genetici	5
1.7.	Literaturni pregled sistematskih istraživanja oštrulje	7
1.8.	Ciljevi istraživanja	8
2.	Materijali i metode	9
2.1.	Područje istraživanja	9
2.1.1.	Rijeke Krka i Čikola.....	10
2.1.2.	Rijeka Cetina	11
2.1.3.	Livanjsko i Duvanjsko polje.....	11
2.1.4.	Mostarsko blato.....	12
2.2.	Prikupljanje uzoraka	13
2.3.	Izolacija DNA.....	14
2.4.	Umnažanje lančanom reakcijom polimeraze (PCR)	15
2.4.1.	PCR protkol za biljeg citokrom <i>b</i> (<i>cyt b</i>)	15
2.4.2.	PCR protokol za biljeg kontrolne regije (CR).....	15
2.5.	Elektroforeza na agaroznom gelu.....	16
2.6.	Pročišćavanje i određivanje primarne strukture nukleotida.....	16
2.7.	Računalna obrada.....	16
2.7.1.	Filogenetske rekonstrukcije za biljeg <i>cyt b</i>	17
2.7.2.	Filogenetske rekonstrukcije za biljeg CR	17
3.	Rezultati.....	18
3.1.	Rasprostranjenost i raznolikost haplotipova <i>cyt b</i>	18
3.2.	Filogenetske rekonstrukcije na temelju biljega <i>cyt b</i>	19
3.3.	Rasprostranjenost i raznolikost haplotipova CR.....	23
3.4.	Filogenetske rekonstrukcije na temelju biljega CR.....	23
3.5.	Intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost te interspecijska različitost	27
3.5.1.	Mjere genskog polimorfizma prema <i>cyt b</i> biljegu.....	27
3.5.2.	Mjere genskog polimorfizma prema CR biljegu	28
3.6.	Efektivne veličine populacija i protok gena.....	29
4.	Rasprava	30

4.1. Filogenetske rekonstrukcije.....	30
4.2. Intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost te interspecijska različitost.....	31
4.3. Protok gena i efektivna veličina populacija.....	32
4.5. Konzervacijski prioriteti.....	33
5. Zaključak.....	35
Literatura.....	1
Životopis.....	6

1. Uvod

Slatkovodna ihtiofauna Hrvatske vrlo je raznolika. Bogatstvo vrsta, a posebice endema, svrstava nas među najraznolikije europske zemlje. Po ukupnom broju slatkovodnih vrsta riba, Hrvatska zauzima drugo mjesto u Europi, iza Turske, koja ima znatno veći teritorij (MRAKOVČIĆ I SUR. 2006). Bogatstvo vrsta posljedica je zemljopisnog položaja Hrvatske koji obuhvaća dva riječna sustava odvojena planinskim masivom Dinarida, jadranski i crnomorski. Crnomorski slijev Hrvatske nastanjuje 87 vrsta slatkovodnih riba, od čega se 12 vrsta smatra endemskim, dok jadranski slijev nastanjuje 80 vrsta, od čega je 38 vrsta endemsko za ovo područje. Od ukupnog broja vrsta slatkovodnih riba u Hrvatskoj, oko 30 vrsta strane su i/ili invazivne vrste (ĆALETA I SUR. 2015). Endemi hrvatske ihtiofaune velikim su dijelom povezani sa krškim staništima. Jedan od takvih endema je i oštrulja (*Aulopyge huegelli* Heckel, 1843), predmet ovog istraživanja. 1840. godine austrijski zoolog i ihtiolog Johann Jakob Heckel prvi puta susreće oštrulju te ju 1843. godine opisuje kao novu vrstu za znanost. Ime roda *Aulopyge* dolazi od grč. riječi *aulos* (cijev) i *pyge* (rep), a naziv vrste „*huegelli*“ u čast austrijskom botaničaru Carlu Freiherru Hügelu. Ova vrsta po mnogočemu je zanimljiva pa ju Heckel u velikom djelu „Die Süßwasserfische der Österreichischen Monarchie mit Rücksicht auf die Angränzenden Länder“ iz 1859. godine čak naziva „najvršnjim ciprinidom Europe“.

Istraživanja rađena na ovoj monotipskoj vrsti su malobrojna i ona još uvijek predstavlja veliku nepoznanicu za ihtiologe. Unatoč tome, njezina nerazjašnjena filogenija i biogeografska prošlost čine ju vrlo zanimljivom u kontekstu razumijevanja evolucije europskih ciprinida, a njezina neobična ekologija odražava funkcionalnu osebujnost krških staništa.

1.1. Sistematika oštrulje

Prikazana je sistematika vrste *Aulopyge huegellii* Heckel, 1843:

Carstvo: Animalia (životinje)

Koljeno: Chordata (svitkovci)

Potkoljeno: Vertebrata (kralješnjaci)

Razred: Actinopteri (zrakoperke)

Red: Cypriniformes

Porodica: Cyprinidae (šaranke)

Potporodica: Cyprininae

Rod: *Aulopyge*

Oštrulja pripada razredu Actinopteryi (zrakoperke), redu Cypriniformes i porodici Cyprinidae (šaranke). Od ostalih skupina riba, vrste koje pripadaju ovoj porodici (kao i čitavom redu Cypriniformes) razlikuju se po tome što nemaju zube u čeljustima, ali imaju ždrijelne zube kojima usitnjaju hranu.

Vrste iz porodice Cyprinidae rasprostranjene su diljem svijeta, izuzev Australije i Južne Amerike te Madagaskara i Novog Zelanda. Cyprininae najveća je potporodica unutar porodice Cyprinidae, s najvećom raznolikošću vrsta u Africi i istočnoj i južnoj Aziji. U Europi je autohtono svega 38 vrsta iz ove potporodice. Vrste iz potporodice Cyprininae razlikuju se od vrsta iz drugih potporodica po prisutnosti dva para brčića i po 8½ ili 14-21½ razgranatih šipčica u leđnoj peraji (KOTTELAT I FREYHOF 2007).

Oštrulja se lako može razlikovati od drugih vrsta iz ove potporodice po tijelu koje je gotovo ili sasvim bez ljusaka te po prisutnosti leglice kod ženke (produžena urogenitalna papila spojena s prednjim rubom podrepne peraje).

1.2. Opis i biologija vrste

Tijelo većine oštrulja je golo, što se smatra prilagodbom na život u podzemlju gdje oštrulja provodi dio životnog ciklusa. GUZINA I VUKOVIĆ (1987) su istraživanjem oštrulja iz Buškog jezera primijetili sporadičnu pojavu ljusaka kod manjeg broja jedinki. Razlog tome može biti nemogućnost migriranja u podzemlje zbog izgradnje umjetne akumulacije (GUZINA I VUKOVIĆ 1987, GUZINA 2000).

Tijelo joj je žućkasto-sivo sa crnim mrljama po leđnoj i repnoj peraji, a bočna pruga je valovita. Uobičajena veličina odraslih jedinki je 9-12 cm, ali zabilježeni su i primjerci od 25 cm (MRAKOVČIĆ I SUR. 2006).

Spada u sveždere s preferencijom prema životinjskoj hrani. Najveći dio prehrane čine ličinke porodice Chironomidae i Ceratopogonidae te predstavnici Copepoda, a zastupljena je i biljna komponenta (alge, više biljke, sjemenke). Oštrulje se hrane tijekom cijele godine, no intenzitet hranjenja smanjen je u zimskom razdoblju. (MIHINJAČ 2018)

Razmnožavanje oštrulja proučavano je različitim metodama (AGANOVIĆ 1970, FREYHOF 1997, GUZINA 2000, BLESS I RIEHL 2002, MRAKOVČIĆ I SUR. 2006), a dobiveni rezultati prilično se razlikuju pa tako ni danas nije sa sigurnošću utvrđena sezona mrijesta, temperatura vode u vrijeme mrijesta i fekunditet.

Prema MRAKOVČIĆ I SUR. (2006) mrijest počinje krajem travnja, a mužjak i ženka dobivaju izražena spolna obilježja. Tijekom mrijesta mužjak je svjetlije obojen, a po tijelu dobiva tamnije mrlje. Ženka ima leglicu koja služi za odlaganje jaja u pukotine i udubljenja između korijenja biljaka. Mužjak tijekom mrijesta stalno pliva uz ženku, dok ona traži prikladno mjesto za odlaganje jaja.

Oštrulja (*Slika 1.*) živi u jatima koja u jesenskom razdoblju vjerojatno migriraju u podzemne vode (u rijekama) ili u dublje dijelove jezera, a u proljeće, kada razina vode poraste, vraćaju se u nadzemne tokove.



Slika 1. Oštrulja (Aulopyge huegelli Heckel, 1843). Foto: M.Mrakovčić. Izvor: Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske (MRAKOVČIĆ I SUR. 2006)

1.3. Značajke dinarskog krša

Zanimljivu biologiju oštrulje, ali i drugih endemskih vrsta ovoga područja, možemo pripisati jedinstvenoj hidrologiji dinarskog krša.

Dinarsko gorje, u kojemu prevladavaju karbonatne stijene (vapnenici), je tipski i klasični primjer krškog gorja mezozojske starosti. Ostali krški lanci u Europi su uglavnom manje ili izolirane vapnenačke planine. U svojoj knjizi o hidrologiji krša BONACCI (1987) govori kako se bez pretjerivanja može reći da je krško područje Dinarida koljevka sustavnog proučavanja krša u svijetu.

Krš je tip reljefa koji se razvija na tlu sastavljenom od topljivih stijena; vapnenca (kalcijev karbonat (CaCO_3) ili dolomita (magnezijev karbonat (MgCO_3))). Osnovna značajka krškog reljefa je izrazita i selektivna topljivost stijena. Posljedica toga je nastajanje reljefa s mnogo kamenih udubina i uzvisina. Čvrste stijene kalcijevog karbonata (vapnenca) su većinom na površini gole pa prevladava kamenito tlo, ali je često i vapnenac pokriven tlom pa nastaje pokriveni „zeleni“ krš na kojem se razvija osobita krška vegetacija. Krški reljefni oblici često se dijele na nadzemne (ponikve, škrape, kamenice, udoline, uvale, polja) i podzemne (špilje, jame itd.). Krška polja su posebni oblici krškog reljefa i to su najveći površinski oblici na karbonatnom kršu, a najbrojnija su upravo u Dinarskom kršu. Nastaju dugim radom tekućice koja teče između krških stijena pa ih otapa. Iako se kemijsko djelovanje vode smatra jednim od čimbenika nastanka krških reljefnih oblika, znatnu ulogu u prvotnom oblikovanju polja u kršu imala je i ranija tektonika. Većina krških polja su zapravo dna većih tektonskih potolina. Nalaze se većinom na nadmorskoj visini između 400 i 700 m. Osnovna opća značajka vodotoka u kršu je manjak vode na pretežno sušnoj površini, ali je istodobno mnogo vode u podzemlju gdje uz kišnu klimu u dubljim šupljinama nastaju prirodni vodni rezervoari.

Krške tekućice su većinom kraće ponornice, a naši tipični i višestruki sustavi ponornica su osobito u riječnim bazenima Kupe, Like i Neretve. Velike količine vode koje teku kroz karbonatno podzemlje gdje otapaju stijene pa ponovno izviru kao velika krška vrela. Osim što otječe u podzemlje, voda često u proljeće plavi, kada podzemni prostori ne mogu pohraniti svu količinu. Neke ponornice toliko su izdašne u kišnom dijelu godine da gotovo posve potope polja u kršu kojima protječu. S time su povezane i estavele, otvori na površini koji su povremeno vrela, a povremeno ponori, ovisno o razini podzemne vode. Općenito, polja u kršu složeni su hidrološki sustavi, gdje se povremeni i stalni izvori javljaju u najvišem dijelu polja, estavele su najčešće u srednjem dijelu, a ponori na rubnim, najnižim dijelovima. S vremenom, voda se povlači s površine, a ostaju biološki vrijedna vlažna staništa i močvarni dijelovi toka. (BIONDIĆ I SUR. 2015)

Ovakva promjenjiva hidrologija polja u kršu i njihovih vodotoka uvjetovala je i zanimljivu biologiju riba koje u njima žive, među kojima je i oštrulja. Smatra se da se one u razdobljima suše povlače u podzemlje, a o njihovom životu u podzemlju malo se zna.

1.4. Područje rasprostranjenosti

Oštrulja je endemska vrsta rasprostranjena na razmjerno malom području zapadnog dijela Balkana. U Hrvatskoj je rasprostranjena u krškim rijekama Krki, Čikoli i Cetini te njihovim pritocima. Također, postoje i stariji podaci o rasprostranjenosti ove vrste u rijeci Zrmanji (MRAKOVČIĆ I MIŠETIĆ 1990, MRAKOVČIĆ I SUR. 2006), koji u novije vrijeme nisu potvrđeni. U BiH nastanjuje manje tekućice, ponornice i jezera u Duvanjskom, Livanjskom i Glamočkom polju, a iz Buškog blata (ili Buškog jezera) unesena je i u Blidinje jezero, Mostarsko blato te u Šatorsko jezero koje spada u crnomorski slijev (DELIĆ I SUR. 2005, MRAKOVČIĆ I SUR. 2006).

1.5. Ugroženost oštrulje

Prema Crvenom popisu IUCN-a (eng. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), oštrulja spada u kategoriju ugroženih vrsta (eng. endangered, EN). Kriteriji po kojima je ova vrsta ugrožena uključuju smanjeni obim pojavljivanja manji od 5000 km² (B1ab (iii, v)) koji je izrazito rascjepkan (B1a) te je primijećeno i pogoršanje kvalitete staništa (B1b(iii)). Također primijećeno je i smanjenje broja odraslih jedinki oštrulja (B1b (v)) (CRIVELLI 2006).

U Crvenoj knjizi slatkovodnih riba Hrvatske oštrulja je također svrstana u kategoriju ugroženih vrsta (EN), po istim kriterijima kao i na globalnoj razini (MRAKOVČIĆ I SUR. 2006). Na svim rijekama u Hrvatskoj koje naseljava sagrađene su hidroakumulacije ili je provedena intenzivna regulacija vodotoka. Time je znatno izmijenjen prirodni vodni režim, a njezina su prirodna staništa smanjena ili posve nestala.

I na Crvenoj listi Federacije Bosne i Hercegovine oštrulja se nalazi u kategoriji ugroženih vrsta (EN) iako se ne navode razlozi zbog kojih je ugrožena (Službene novine Federacije BiH 66/13).

U Hrvatskoj je oštrulja proglašena strogo zaštićenom vrstom prema Pravilniku o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/2013, NN 73/2016). Nalazi se i na Uredbi o ekološkoj mreži (NN 124/13), a kao ciljna vrsta navodi se za područje HR2000918 (šire područje NP Krka), HR2000929 (Cetina – kanjonski dio), HR2001313 (srednji tok Cetine s Hrvatačkim i Sinjskim poljem), HR2000936 (Ruda) i HR2000919 (Čikola).

Predložene mjere zaštite uključuju dodatna istraživanja o veličini populacije i ekologiji, edukaciju lokalnog stanovništva, izradu akcijskog plana upravljanja te uspostavu zakonske legislative. Uz to potrebno je i uspostaviti monitoring provedenih mjera (CRIVELLI 2006, MRAKOVČIĆ I SUR. 2006).

1.6. Molekularne metode u filogenetskoj rekonstrukciji i populacijskoj genetici

Otkrivajući evolucijsku povijest određene vrste i rekonstruirajući njihov odgovor na promjene okoliša u prošlosti možemo pomoći predvidjeti njezin odgovor na antropogene promjene u budućnosti, a ovo je znanje izrazito važno za planiranje efektivne zaštite (BUJ I SUR. 2019). Filogenija nekog organizma, vrste ili druge taksonomske kategorije zapravo odražava njenu evolucijsku povijest (LIPSCOMB 1998). Kako bismo rekonstruirali filogeniju nekog organizma primjenjujemo metode molekularne filogenije (filogenetika ili molekularna sistematika). Molekularna filogenija opisuje i rekonstruira obrasce genetskih veza među vrstama i višim sistematskim kategorijama. Filogeografija je znanstvena disciplina koja proučava principe i procese geografske distribucije genealoških linija. Metode komparativne filogeografije omogućile su detaljna istraživanja evolucije okoliša, širenja taksonomskih jedinica u prostoru, procesa specijacije, adaptivne radijacije te izumiranja. (EMERSON I HEWITT 2005)

Drugim riječima, metode molekularne filogenije i komparativne filogeografije omogućile su istraživanje poveznica između populacijskih procesa i biogeografije na nekom prostoru (BERMINGHAM I MORITZ 1998).

S obzirom da mitohondrijska DNA (mtDNA) brzo evoluirala kod viših životinja, a prenosi se samo majčinskom linijom bez međumolekulskih rekombinacija ona se najčešće koristi u filogenetskim istraživanjima (EMERSON I HEWITT 2005). Uz to ona ima još nekoliko prednosti, primjerice prisutnost velikog broja kopija, do 1000 po stanici. 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). Danas se u filogenetskim istraživanjima paralelno koristi više genskih biljega jer kada se koristi samo jedan često se ne mogu primijetiti pojave poput hibridizacije, horizontalnog prijenosa gena ili utjecaja selekcije što dovodi do 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).

Mitohondrijski gen za citokrom *b* smatra se vrlo korisnim biljegom u otkrivanju filogenetskih veza među blisko srodnim taksonomskim jedinicama te se često se koristi u istraživanjima strukture i porijekla ribljih populacija (TSIGENOPOULOS I BERREBI 2000, BUJ I SUR. 2014, BUJ I SUR. 2017, KALAMUJIĆ STROIL I SUR. 2019). 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 oslikavaju srodstvene odnose nekog organizma prikazom odnosa između organizama, kao i redoslijeda specijacijskih događaja kojima su od ranijih predaka nastali današnji potomci. Vjerodostojnost stabala ovisi o tome koliko uključene taksonomske jedinice odgovaraju povijesti grananja linija, s tim da se podrazumijeva da među njima nema protoka gena, a preci više nisu prisutni u recentnoj raznolikosti. Međutim, ovi uvjeti često nisu zadovoljeni, osobito u istraživanjima haplotipovima jedne vrste ili bliskosrodnih i kriptičnih vrsta.

U tom slučaju haplotipske sekvence moguće je posložiti u filogenetsku mrežu (EMERSON I HEWITT 2005) koja se od filogenetskog stabla razlikuje po tome što dopušta poprečne veze između vrsta ili haplotipova koji su u direktnom srodstvu te na taj način ne isključuje rekombinaciju, hibridizaciju i lateralni prijenos gena (NAKHLEH I SUR. 2005).

Populacija je skup jedinki iste vrste koje žive na određenom prostoru i pareći se međusobno izmjenjuju svoj genetički materijal. Ako jedan genotip (odnosno fenotip) daje više potomaka od drugoga kažemo da je reproduktivno uspješniji. Mjera reproduktivnog uspjeha je fitness ili adaptivna vrijednost genotipa. Populacijska genetika znanstvena je disciplina koja se bavi proučavanjem genetičke strukture populacije odnosno analizom učestalosti gena i genotipova u prirodnim populacijama kao i čimbenicima koji ih određuju (PAVLICA 2012). Primjenjujući metode populacijske genetike možemo otkriti rasprostranjenost genskog polimorfizma u prirodnim populacijama, procijeniti protok gena između populacija i efektivne veličine populacija. Na temelju ovih spoznaja moguće je odrediti konzervacijske prioritete i ispod razine vrste što je važno iz više razloga. Primjerice, postojeća taksonomija u mnogim slučajevima ne odražava u potpunosti genetičku raznolikost koja se krije iza nje. Također, u mnogim slučajevima je zaštita cijele vrste kao takve teško primjenjiva u praksi. Umjesto toga jednostavnije je, ali često i efikasnije odrediti druge konzervacijske jedinice poput evolucijski značajnih jedinica (eng. evolutionary significant units, ESUs).

Program MIGRATE vrlo je koristan alat u opisivanju interpopulacijske strukture populacija na temelju protoka gena i efektivne veličine populacije. Program se temelji na teoriji koalescencije i koristi Bayesovu metodu inferencije (BI) za procjenu tzv. naknadnih vjerojatnosti (eng. posterior probabilities) svih parametara populacijskog modela. Početne vrijednosti parametara određuju se koristeći Markov Chain Monte Carlo algoritam. Parametri populacijskog modela koje računa su Θ i M (eng. mutation scaled immigration rate).

Pomoću njih prema formuli $N_m = M * \Theta$ možemo izračunati broj migranata po generaciji (N_m), a efektivne veličine populacija (N_e) prema formuli $N_e = \Theta / \mu$. Vrijednost μ predstavlja stopu mutacije koja je empirijski određena za pojedine taksonomske kategorije.

Dobivene vrijednosti navedenih parametara ne predstavljaju stvarne vrijednosti već aproksimacije na temelju genetičke raznolikosti korištenih sekvenci. Stopa mutacije (μ) za oštrulju do sada nije empirijski izračunata, stoga će za izračune biti korištena standardna vrijednost za ciprinide ($\mu = 0,0000023$).

1.7. Literaturni pregled sistematskih istraživanja oštrulje

1842. godine Heckel u izvješću "Amtlicher Bericht über die neunzehnte Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte im Braunschweig in September 1841." daje vrlo kratak opis vrste i isprva ju smješta u rod *Barbus* Cuvier, 1816. Kasnije joj zbog prisutnosti leglice kod ženki, mijenja ime roda u *Aulopyge* Heckel, 1843.

Godinu dana kasnije, 1843. godine u djelu „Abbildungen und Beschreibungen der Fische Syriens: nebst einer neuen Classification und Characteristik sämtlicher Gattungen der Cyprinen“ daje detaljan opis vrste te ju smješta u Tribus III. Značajke Tribusa III su mesnate usne, četiri brčića i kratke leđna i podrepna peraja. Osnovna perajna formula im je D III-IV 8-10; A III 56. Heckel također navodi da je oštrulja izgledom mješanac vrste *Cobitis barbatula* (validni naziv *Barbatula barbatula* (Linnaeus, 1758), brkica) i vrsta iz roda *Barbus* Cuvier, 1816 (mrene).

1859. godine HECKEL I KNER u već spomenutom djelu „Die Süßwasserfische der Österreichischen Monarchie mit Rücksicht auf die Angränzenden Länder“ unose nove detalje opisu vrste te zaključuju da izgledom podsjeća na kombinaciju rodova *Barbus* Cuvier, 1816 i *Phoxinus* Rafinesque, 1820 (pajori).

Tokom prošlog stoljeća različiti autori mijenjali su njezin sistematski položaj. KARMAN (1971) smješta ju u potporodicu Barbinae koju dijeli na tri tribusa (Aulopygini, Schizothoracini i Barbini). Tribus Aulopygini sadržava samo monotipski rod *Aulopyge* koji se od ostalih razlikuje po mesnatoj urogenitalnoj papili (leglici) kod ženke te tijelu bez ljusaka. Također, zaključuje da je ova vrsta reliktna euroazijskih barbina koji je srodstvenim odnosima povezan i s azijskim šizotoracinima. ARAI (1982) vrstu svrstava u potporodicu Gobioninae na temelju istraživanja kariotipa i morfologije te zaključuje kako je vrsta mješavina barbina (mrena) i gobionina (krkuša). HOWES (1987) na temelju broja i izgleda nerazgranatih i razgranatih šipčica u leđnoj i podrepnoj peraji te zbog prisutnosti maksilarnih brčića spojenih sa VII glavenim živcem svrstava vrstu u potporodicu Cyprininae. Uz to zbog sličnosti s vrstama iz roda *Barbus* Cuvier, 1816 smatra da je oštrulja ili visoko specijaliziran član *Barbus sensu stricto* linije (europska linija barbina) ili srodnik *Barbus sensu lato* linije (euroazijska i afrička linija barbina).

TSIGENOPOULOS I BERREBI (2000) godine na temelju molekularnih analiza citokroma *b* barbina sjevernog Mediterana u koju je bila uključena i oštrulja, zaključuju kako ona spada u *Barbus sensu stricto* liniju s velikom divergencijom od afričke linije. Temeljem molekularnog sata procjenjuju da se oštrulja odvojila od ostalih europskih barbina u srednjem miocenu (prije 12 – 10 milijuna godina).

Po njihovoj teoriji veliku ulogu u naseljavanju Europe vrstama iz Azije imao je Paratethys – veliko, bočato jezero (more) koje se nalazilo između Azije i Europe, a oštrulja je vjerojatno bila djelom prvog migracijskog vala koji je preko Paratethysa došao u Sredozemlje te pronašao refugij u dalmatinskoj regiji. Sa Tsigenopoulosovom i Berrebijevom teorijom složili su se i WANG I SUR. (2013) koji daju još jednu hipotezu o širenju *Barbus sensu stricto* linije. Prema njima, ova linija dijeli zajedničkog pretka s azijskim tribusom Schizotoracini i rodovima *Cyprinion* Heckel, 1843 i *Scaphiodonichthys* Vinciguerra, 1890, a *Barbus sensu stricto* linija nastala je na području Qinghai-Tibetskog platoa u Aziji, a do Europe je stigla prije 16,5 – 15,5 milijuna godina (miocen).

GANTE (2011). analize kalibrira prema fosilnim ostacima te predlaže drugu teoriju prema kojoj je oštrulja još starija vrsta koja se od ostalih vrsta iz *Barbus sensu stricto* linije odvojila tijekom ranog oligocena (prije oko 31,6 milijuna godina). Naseljavanje Sredozemnog mora (tj. južnog dijela mora Tethys) mrenama iz Azije započelo je još tijekom kasnog eocena i ranog oligocena. Također, ova teorija naseljavanja podudara se i s naseljavanjem Europe ostalim ciprinidima iz Azije (PEREA I SUR. 2010).

Najnovije istraživanje sistematskog položaja oštrulje (BENOVIĆ I SUR. 2017) temeljilo se na filogenetskim i morfološkim analizama parazita roda *Dactylogyrus* Diesing, 1850 (Monogenea Carus, 1863 (jednorodni metilji)), zajedničkim parazitima na ciprinidima koji pokazuju različite stupnjeve specifičnosti domaćina. Paraziti i njihovi domaćini koevoluiraju tj. razvijaju recipročne genetičke adaptacije. U slučaju visoke specifičnosti domaćina mogu čak potpuno slijediti filogeniju i povijesnu biogeografiju svojih domaćina. Dvije vrste ovog roda pronađene su na uzorcima oštrulja iz rijeke Šujice, *D. vastator* Nybelin, 1924 i *D. omenti* n.sp. *Dactylogyrus omenti* n.sp. nova je vrsta za znanost te se pretpostavlja da parazitira samo na oštrulji. Filogenetske analize ovog parazita podržavaju sistematski položaj oštrulje unutar potporodice Ciprininae te ukazuju da je ova vrsta blisko srodna vrstama roda *Barbus* Cuvier, 1816 i *Luciobarbus* Heckel, 1843. Morfološke sličnosti između *D. omenti* n. sp. i vrsta roda s Bliskog Istoka govore o povijesnom kontaktu ciprinidnih vrsta koje danas žive u alopatriji te ukazuju na potencijalno odvajanje oštrulje od zajedničkog pretka s ovog područja.

1.8. Ciljevi istraživanja

Istraživanja o veličini i stanju populacija oštrulje su malobrojna. Dosadašnje spoznaje temelje se na istraživanjima morfologije i ekologije pojedinih populacija te se uglavnom odnose na Bosnu i Hercegovinu odnosno na populaciju iz Livanjskog polja (KAPETANOVIĆ I SUR. 1966, AGANOVIĆ I VUKOVIĆ 1968, AGANOVIĆ 1970, GUZINA 2000, MUŠOVIĆ I SUR. 2018). Istraživanja usmjerena na riječne populacije u Hrvatskoj još su malobrojnija (GUZINA 2000, MIHINJAČ 2018). Ipak, usporedbom rezultata ovih istraživanja možemo primijetiti značajan pad brojnosti i fitnesa populacija.

Primjerice, MUŠOVIĆ I SUR. (2018) su proučavajući morfološke i ekološke značajke oštrulja u Buškom jezeru primijetili da se kroz godine smanjuje broj ulovljenih jedinki u istraživanjima, smanjuje im se prosječna masa i dužina, a primijećeno je i da se jedinke povlače u dijelove rezervoara povezane sa podzemnim vodama vjerojatno kako bi izbjegle predatore (invazivne vrste). Slično stanje uočava i MIHINJAČ (2018) proučavajući biološko-ekološke karakteristike populacija iz Krke, Čikole i Cetine. Dobiveni rezultati ukazuju na lošije kondicijsko stanje, manju duljinu tijela jedinki te manji reproduktivni uspjeh ženki oštrulja iz riječnih sustava što se navodi kao dodatni pokazatelj ekstremnih uvjeta i osjetljivosti istraživanih riječnih sustava i populacija.

KALAMUJIĆ STROIL I SUR. (2019) provode prvu procjenu genetičke strukture populacije na Buškom jezeru temeljenu na četiri mitohondrijska biljega i pet mikrosatelitnih lokusa. Dobiveni rezultati govore o trendu smanjenja genetičke raznolikosti ove populacije, ali zaključuju kako je ona za sada dovoljna da osigura njezino preživljavanje ukoliko se uklone prijetnje.

Pregledom dostupne literature jasno je da su potrebna daljnja istraživanja veličine i stanja populacija oštrulje. Stoga je ovo istraživanje usmjereno na opisivanje struktura populacija oštrulje u Hrvatskoj i BIH.

Glavni ciljevi ovog istraživanja su:

1. Opisivanje intraspecijske filogenetske strukture oštrulje
2. Opisivanje genske raznolikosti unutar pojedinih populacija oštrulje na pojedinim staništima
3. Opisivanje interpopulacijske strukture oštrulje procjenom protoka gena
4. Procjena veličine populacija/je
5. Identifikacija konzervacijskih prioriteta, odnosno populacija oštrulje koje su osobito važne za budući opstanak vrste (tzv. evolucijski značajne jedinice) na temelju rezultata genske raznolikosti, protoka gena i efektivne veličine populacija

2. Materijali i metode

2.1. Područje istraživanja

Kao što je već spomenuto, oštrulja nastanjuje izrazito mali areal u području dinarskog krša, a populacije nalazimo i u vodama stajaćicama (prirodna i umjetna jezera) i povremenim vodotocima poplavnih polja u kršu te u krškim rijekama. Međusobno ova su staništa povezana podzemnim vodotocima.

Stoga je u ovom istraživanju nastojano obuhvatiti sve tipove staništa. U ovom poglavlju dan je pregled istraživanog područja s naglaskom na nedavne promjene u vodnim režimima uzrokovane intenzivnom regulacijom vodotoka.

2.1.1. Rijeke Krka i Čikola

S potopljenim djelom ušća, rijeka Krka duga je 72,5 km, izvire na istočnom rubu Kninskog polja iz pećinskog vrela te se ulijeva u more kod Skradina. Glavni izvor rijeke Krke, smješten odmah ispod Topoljskog buka (podnožje Dinare) kojim završava rijeka Krčić. Uz njega rijeka Krka ima još 38 stalnih i povremenih vrela u svom porječju (CRKVENČIĆ I SUR. 1974).

Iznad samog izvora rijeke Krke izdiže se Topoljski buk (Krčić), a kanjon rijeke Krke ispresijecaju sedrene barijere, sa visokim slapovima; Bilušića buk, Manojlovački slapovi, najniža barijera slap Rošnjak, slap Brljan, Roški slap te zadnji u nizu, Skradinski buk, ukupnog pada 224 m. Krka je prirodni i krški fenomen, a sedreni slapovi temeljni su fenomen ove rijeke.

Velika koncentracija padova na maloj udaljenosti izrazito je pogodna za hidroenergetsko korištenje voda pa se na rijeci Krki nalazi nekoliko hidroelektrana (Miljacka, Jaruga, Golubić, Roški slap, Krčić). Većina hidroelektrana iskorištava prirodni pad rijeke Krke, a jedino jezero Brljan predstavlja umjetnu akumulaciju nastalu radi izgradnje brane za potrebe hidroelektrane Miljacka. Jezero Visovac najveće je ujezerenje na rijeci Krki. Dugačko je oko 12 km, a široko od 150 do 1500 m. Na početku Visovca nalazi se Roški slap visok 8,4 metra, a na kraju, nakon utoka rijeke Čikole, Skradinski buk.

Glavni pritoci rijeke Krke su joj rijeka Butišnica, Kosovčica i Čikola. Rijeka Čikola izvire u selu Mirlović Polje podno Svilaje te se nakon 47 km toka ulijeva u rijeku Krku iznad Skradinskog buka. Predstavlja glavni prtok rijeke Krke. U gornjem toku, od izvora do grada Drniša, Čikola protječe kroz Petrovo polje, dok je donji tok Čikole usječen u vrlo nepristupačan duboki kanjon (CRKVENČIĆ I SUR. 1974). Rijeka Čikola nije stalni vodotok, a voda se u koritu stalno zadržava samo u najnižem dijelu koji je spojen s rijekom Krkom, jezeru Torak.

Ihtiofauna rijeke Krke vrlo je bogata. Od 27 do sada zabilježenih slatkovodnih vrsta riba u rijeci Krki, 16 ih je autohtono, od čega 10 vrsta predstavljaju endeme ovog područja (ĆALETA I SUR. 2015). Međutim, u ovo jedinstveno područje uneseno je i 11 stranih vrsta. Primjerice *Esox lucius* Linnaeus 1758 (štuka), *Carassius gibelio* (Bloch 1782) (babuška), *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel 1846) (bezribica), *Lepomis gibbosus* (Linnaeus, 1758) (sunčanica) i *Gambusia holbrooki* Girard, 1859 (gambuzija), koje mogu vrlo štetno utjecati na autohtonu ihtiofaunu.

Zbog iznimnih prirodnih vrednota 24. siječnja 1985. proglašena je Nacionalnim parkom. Današnja granica Nacionalnog parka "Krka" proteže se 50 km uz gornji i srednji tok rijeke Krke (dva kilometra nizvodno od Knina pa do Skradina) i donji tok Čikole (obuhvaćajući ušće i 3,5 km kanjona rijeke), na prostoru gradova Knina, Drniša, Skradina i Šibenika i općina Ervenika, Kistanja i Promine.

Uzorci s rijeke Krke prikupljeni su na nekoliko lokaliteta: jezero Brljan, Krka manastir, Roški slap, jezero Visovac te na glavnom pritoku rijeci Čikoli.

Manastir sv. Arandžela (lokalitet: Krka manastir) smješten je na pitomom proširenju rijeke Krke zvanom Carigradska draga, na samoj sredini kanjona rijeke Krke, a po njemu je ovaj dio dobio ime Arandželovac.

2.1.2. Rijeka Cetina

Rijeka Cetina duga 100,5 km, a porječje se proteže na 1463 km² te kod Omiša utječe u Jadransko more. Izvire kraj Vrlike (sjeverni dio Cetinskog polja), iz krških vrela (Veliko vrilo, Vukovića vrilo, Batica vrilo) u podnožju Dinare. Glavni pritoci su joj Ruda-Grab i Karakašica. Cetinom dotječu i podzemne vode iz jugozapadnoga dijela BiH. Riječni bazen Cetine ima mnoštvo manjih rječica i izvora. Samo u širem području sela Hrvaca ima više od 50 izvora.

Duž Cetine nižu se Cetinsko, Vrličko, Koljansko, Ribaričko, Hrvatačko i Sinjsko polje. U donjem toku Cetina usijeca duboku, usku i neprohodnu dolinu gdje stvara slapove Veliku Gubavicu i Malu Gubavicu.

Na Cetini se također nalazi nekoliko hidroelektrana: Kraljevac, Peruća, Split, Orlovac i Đale.

Uzvodno od Hrvatačkoga polja nalazi se umjetno stvoreno akumulacijsko jezero Peruća (13 km²). Perućko jezero prvo je veliko umjetno jezero u krškom terenu i prva daljinska akumulacija elektroenergetskog sustava rijeke Cetine. Korisni obujam jezera vjerojatno značajno utječe na izravnavanje protoka Cetine na nizvodnim energetske stepenicama od Sinjskog polja do Jadranskog mora.

U gornjem toku žive *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758) (pijor) te endemi: *Squalius illyricus* Heckel & Kner, 1858 (ilirski klen), *Telestes ukliva* (HECKEL, 1843) (cetinska ukliva), *Chondrostoma phoxinus* Heckel, 1843 (podbila) i naravno oštrulja.

Rijeka je djelomice zaštićena; izvorišna vrela spomenik su prirode (od 1972 godine), a Značajni krajobraz Ruda obuhvaća izvori gornji kanjonski dio toka rječice Rude od Omiša uzvodno do Tisnih stina (8 km) (od 1963 godine).

Uzorci iz porječja rijeke Cetine prikupljeni su na spomenutoj rijeci Ruda te na Miloševom jezeru (u području sela Hrvaca).

2.1.3. Livanjsko i Duvanjsko polje

Livanjsko i Duvanjsko polje krška su polja koja zajedno s okolnim krškim poljima (Kupreško, Glamočko) čine sustav krških polja visokog dijela jugozapadne Bosne i Hercegovine.

Livanjsko polje, jedno je od najvećih krških polja u svijetu. Pruža se pravcem sjeverozapad-jugoistok s Buškim blatom (ili Buškim jezerom) na jugoistoku i Ždralovcem na sjeverozapadu. Dio je Završja (Tropolja). Prostire se između krških planina Dinare i Kamešnice na jugu, Tušnice na istoku, Cincara i Golije na sjeveru, te Šatora i Staretine na zapadu.

Polje ima površinu od 405 km². Pruža se u smjeru sjeverozapad-jugoistok u duljini od približno 65 km, prosječno široko 6 km (njegova najveća širina iznosi 12 km), te se nalazi prosječnoj visini od 720 metara iznad mora.

Livanjsko polje je najveće vlažno stanište u Bosni i Hercegovini sa značajnom populacijom rijetkih ptica. S obzirom da je polovina ovog polja redovno pod vodom, Livanjsko polje je ustvari sustav močvara izvanredne vrijednosti, važnog staništa za ptice, te tresetišta i livada, u kojima su nastanjene endemske i rijetke vrste. Od 2008. godine Livanjsko polje je označeno kao vlažno stanište od međunarodnog značaja u okviru Ramsarske konvencije.

Na samom se polju nalazi nekoliko zaostalih jezera među kojima su i Buško blato i jezero Mandek na kojima su prikupljeni uzorci.

Buško blato ili Buško jezero prirodni je nastavak Livanjskog polja. Smješteno je u jugoistočnom dijelu Livanjskog polja, u blizini granice s Hrvatskom. Izrađeno je 1974. godine kako bi se osigurala opskrba vodom za hidroelektranu Orlovac na Cetini čijem riječnom bazenu pripada. Djelomično se odvodi kroz podzemni sustav smješten na južnom i jugozapadnom dijelu rezervoara. Tijekom vremena, zbog uvođenjem stranih vrsta, onečišćenja i pretjerivanja u regulaciji vodnog režima, sastav i brojnost vrsta Buškog jezera su se promijenili (KALAMUJIĆ STROIL I SUR. 2019).

Mandek je jezero koje se nalazi ispod zapadnih obronaka planine Tušnice kod Livna, čija se kumulirana voda također koristi se za proizvodnju električne energije u hidroelektrani Orlovac na Cetini.

Kroz Livanjsko polje protječe nekoliko ponornica. Neke od njih su: Sturba, Žabljak, Bistrica, Brina, Plovuča, Jaruga, Ričina, a postoje i mnogi ponori, odnosno vrela.

Duvanjsko polje prostire se jugoistočno u nastavku Livanjskog polja, a dio je istog prirodnog fenomena. Obuhvaća 122 km², a nalazi se na 860 do 910 m nadmorske visine. Dugo je 20 km u smjeru Mesihovina - Mokronoge, a široko 12 km u smjeru Brišnik – Mandino.

Jedina rijeka Šujica je ponornica, dolazi kroz podzemlje iz Kupresa, izvire u mjestu Šujica, ponire u Kovačima (Ponor) te ponovno kao Ričina izvire u Prisoju, a danas puni jezero Buško jezero.

Uzorci su prikupljeni na kanjonskom dijelu rijeke Šujice oko 15 km od Tomislavgrada, najvećeg naselja na rubu Duvanjskog polja. Dio uzoraka također je prikupljen u okolnim vodotocima Tomislavgrada.

2.1.4. Mostarsko blato

Mostarsko blato također je dio prirodnog fenomena dinarskog krša. Smješteno je u zapadnoj Hercegovini, zapadno od Mostara. Nalazi se između ogranka Čabulje i Pologa (1138 m) na sjeveru i niže vapnenačke uzvisine Trtla (690 m) na jugu. Pruža se pravcem sjeverozapad-jugoistok na nadmorskoj visini između 220 i 245 metara. Površina mu iznosi 33,1 km².

Mostarskim blatom teče ponornica Lištica koja se na ulazu u polje razlijeva i taloži doneseni materijal, a na krajnjem jugoistoku nalazi se zablaceni dio polja s rubnom zonom ponora.

Mostarsko blato također ima neujednačeni vodni režim, karakterističan za poplavna polja u kršu. U vremenu 1941.-1947. godine, u cilju zaštite od velikih poplava u dolini rijeke Neretve, izgrađen je vodoprivredni tunel između Mostarskog blata i Bišća polja.

Krajem 1970-ih godina nastaje višenamjenski projekt korištenja Mostarskog blata koji je ujedinjavao zaštitu od poplava i korištenje akumulirane vode u proizvodnji električne energije, a 2010. godine u rad je puštena hidroelektrana Mostarsko blato, jugozapadno od grada Mostara.

2.2. Prikupljanje uzoraka

Uzorci su prikupljeni na 12 lokaliteta unutar 3 riječna sustava (Slika 2.). Tablica 1. prikazuje broj prikupljenih uzoraka po lokalitetu. Uzorci su prikupljeni od strane nekoliko ihtioloških timova metodom elektroribolova i lovom mrežama, u skladu s važećim zakonskim regulativama. Nakon ulova svakoj je jedinci odrezan komadić peraje te je tkivo pohranjeno u epruvetu s apsolutnim etanolom, a jedinke su neozlijeđene vraćene u prirodu. Po povratku s terena uzorci su zamrznuti.



Slika 2. Lokaliteti na kojima su prikupljeni uzorci. Pripadnost lokaliteta širem geografskom području označena je bojama. Plava- Rijeka Krka i porječje. Zelena- rijeka Cetina i uže porječje. Tamnosmeđa- Duvanjsko polje. Svjetlosmeđa- Livanjsko polje. Žuto- lokalitet Mostarsko blato.

Tablica 1. Broj i naziv prikupljenih uzoraka po lokalitetu.

LOKALITET	RIJEČNI BAZEN	UZORAK	BROJ UZORAKA
Jezero Brljan	Krka	AUBR1-7	7
Krka, manastir	Krka	AUKR1-7	7
Roški slap	Krka	AURS1-8	8
Jezero Visovac	Krka	AUVI1-14	14
Čikola (Čavoglave, zaselak Cerje)	Krka	AUČI1-9	9
Rijeka Ruda	Cetina	AURU1-3	3
Miloševo jezero	Cetina	AUMJ1-9	9
2 km od Tomislavgrada (Duvanjsko polje)	Cetina	AUHU1-20, C482, C484	22
Rijeka Šujica (Duvanjsko polje)	Cetina	BOS998-999	2
Jezero Mandek (Livanjsko polje)	Cetina	C641, C643	2
Buško blato (Livanjsko polje)	Cetina	BOS965	1
Mostarsko blato	Neretva	C1003-1004	2
UKUPNO:			86

Lokaliteti: Tomislavgrad i rijeka Šujica u Duvanjskom polju te jezero Mandek i Buško blato u Livanjskom polju pripadaju riječnom bazenu Cetine, ali u daljnjem tekstu će uz imena ovih lokaliteta će biti navedeno u kojem se krškom polju nalaze kako bi se istaknula razlika između staništa rijeke Cetine koja obuhvaćaju uže porječje ove rijeke i krških polja koje poplavljuje.

2.3. Izolacija DNA

Ukupnu genomsku DNA iz svakog komadića peraje izolirala sam pomoću (DNeasy Blood & Tissue kompleta kemikalija tvrtke QIAGEN) prema protokolu proizvođača. Uzorcima tkiva u eprueticama dodala sam 180 μ L pufera ATL i 20 μ L protein kinaze. Sadržaj svake eprueticke promiješala sam *vortex* miješalicom, a zatim sam ih ostavila 24 h u vodenoj kupelji na 56 °C. Nakon vađenja eprueticke iz kupelji, njihov sadržaj ponovo sam promiješala *vortex* miješalicom. Zatim sam u svaku eprueticu dodala 200 μ L pufera AL te 200 μ L etanola (96%). Sadržaj eprueticke potom sam prebacila u eprueticke s kolonom (*pipet spin column*) te centrifugirala na 8000 rpm 1 minutu. Nakon toga, kolone sam prebacila u nove eprueticke u koje sam dodala 500 μ L pufera AW1 te ponovila centrifugiranje pod istim uvjetima. Kolone sam ponovo prebacila u nove eprueticke u koje sam dodala 500 μ L pufera AW2, a zatim sam njihov sadržaj centrifugirala na 14 000 rpm 3 minute. Potom sam posljednji put prebacila kolone u nove eprueticke u koje sam dodala 150 μ L pufera AE za čije je elucijsko djelovanje je potrebno pričekati minutu. Nakon 1 minute sadržaj svake eprueticke sam centrifugirala na 8000 rpm 1 minutu. Uzorke sam označila kodovima te pohranila u zamrzivač.

2.4. Umnažanje lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Iz dobivenog DNA izolata umnožila sam određeni odsječak DNA PCR reakcijom za genski biljeg citokrom *b* (*cyt b*) i kontrolnu regiju (CR).

2.4.1. PCR protkol za biljeg citokrom *b* (*cyt b*)

Za lančanu reakciju polimerazom (PCR) gena za citokrom *b* (*cyt b*) koristila sam početnice ThrR (5'ACCTCCGATCTTCGGATTACAAGACCG3') i GluF (5'AACCACCGTTGTATTCAACTACAA3') sintetizirane u servisu MacroGen Europe.

Za PCR reakcije **ukupnog volumena 25 µL** koristila sam:

- 1. 12,5 µL** mješavine kemikalija iz „HotStarTaq *Plus* Master Mix“ kompleta kemikalija tvrtke QIAGEN koji sadrži optimiziranu mješavinu:
 - HotStarPlus DNA polimeraze
 - MgCl₂ (magnezijevog klorida)
 - dNTP-ova (deoksinukleotida)
 - PCR pufer (koji ima optimiziranu kombinaciju soli i dodataka tako da osigura učinkovito vezanje i produljenje početnica u reakciji)
- 2. 8,5 µl** mješavine početnica koja sadrži:
 - 2 µl svake početnice (ukupno 4 µl)
 - 2 µl pročišćene vode
 - 2,5 µl kemikalije „CoralLoad Concentrate“ (koja sadrži reagens za punjenje agaroznog gela i dvije vrste boje) također iz „HotStarTaq *Plus* Master Mix“ kompleta kemikalija tvrtke QIAGEN
- 3. 4 µl** izolata DNA

Uvjeti izvođenja PCR (temperatura i trajanje svakog koraka, te broj ciklusa) bili su slijedeći: početna aktivacija polimeraze pri 94 °C na 180 s, 35 ciklusa denaturacije pri 94°C po 45 s, renaturacija (spajanje početnica) hlađenjem na 48°C od 90 s, produžavanje početnica na 72°C od 105 s te završno produžavanje umnoženih sljedova DNA pri 72 °C od 7 min.

2.4.2. PCR protokol za biljeg kontrolne regije (CR)

Za lančanu reakciju polimerazom (PCR) mitohondrijske kontrolne regije (CR) koristila sam početnice L15923 (5'TTAAAGCATCGGTCTTGTA3') i H16500 (5'GCCCTGAAATAGGAACCGA3') sintetizirane u servisu MacroGen Europe.

U izradi PCR reakcijske smjese izuzev drugih početnica, koristila sam isti komplet kemikalija i jednake omjere kao i za biljeg *cyt b*, kako je opisano u prethodnom ulomku.

Uvjeti izvođenja PCR (temperatura i trajanje svakog koraka, te broj ciklusa) bili su sljedeći: početna aktivacija polimeraze pri 94 °C na 180 s, 35 ciklusa denaturacije pri 94°C po 45 s, renaturacija (spajanje početnica) hlađenjem na 48°C od 90 s, produžavanje početnica na 72°C od 105 s te završno produžavanje umnoženih sljedova DNA pri 72 °C od 7 min.

2.5. Elektroforeza na agaroznom gelu

Uspješnost PCR reakcija za oba biljega provjerena je elektroforezom 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.

2.6. Pročišćavanje i određivanje primarne strukture nukleotida

Pročišćavanje i određivanje primarne strukture nukleotida (sekvenciranje) PCR produkata provedeno je u servisu Macrogen Europe. U *Tablici 2.* prikazane su početnice korištene u PCR reakcijama i prilikom sekvenciranja.

Tablica 2. Početnice za PCR i sekvenciranje

GEN	Početnice za PCR	Početnice za sekvenciranje
Cyt <i>b</i>	ThrR (MACHORDOM I DOADRIO 2001) (5'ACCTCCGATCTTCGGATTACAAGACCG3')	CB4-GW (5'CCTGAAAYATYGGYGTRGT3')
	GluF (MACHORDOM I DOADRIO 2001) (5'AACCACCGTTGTATTCAACTACAA3')	Phox-Thr (5'AGGAGGAARTGRAATGCGAA3')
CR	L15923 (IGUCHI I SUR. 1997) (5'TTAAAGCATCGGTCTTGTA3')	L15923 (IGUCHI I SUR. 1997) (5'TTAAAGCATCGGTCTTGTA3')
	H16500 (INOUE I SUR. 2000) (5'GCCCTGAAATAGGAACCAGA3')	H16500 (INOUE I SUR. 2000) (5'GCCCTGAAATAGGAACCAGA3')

2.7. Računalna obrada

Dobivene sekvence prije svega ručno su sravnjene u programu Bioedit (verzija 7.0.4.1.(2/13/05)) i vizualno provjerene. Kao kontrolne sekvence korištene su sekvence iz banke gena NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Kako bi se utvrdio broj haplotipovima u uzorcima korišten je program DNAsp (verzija 6.12.03 x64).

2.7.1. Filogenetske rekonstrukcije za biljeg *cyt b*

Filogenetske rekonstrukcije provedene su koristeći tri metode: metoda najveće parsimonije (MP) i metoda najveće vjerojatnosti (ML) u programu PAUP (verzija 4.0b10) te metoda susjednog povezivanja (MJ) u programu Network (verzija 4.5.1.6. software (Fluxus Technology Ltd.)).

Početne postavke MP i ML analize uključivale su postavljanje postavki maksimalnog broja stabla na 200 s automatskim povećanjem za 100 ukoliko je limit dostignut. Za ukorijenjivanje stabla unaprijed je definirana vanjska grupa za koju je korištena vrsta *Barbus barbus* (Linnaeus, 1758) preuzeta iz Banke gena (pristupni broj: AF090781.1).

MP analiza provedena je heurističkim modelom pretraživanja uz 100 ponavljanja, uz nasumičan redoslijed unošenja svojti, preklapanjem grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem (TBR, eng. *tree bisection-reconnection*). Tom se metodom traži stablo najkraće topologije preraspodjelom 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 1000 BS ponavljanja i 10 replika dodatnih sekvenci.

ML analiza provedena je heurističkim modelom pretraživanja sa 10 početnih ponavljanja, nasumičnim redoslijedom unosa svojti, preklapanjem grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem (TBR). Sva mjesta kodona, kao i sve nukleotidne supstitucije, imala su jednaku težinu. Podržanost grananja utvrđena je analizom samopodržanja uz 500 BS ponavljanja i 10 replika dodatnih sekvenci.

S obzirom da smo analizirali filogenetske odnose haplotipova iste vrste dodatno je korištena MJ u programu Network (verzija 10.1.0.0. Flexus Technology Ltd.). Naime, MJ metoda konstruira filogenetsku mrežu jer omogućuje vizualizaciju filogenetskih odnosa među blisko povezanim haplotipovima, zajedno s alternativnim scenarijima, te razmatra prisutnost ancestralnih haplotipova u novijoj genetskoj strukturi.

2.7.2. Filogenetske rekonstrukcije za biljeg CR

Filogenetičke rekonstrukcije pomoću markera CR također su uključivale tri metode: MP, ML i MJ. Međutim, u analizama korištene su samo sekvence izolirane u ovom istraživanju. Naime, izolirane sekvence duže su od svih sekvenca kontrolne regije iz banke gena i sadrže tri polimorfna mjesta (431., 438., 440.) više. Stoga sam pretpostavila da će biti više informativne. Postavke MP i ML analize bile su jednake kao i za marker *cyt b*, s iznimkom prethodnog definiranja vanjske grupe kroz sekvencu srodne vrste.

U početnim pokušajima ukorijenjivanja ML stabla unaprijed definiranim vanjskim grupama *Barbus barbuis* (Linnaeus, 1758) (pristupni broj: MG717979.1) i *Ciprinus carpio* Linnaeus, 1758 (pristupni broj: AY597976.1) sekvencama iz NCBI banke gena zbog prevelike razlike u sekvencama dobivena su stabla koja nisu bila informativna. Stoga je stablo ukorijenjeno metodom vanjske grupe koja nije bila unaprijed definirana već je odabrana između analiziranih uzoraka proučavane vrste.

Koristeći metodu susjednog sparivanja (MJ) u programu Network dodatno je konstruirana i filogenetska mreža haplotipova kao i za biljeg *cyt b*.

2.7.3. Intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost te interspecijska različitost

Koristeći program DnaSP izračunate su sljedeće mjere intrapopulacijske genetske raznolikosti za oba biljega: broj polimorfni mjesta (S), raznolikost haplotipova (H_d), prosječni broj razlika nukleotida (k), raznolikost nukleotida (p).

U programu MIGRATE metodom Bayesove inferencije izračunate su vrijednosti Θ , M (eng. mutation scaled immigration rate). Kao vrijednost stopa mutacije (μ) korištena je standardna vrijednost za ciprinide ($\mu=0,0000023$). Prema formuli $N_m=M*\Theta$ izračunat je broj migranata po generaciji (N_m), a efektivne veličine populacija (N_e) prema formuli $N_e= \Theta/ \mu$ u programu Excel 2013 (Microsoft Office paketa).

3. Rezultati

3.1. Rasprostranjenost i raznolikost haplotipova *cyt b*

Sljedeći opisanu metodologiju uspješno sam izolirala svih 1141 pb (parova baza) gena za *cyt b* od 83 uzorka. Uz njih sam u analizama smo koristila i tri sekvence iz Banke gena (pristupni broj KU869778, AF287416, AF287415) jednake duljine. U dobivenim sekvencama nisam pronašla niti jednu inserciju ili deleciju. *Tablica 3.* pokazuje rasprostranjenost haplotipova biljega *cyt b* po lokalitetima. Od ukupnog uzorka od 86 sekvenca identificirala sam 13 haplotipova, ukupne raznolikosti (H_d) 0,518. Od 13 haplotipova, tri su od prije poznata (MACHORDOM i DOADRIO 2001, KALAMUJIĆ STROIL I SUR. 2019.), a 10 je novih, po prvi puta identificirano. Većina uzoraka (59) pripada haplotipu AUL1. Veliki broj haplotipova (9) predstavljen je samo s jednim uzorkom (AULO, AUL3, AUL6-12). Zanimljivo je i da u vodotocima kraj Tomislavgrada (Duvanjsko polje) nalazimo čak tri haplotipa koja ne nalazimo niti na jednom drugom lokalitetu, a to su AUL6, AUL7 i AUL8. Isto vrijedi i za Buško blato na kojem također nalazimo tri haplotipa koja ne nalazimo niti na jednom drugom lokalitetu, a to su AULO, AUL11 i AUL12. Sva tri navedena haplotipa čine sekvence iz Banke gena. Uz njih smo na Buškom blatu pronašli i jedan novi haplotip, AUL4, koji u prijašnjem istraživanju (KALAMUJIĆ STROIL I SUR. 2019) nije pronađen na ovom lokalitetu.

Na nekoliko lokaliteta riječnog bazena Krke (Brljan, Čikola, Krka manastir) i Miloševom jezero (Cetina) pronalazimo samo haplotip AUL1. Na lokalitetu jezero Mandek (Livanjsko polje) također pronalazimo samo jedan haplotip, AUL4. Međutim s ovoga lokaliteta prikupljena su samo dva uzorka pa je možda stvarni broj nešto veći. Najveći broj haplotipova (5) pronađen je u vodotocima kraj Tomislavgrada (Duvanjsko polje) od čega najviše uzoraka pripada haplotipu AUL1. Međutim važno je uočiti da je ovaj lokalitet predstavljen s najvećim brojem uzoraka, čak 20. Za razliku od njega lokalitet jezero Visovac (Krka) također je predstavljen s velikim brojem uzoraka, njih 14, ali na ovom lokalitetu pronađena su samo dva haplotipa od kojih ponovno dominira AUL1.

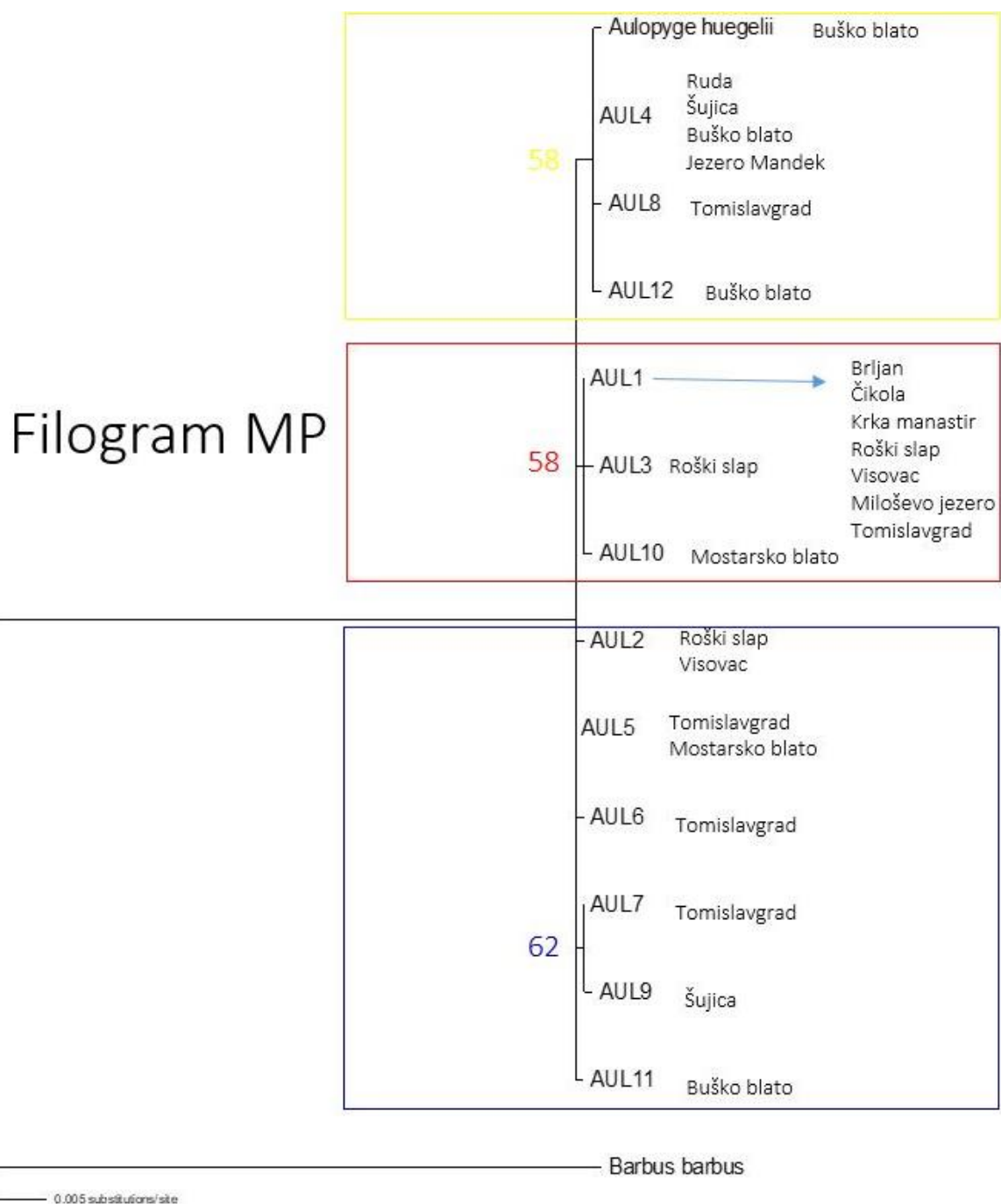
Tablica 3. Haplotipovi *cyt b* po lokalitetu.

LOKALITETI	HAPLOTIP													Broj uzoraka
	A U L O	AUL 1	AUL 2	AUL 3	AUL 4	AUL 5	AUL 6	AUL 7	AUL 8	AUL 9	AUL1 0	AUL11	AUL 12	
Jezero Brljan	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Rijeka Čikola	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
Krka manastir	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Roški slap	0	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
Miloševo jezero	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Rijeka Ruda	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Jezero Visovac	0	12	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
Tomislavgrad	0	11	0	0	0	6	1	1	1	0	0	0	0	20
Jezero Mandek	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Mostarsko blato	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	4
Rijeka Šujica	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Buško blato	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	4
Broj sekvenci	1	59	4	1	5	9	1	1	1	1	1	1	1	86

Zeleno - banka gena. Narančasto - izolirane sekvence.

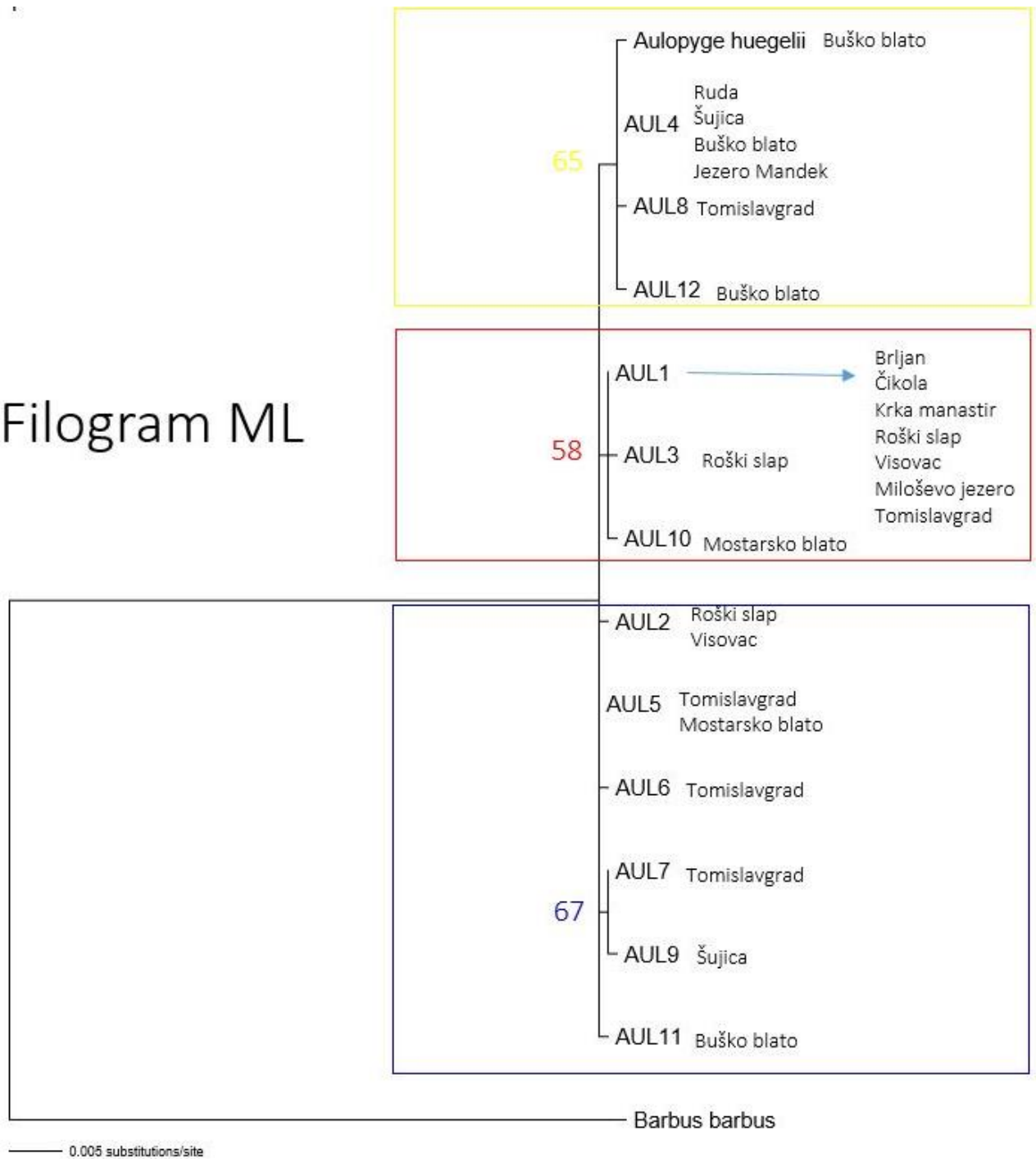
3.2. Filogenetske rekonstrukcije na temelju biljega *cyt b*

MP i ML analize rezultirale su filogramima iste topologije (Slika 3. i 4.), i slične, ali umjerene podržanosti grana. Na filogramima su bojama istaknute tri grupe. Filogrami pokazuju meku politomiju (kratke grane) što nam govori nam o rapidnoj diferencijaciji haplotipova. Također, na prvi pogled nije uočljiva grupacija prema geografskom obrascu rasprostranjenosti haplotipova. Podgrupu s najvećom podržanosti grana u obje analize čine haplotipovi AUL7 i AUL9 pronađeni samo na lokalitetima Tomislavgrad i rijeka Šujica u Duvanjskom polju.



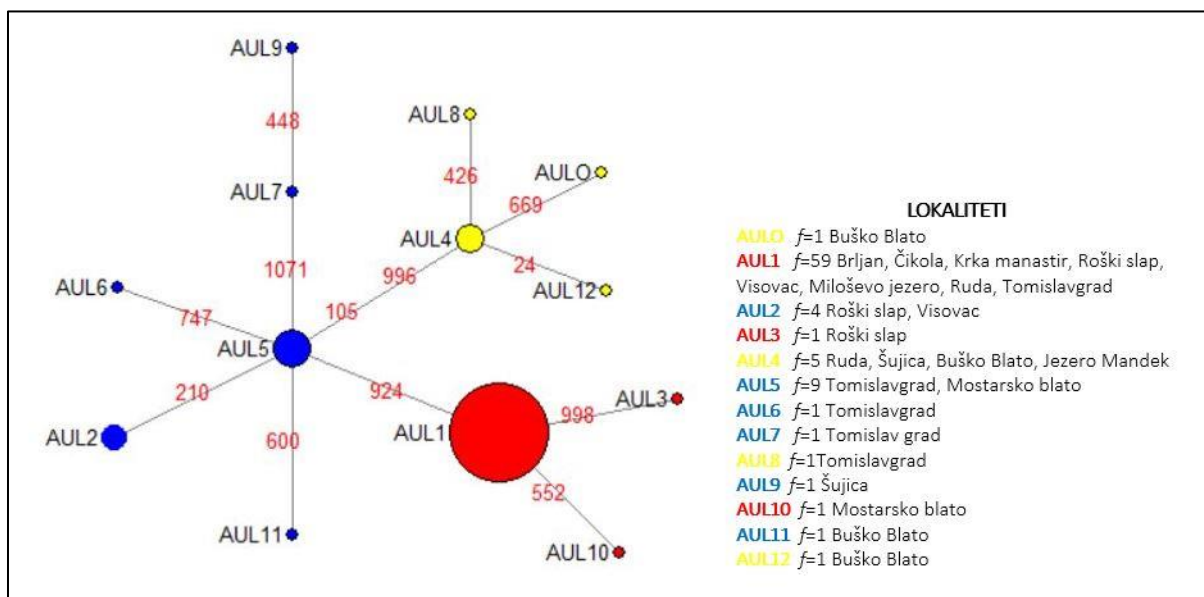
Slika 3. Filogram MP za cyt b haplotipove. Pored naziva haplotipova nalaze se lokaliteti na kojima su pronađeni. Brojevi na čvorovima predstavljaju MP podržanost.

Filogram ML



Slika 4. Filogram ML *cyt b* haplotipova. Pored naziva haplotipova nalaze se lokaliteti na kojima su pronađeni. Brojevi na čvorovima predstavljaju ML podržanost.

Mreža haplotipova dobivena MJ algoritmom (Slika 5.) pokazuje istu strukturu tj. jasno su odvojene tri grupe sa haplotipovima AUL1 (crveno), AUL4 (žuto), AUL5 (plavo). Zvezdasti uzorak navedenih haplotipova govori nam da su oni vjerojatno ancestralni. Također, jasno je vidljivo i grananje haplotipa AUL9 iz AUL7 kao i u MP i ML analizama. Proučavajući pretpostavljene ancestralne haplotipove AUL1, AUL4 i AUL5 primjećujemo da se uzorci grupiraju prema geografskom obrascu rasprostranjenosti. AUL1 dominira u lokalitetima na rijeci Krki, nalazimo ga i u Miloševom jezeru i rijeci Rudi (Cetina), ali i u Duvanjskom polju kraj Tomislavgrada. AUL4 nalazimo pretežito u lokalitetima iz Livanjskog i Duvanjskog polja, a s jednim uzorkom zastupljen je i u Rudi (Cetina). Haplotip AUL5 nalazimo samo južnije s najvećim brojem uzoraka u Duvanjskom polju kraj Tomislavgrada, ali i u najjužnijem lokalitetu tj. u Mostarskom blatu. Međutim, proučavajući ostale haplotipove pojedine grupe ne uočavamo isti obrazac tj. gledajući čitave grupe nije uočljivo da se uzorci grupiraju prema geografskoj rasprostranjenosti. Primjerice, haplotipove crvene grupe nalazimo pretežito u Krki, ali i u Cetini i Duvanjskom polju pa sve do najjužnijeg lokaliteta, Mostarskog blata. Haplotipove plave grupe također pronalazimo od najjužnijeg Mostarskog blata, preko Duvanjskog i Livanjskog polja pa sve do Krke, s iznimkom rijeke Cetine. Jedino haplotipove žute grupe nalazimo samo u lokalitetima Livanjskog i Duvanjskog polja, a s jednim uzorkom zastupljeni su i u rijeci Rudi (Cetina).



Slika 5. MJ mreža *cyt b* haplotipova. Predstavlja srodstvene veze između haplotipova. Veličina čvorova proporcionalna je frekvenciji haplotipova. Brojevi na granama predstavljaju mutiranu poziciju na genu.

3.3. Rasprostranjenost i raznolikost haplotipova CR

Sljedeći opisanu metodologiju uspješno smo umnožili i sravnili 440 pb kontrolne regije mitohondrijske DNA iz 37 uzoraka. U dobivenim sekvencama nije pronađena niti jedna insercija ili delecija. Izolirane sekvence duže su od svih sekvenca kontrolne regije iz Banke gena i sadrže tri polimorfna mjesta (431., 438., 440.) više. Stoga su u analizama korištene samo sekvence izolirane u ovom istraživanju. *Tablica 4.* prikazuje haplotipove pronađene po lokalitetima. U ukupnom uzorku dobivenih sekvenci identificirano je 11 haplotipova ukupne raznolikosti (Hd) 0,824. Većina uzoraka pripada haplotipovima HUE1 (13) i HUE2 (8). Nekoliko haplotipova HUE3, HUE6, HUE7 predstavljeno je samo s jednim uzorkom i to na lokalitetima Krka manastir, rijeka Čikola, jezero Visovac, te vodotoci u okolici Tomislavgrada (HUE10 i 11). U ovom slučaju kraj Tomislavgrada nalazimo manji broj haplotipova koja ne nalazimo niti na jednom drugom lokalitetu, a to su spomenuti HUE10 i HUE11. Na jezeru Visovac također nalazimo haplotip HUE7, na Miloševom jezeru haplotip HUE8, na rijeci Čikoli haplotip HUE6 i na lokalitetu Krka manastir haplotip HUE3, koje ne nalazimo na drugim lokalitetima. Najveći broj različitih haplotipova ovaj puta nalazimo na lokalitetima na Krki, Roški slap i jezero Visovac, a oba imaju po 4 haplotipa. Za jezero Visovac to je vjerojatno i očekivano s obzirom da je lokalitet predstavljen s najviše uzoraka.

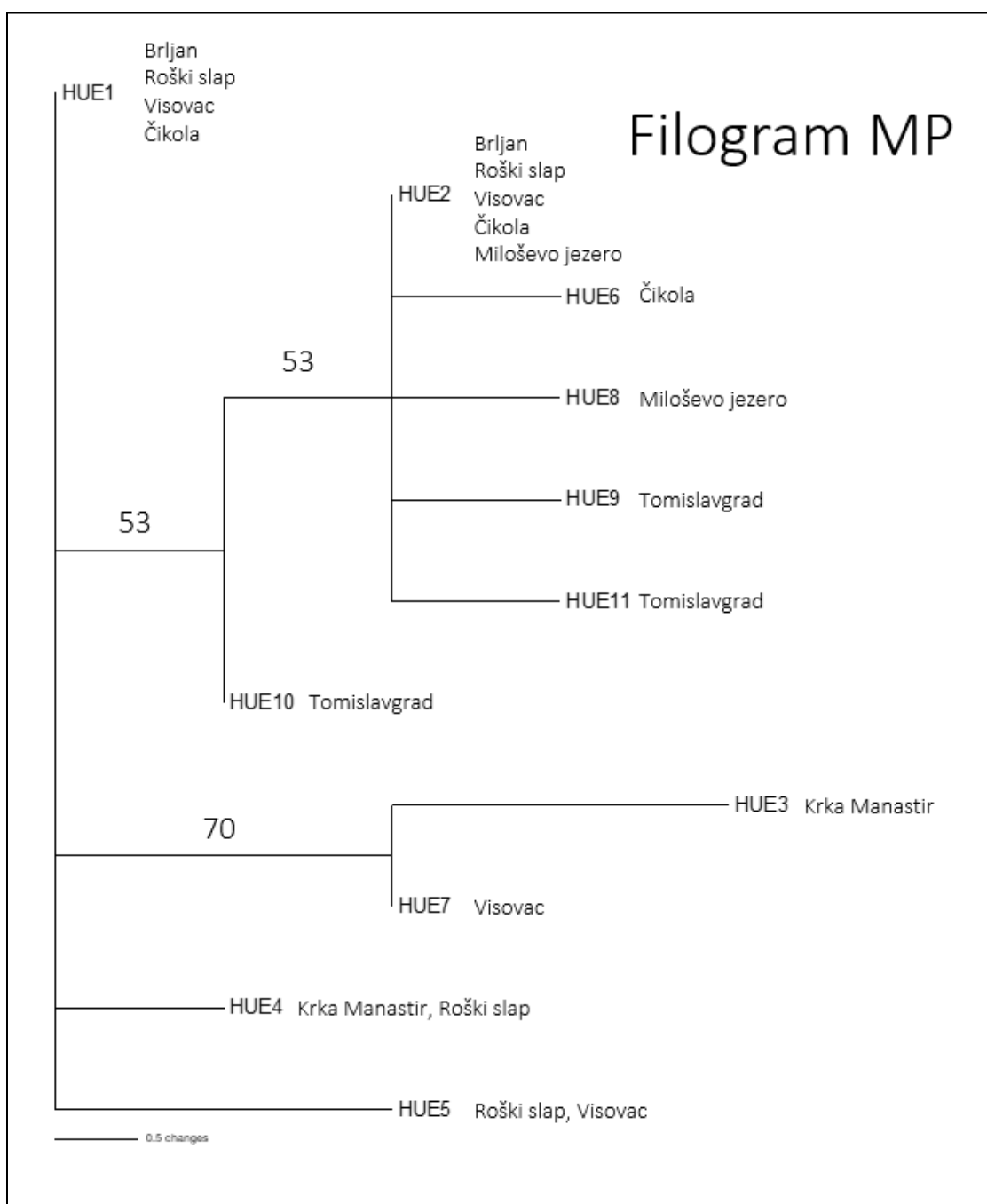
Tablica 4. Haplotipovi CR po lokalitetu.

Lokaliteti	HUE 1	HUE 2	HUE 3	HUE 4	HUE 5	HUE 6	HUE 7	HUE 8	HUE 9	HUE10	HUE11	Broj uzoraka
Jezero Brljan	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Rijeka Čikola	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5
Krka, manastir	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	4
Roški slap	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	5
Miloševo jezero	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3
Jezero Visovac	6	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	10
Tomislavgrad	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	5
Broj sekvenci:	13	8	1	4	2	1	1	2	3	1	1	37

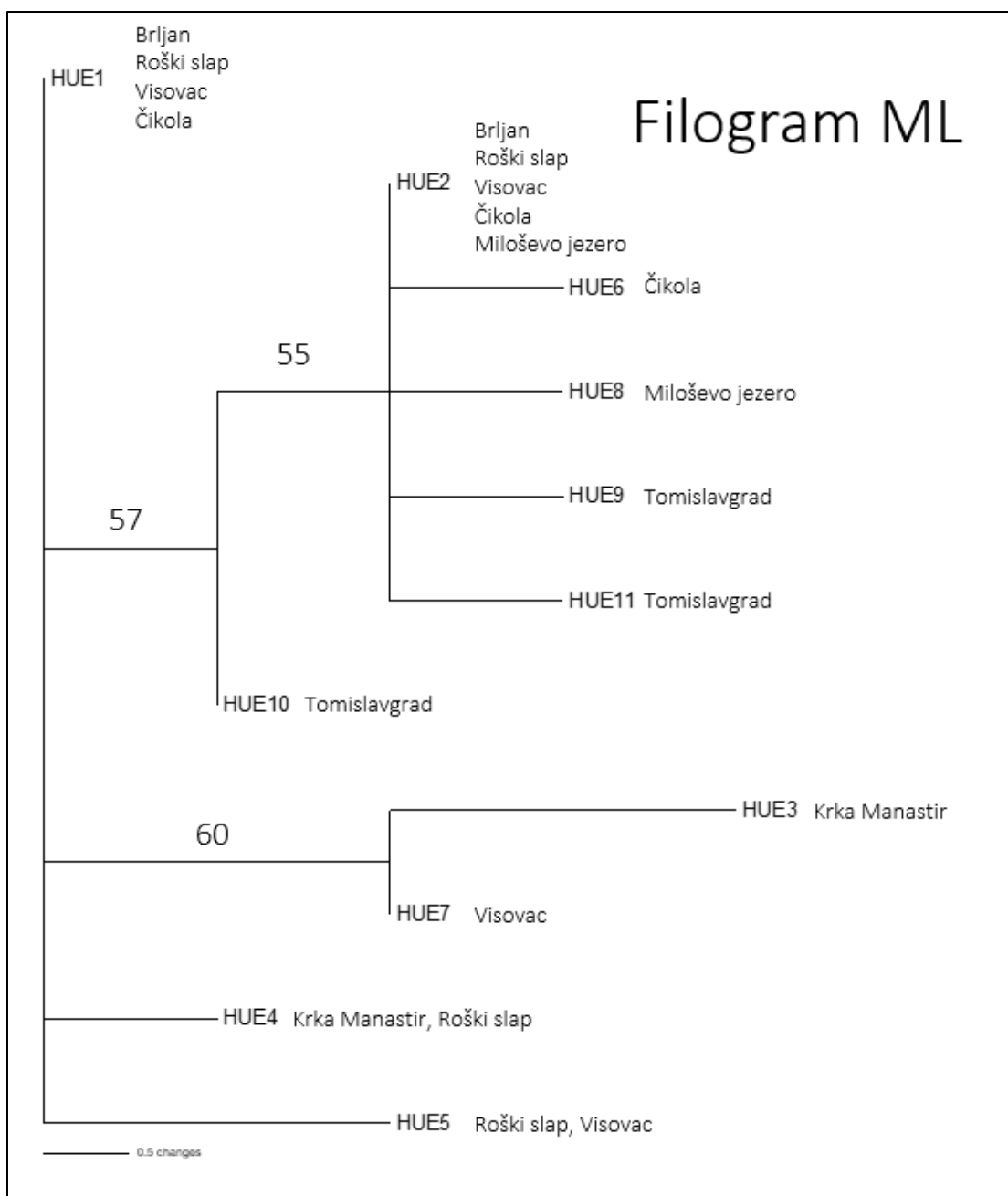
Narančasto- izolirane sekvence

3.4. Filogenetske rekonstrukcije na temelju biljega CR

MP i ML analize dale su filograme iste topologije (*Slika 6. i 7.*), i slične, ali slabe podržanosti grana. S obzirom da filogrami nisu ukorijenjeni uz pomoć stvarne vanjske grupe (druga, ali srodna vrsta), vremenski okvir odvajanja vrsta nije jasno vidljiv. Također, nije uočljivo da se haplotipovi grupiraju u skladu s njihovom geografskom rasprostranjenošću. Grupu s najvećom podržanošću grane u ovom slučaju čine haplotipovi HUE3 i HUE7 koji pripadaju lokalitetima jezero Visovac i Krka manastir, na rijeci Krki.

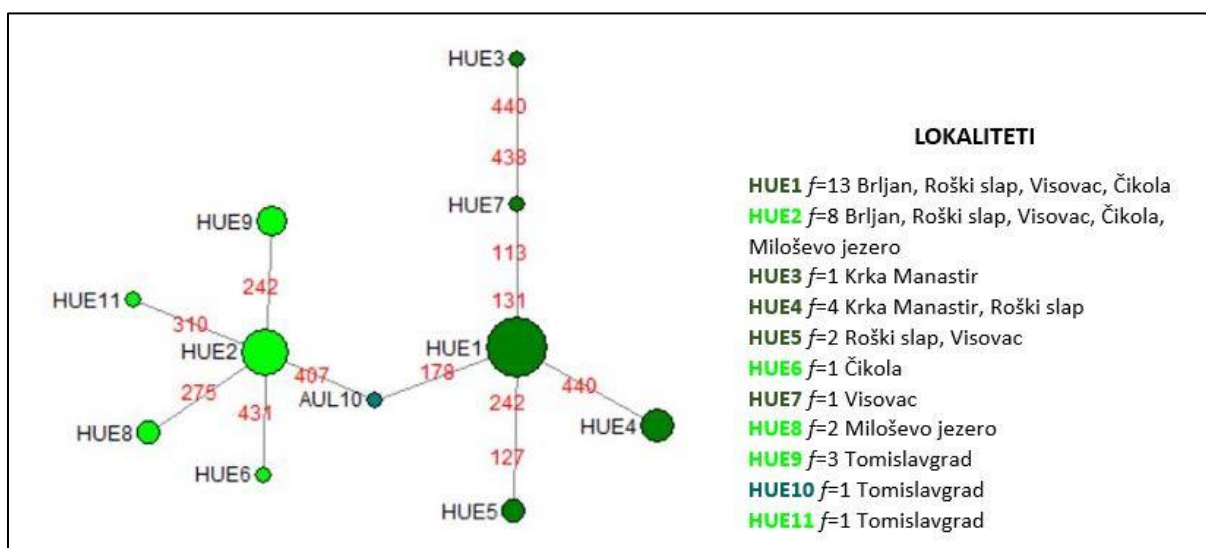


Slika 6. **Filogram MP haplotipova CR.** Pored naziva haplotipova nalaze se lokaliteti na kojima su pronađeni. Brojevi na čvorovima predstavljaju MP podržanost.



Slika 7. Filogram ML haplotipova CR. Pored naziva haplotipova nalaze se lokaliteti na kojima su pronađeni. Brojevi na čvorovima predstavljaju ML podržanost.

Mreža haplotipova dobivena MJ algoritmom (Slika 8.) u ovom slučaju bolje vizualizira filogenetsku strukturu haplotipova od filograma dobivenih MP i ML algoritmima. Zvezdasta struktura haplotipova HUE1 i HUE2 ukazuje da bi oni mogli biti ancestralni a iz njih se odvajaju dvije grupe (svijetlozelena i tamnoz zelena). Pretpostavljeni ancestralni haplotipovi HUE1 i HUE2 nalaze se samo u lokalitetima na rijekama Krka i Cetina, dok je haplotip koji ih spaja predstavljen samo s jednim uzorkom i nalazimo ga samo kraj Tomislav grada u Duvanjskom polju. Također jasno je vidljivo i grananje haplotipa HUE3 iz HUE7 unutar tamnoz zelene grupe čija je srodnost najbolje podržana i u MP i ML analizama. Haplotipovi koje svaka grupa sadrži nisu grupirani prema geografskom obrascu uzoraka koji ih predstavljaju.



Slika 8. MJ mreža haplotipova kontrolne regije. Predstavlja srodne veze između haplotipova. Veličina čvorova proporcionalna je frekvenciji haplotipova (f). Brojevi na granama predstavljaju mutiranu poziciju na genu. Uočljive su dvije grupe. Tamnoz zelena grupa sadrži samo haplotipove pronađene sjevernije tj. u rijeci Krki i njenom pritoku Čikoli. Svijetlozelena grupa sadrži haplotipove sa svih proučavanih lokaliteta.

3.5. Intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost te interspecijska različitost

3.5.1. Mjere genskog polimorfizma prema cyt *b* biljegu

Mjere intrapopulacijskog genskog polimorfizma otkrivaju nam različite vrijednosti genetičke raznolikosti između populacija (*Tablica 5.*)

*Tablica 5. Intrapopulacijska raznolikost prema cyt *b* biljegu.*

Lokalitet	Riječni bazen	n	S	Eta	h	Hd	Pi	k
Sve sekvence		86	13	13	13	0,518	0,00095	1,08
Brljan	Krka	7	0	0	1	0	0	0
Čikola	Krka	8	0	0	1	0	0	0
Krka manastir	Krka	6	0	0	1	0	0	0
Roški slap	Krka	8	3	3	3	0,607	0,00097	1,107
Visovac	Krka	14	2	2	2	0,264	0,00046	0,527
Miloševo jezero	Cetina	9	0	0	1	0	0	0
Ruda	Cetina	2	3	3	2	1	0,00263	3
Tomislavgrad	Duvanjsko polje	20	6	6	5	0,632	0,00089	1,021
Šujica	Duvanjsko polje	2	4	4	2	1	0,00351	4
Buško jezero	Livanjsko polje	4	5	5	4	1	0,00219	2,5
Jezero Mandek	Livanjsko polje	2	0	0	1	0	0	0
Mostarsko blato		4	2	2	2	0,5	0,00088	1

U tablici **n** označava broj analiziranih sekvenci, **S** broj polimorfni mjesta, a **h** broj pronađenih haplotipova po lokalitetu. **Mjere intrapopulacijskog genskog polimorfizma** su: **Eta**-ukupan broj mutacija, **Hd**-raznolikost haplotipova, **Pi**-nukleotidna raznolikost, **k**-prosječni broj nukleotidnih razlika.

Ukupna raznolikost haplotipova je umjerena ($Hd=0,518$). Ukupne vrijednosti nukleotidne raznolikosti ($Pi=0,00095$) i prosječnog broja nukleotidnih razlika ($k=1,08$) također govore u prilog umjerenosti genetičkoj raznolikosti oštrulje, s obzirom da proučavano područje obuhvaća cijeli areal rasprostranjenosti. Međutim razlike između pojedinih područja (riječnih bazena) i lokaliteta su velike. Na pojedinim lokalitetima rijeke Krke (Brljan, Čikola, Krka manastir) te na lokalitetu Miloševo jezero (Cetina) pronađen je samo haplotip AUL1, tj. vrijednosti svih mjera su jednake nuli. Slična situacija je i na lokalitetu jezero Mandek u Livanjskom polju, ali broj uzoraka s ovog lokaliteta znatno je manji pa rezultati možda ne predstavljaju stvarnu sliku genetičke raznolikosti s ovog lokaliteta. Također, još jedan lokalitet sa Krke, jezero Visovac pokazuje izrazito niske vrijednosti (primjerice $Hd=0,264$).

Za razliku od dosad spomenutih lokaliteta, vrijednosti koje pokazuju populacije s lokaliteta Roški slap (Krka) i Tomislavgrad (Duvanjsko polje), nešto su veće čak i od ukupnih vrijednosti za sve proučavane lokalitete, a vrijednosti populacija sa lokaliteta rijeka Ruda (Cetina), Šujica (Duvanjsko polje) i Buško blato (Livanjsko polje) skoro su dva puta veće od ukupnih vrijednosti. Lokalitet Mostarsko blato u riječnom bazenu Cetine pokazuje umjerene vrijednosti vrlo slične ukupnim vrijednostima svih proučavanih lokaliteta. Važno je naglasiti kako su i s ovog lokaliteta, zajedno sa spomenutim lokalitetima s rijeke Cetine (rijeka Ruda, Miloševo jezero) uspješno prikupljena samo dva uzorka pa dobivene mjere možda ne odražavaju stvarnu sliku genetičke raznolikosti populacija s ovih lokaliteta.

3.5.2. Mjere genskog polimorfizma prema CR biljegu

Mjere intrapopulacijskog genskog polimorfizma i u slučaju kontrolne regije, otkrivaju nam različite vrijednosti genetičke raznolikosti između populacija (*Tablica 6.*)

Tablica 6. Intrapopulacijska raznolikost prema CR biljegu.

Lokalitet	Slijev	n	S	Eta	h	Hd	Pi	k
Sve sekvence		37	11	11	11	0,824	0,00469	2,063
Jezero Brljan	Krka	5	2	2	2	0,4	0,00182	0,8
Rijeka Čikola	Krka	5	3	3	3	0,7	0,00273	1,2
Krka manastir	Krka	4	3	3	2	0,5	0,00341	1,5
Roški slap	Krka	5	5	5	4	0,9	0,00455	2
Jezero Visovac	Krka	10	6	6	4	0,644	0,00343	1,511
Miloševo jezero	Cetina	3	1	1	2	0,667	0,00152	0,667
Tomislavgrad	Duvanjsko polje	5	3	3	3	0,7	0,00318	1,4

U tablici **n** označava broj analiziranih sekvenci, **S** broj polimorfničkih mjesta, a **h** broj pronađenih haplotipova po lokalitetu. **Mjere intrapopulacijskog genskog polimorfizma** su: **Eta**-ukupan broj mutacija, **Hd**-raznolikost haplotipova, **Pi**-nukleotidna raznolikost, **k**-prosječni broj nukleotidnih razlika.

Ukupna raznolikost haplotipova je nešto veća nego za biljeg *cyt b* ($Hd=0,824$). Ukupne vrijednosti nukleotidne raznolikosti ($Pi=0,00469$) i prosječnog broja nukleotidnih razlika ($k=2,063$) također govore u prilog većoj genetičkoj raznolikosti unatoč tome što je analiza temeljena na CR rađena na manjem broju uzoraka. Također, u obzir treba uzeti i to da nisam uspjela dobiti niti jednu sekvencu s lokaliteta: rijeka Ruda (Cetina), rijeka Šujica (Duvanjsko polje), Buško jezero i jezero Mandek (Livanjsko polje) i Mostarsko blato (Neretva).

Stoga vrijednosti genetičke raznolikosti populacija iz riječnog bazena Cetine (uključujući Duvanjsko i Livanjsko polje) nisu najbolje usporedive s vrijednostima dobivenim na temelju markera *cyt b*, a vrijednosti populacije Mostarskog blata uopće ne možemo uspoređivati jer ih za CR nemamo.

I najmanje vrijednosti pojedinih populacija za biljeg CR pokazuju umjerenu genetičku raznolikost, a niti jedna populacija ne pokazuje zabrinjavajuće vrijednosti. Najmanje vrijednosti genetičke raznolikosti pokazuju populacije s lokaliteta: jezero Brljan i Krka manastir (Krka), ali za ovaj biljeg one su ipak samo umjerene. Zatim slijede populacije s lokaliteta: jezero Visovac (Krka), Miloševo jezero (Cetina), rijeka Čikola (Krka), Tomislavgrad (Duvanjsko polje) koje imaju nešto niže vrijednosti od ukupnih vrijednosti svih proučavanih lokaliteta, ali i dalje vrlo zadovoljavajuće u odnosu na rezultate temeljene na cyt *b*. Najveće vrijednosti pokazuje populacija s lokaliteta Roški slap (Krka), čak nešto veće od ukupnih vrijednosti svih proučavanih lokaliteta.

3.6. Efektivne veličine populacija i protok gena

Početna ideja bila je opisati interpopulacijsku strukturu oštrulje na temelju procjene protoka gena između svakog pojedinog lokaliteta te odrediti efektivnu veličinu populacije sa svakog pojedinog lokaliteta. Međutim BI analize dale su nerealne vrijednosti parametara Θ i M , vjerojatno zbog male ukupne genetičke raznolikosti uzoraka, ali i zbog neravnomjerne raspodjele uzoraka. Stoga su umjesto pojedinačnih lokaliteta uzorci podijeljeni prema prvoj većoj logičnoj geografskoj cjelini u 4 grupe uzoraka: Krka, Cetina, Duvanjsko i Livanjsko polje te Mostarsko blato. Izlazni rezultati analize pokazali su da migracije između navedenih grupa ne postoje, a efektivne veličine populacija očekivano su male (*Tablica 7.*).

*Tablica 7. Efektivne veličine populacija (N_e) utvrđene BI analizom na temelju biljega cyt *b**

Područje	Srednja vrijednost parametra Θ	N_e (efektivna veličina populacija)
Krka i pritoci	0,00037	160,87
Cetina i pritoci	0,00033	143,48
Livanjsko i Duvanjsko polje	0,00277	1204,35
Mostarsko blato	0,00117	508,70

Dobiveni rezultati ne predstavljaju stvarne vrijednosti već aproksimacije na temelju genetičke raznolikosti uzorka koje su u našem slučaju dovoljne za procjene ugroženosti populacija s pojedinih područja. Grupe s Krke i Cetine pokazuju izrazito male vrijednosti N_e (<200), Mostarsko blato pokazuje nešto veću vrijednost ($N_e \approx 500$), dok je najbolja situacija u Livanjskom i Duvanjskom polju ($N_e \approx 1200$).

Slijedeći isti postupak kao i za marker cyt *b* izračunati su parametri Θ i M na temelju markera CR.

Kako bi rezultati bili usporedivi s rezultatima biljega cyt *b* i u ovom slučaju umjesto pojedinačnih lokaliteta uzorci su podijeljeni u grupe (Krka, Cetina i Duvanjsko polje) prema prvoj većoj geografskoj cjelini.

Nažalost zbog nedostataka uzoraka s lokaliteta u Livanjskom polju i Mostarskom blatu, te manjem broju uzoraka Cetine samo vrijednosti dobivene za područje rijeke Krke za analize temeljene na oba markera, možemo vjerodostojno usporediti. Uzoraka s lokaliteta rijeka Krke također je bilo nešto manje, ali u analizi markera CR bili su zastupljeni uzorci sa svih lokaliteta rijeke Krke (izuzev jezera Visovac) u približno jednakim omjerima.

Izlazni rezultati analize ponovno su pokazali da migracija između navedenih područja nema, ali su zato procjene vrijednosti N_e za sve grupe nešto veće (Tablica 8.). Najveću vrijednost ($N_e \approx 2130$) pokazuje grupa uzoraka s rijeke Krke. Grupa uzoraka iz Duvanjskog polja pokazuje vrijednost $N_e \approx 1080$, a grupa uzoraka s rijeke Cetine pokazuje najmanju vrijednost $N_e \approx 330$.

Tablica 8. Efektivne veličine populacija (N_e) utvrđene BI analizom na temelju biljega CR

Područje	Srednja vrijednost parametra Θ	N_e (efektivna veličina populacija)
Krka i pritoci	0,00490	2130,435
Cetina i pritoci	0,00077	334,7826
Duvanjsko polje	0,00250	1086,957

4. Rasprava

4.1. Filogenetske rekonstrukcije

Rezultati filogenetskih analiza MP, ML i MJ za markere *cyt b* i CR govore nam o srodstvenim odnosima populacija oštrulja diljem njezinog areala rasprostranjenosti. S obzirom da je u analize biljega *cyt b* uključeno više uzoraka s više lokaliteta ovaj biljeg daje nam više informacija o intraspecijskoj filogenetskoj strukturi oštrulje.

Filogenetske analize temeljene na *cyt b* biljegu rezultirale su jasnim odvajanjem tri filogenetske grupe (plave, žute i crvene). Većina svih ispitanih uzoraka (59) pripada haplotipu AUL1 kojeg također nalazimo na najvećem broju lokaliteta, a dominira u lokalitetima na rijeci Krki. Ipak haplotip AUL5 na filogramima nalazi se najbliže bazi, a i zvjezdasti obrazac na MJ dijagramu govori nam da je to možda najstariji haplotip. Iako raspored pretpostavljenih ancestralnih haplotipova (AUL1, AUL4 i AUL5) u filogenetskim stablima i mreži temeljenim na biljegu *cyt b* djelomično prati geografski obrazac uzoraka s pojedinog lokaliteta, zbog različitog broja uzoraka s pojedinih lokaliteta ne može se sa sigurnošću tvrditi da je diferencijacija ovih haplotipova pratila i naseljavanje ove vrste od sjevera prema jugu.

Uz to valja naglasiti i kako proučavajući ostale haplotipove pojedine grupe nije uočljivo da se uzorci grupiraju prema geografskoj rasprostranjenosti.

Filogenetske analize prema CR biljegu u ovom su pogledu još manje informativne s obzirom da su rađene na manjem broju uzoraka s manje lokaliteta te da zbog metode ukorijenjivanja filograma nemamo vremenski kontekst diferencijacije haplotipova.

Na MJ mreži haplotipova uočljive su dvije grupe (svijetlozelena i tamnozeleno), a haplotipovi koji im pripadaju također ne oslikavaju geografski obrazac uzoraka. Na mreži također nije jasno kojoj grupi pripada haplotip HUE10, dok MP i ML filogrami ipak pokazuju da se ovaj haplotip grupira bliže svijetlozelenoj grupi.

Međutim, zanimljivo je da filogrami za *cyt b* pokazuju rapidnu diferencijaciju haplotipova.

Dosadašnja istraživanja navode kako se radi o vrlo staroj vrsti. Stoga, ako uzrok ove rapidne diferencijacije tražimo u prošlosti, ona može biti objašnjena većom povezanošću slatkovodnih ekosustava u trenutku kada je oštrulja naseljavala današnje prostore rasprostranjenosti. To znači da su nekada krške rijeke bile bolje povezane (nadzemno i/ili podzemno), a polja u kršu redovito su bila poplavljena što je omogućavalo sezonske i druge migracije populacija. Time je održana dovoljna razina genske raznolikosti koja je uvjetovala veći fitness i veličinu populacija te osigurala preživljavanje ove endemske vrste na malom arealu sve do danas.

4.2. Intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost te interspecijska različitost

Prema biljezima *cyt b* i CR, oštrulja ne pokazuje veliku genetičku strukturiranost. Je li uzrok tome smanjenje genetičke raznolikosti uvjetovano nedavnim promjenama u staništu ili je oštrulja zbog malog areala rasprostranjenosti i geološke prošlosti u kojoj se uvjeti kroz vrijeme nisu previše mijenjali i s malom genetičkom raznolikosti uspjela preživjeti do sada, teško je reći samo na temelju ovih analiza.

Ukupna raznolikost haplotipova (H_d) za biljeg *cyt b* iznosi 0,518 te ju možemo smatrati umjerenom. H_d za biljeg CR očekivano je veća (0,824) s obzirom na bržu evoluciju od *cyt b*. Slične rezultate dobili su i KALAMUJIĆ STROIL I SUR. (2019). Međutim, analize biljega *cyt b* obuhvaćaju uzorke s lokaliteta diljem cijelog areala rasprostranjenosti za razliku od uzoraka koje smo koristili u analizama biljega CR. Stoga o intraspecijskoj genetskoj raznolikosti oštrulje bolje možemo zaključivati na temelju rezultata biljega *cyt b* i ustvrditi da je ona ipak samo umjerena.

Mjere intrapopulacijskog genskog polimorfizma pokazuju velike razlike između populacija, osobito za biljeg *cyt b*. Iako ukupne vrijednosti pokazuju umjerenu gensku raznolikost što je i očekivano za populacije endemskih vrsta, populacije pojedinih lokaliteta (Brljan, Krka manastir, Čikola i Miloševo jezero) pokazuju zabrinjavajuće nisku razinu genetičke raznolikosti (vrijednosti jednake 0). Uz njih zabrinjavajuće stanje genske raznolikosti pokazuje i populacija jezera Visovac koja temeljem oba genska biljega pokazuje vrijednosti mjera manje od ukupnih vrijednosti. Ovakvi rezultati potvrđuju dosadašnje analize morfoloških i ekoloških karakteristika populacija iz Krke, Čikole i Cetine (MIHINJAČ 2018) koje ukazuju na smanjenje fitnessa ovih populacija.

Naime, interpopulacijska i intraspecijska genetička raznolikost pozitivno je korelirana sa veličinom i fitnessom populacija neke vrste (FRANKHAM I SUR. 2010) tj. populacije ili vrste sa većom genetičkom raznolikošću imaju veće šanse prilagoditi se novim uvjetima okoliša i preživjeti (BUJ I SUR 2019). Zabrinjavajuće stanje primijećeno je i na jezeru Mandek u Livanjskom polju, ali zbog malog broja uzoraka i nepostojanja prijašnjih istraživanja potrebno ih je upotpuniti.

Populacije određenih lokaliteta (Roški slap, Ruda, Tomislavgrad, Šujica i Buško Blato) ipak pokazuju veće vrijednosti temeljem biljega *cyt b* čak i od ukupnih. Posebno je zanimljivo da populacija s lokaliteta Roški slap pokazuje zadovoljavajuće vrijednosti u odnosu na ostale lokalitete s Krke temeljem oba genska biljega. To možemo objasniti postojanjem podzemnih putova podno Roškog slapa u koje jedinke potencijalno migriraju u nepovoljnim uvjetima. Isti obrazac primijetili su i MUŠOVIĆ I SUR. (2018) na Buškom blatu gdje je potvrđeno da se jedinke povlače u mali dio rezervoara povezan sa podzemnim vodama vjerojatno da bi izbjegle predatore. Poznato je da su i u rijeku Krku unesene invazivne vrste koje potencijalno stvaraju dodatan pritisak na oštrulju. Vrijednosti genskog polimorfizma temeljem biljega *cyt b* populacije s Buškog jezera ($Hd=1$, $Pi=0,00219$, $k=2,5$) pokazuju bolje rezultate u odnosu na prijašnja istraživanja (MUŠOVIĆ I SUR. 2018, KALAMUJIĆ STROIL I SUR. 2019), ali zbog malog broja uzoraka u našem istraživanju prijašnji rezultati su vjerodostojniji.

Populacija s lokaliteta Tomislavgrad daje oprečne rezultate tj. biljeg *cyt b* daje nešto veće vrijednosti od ukupnih, dok biljeg CR daje nešto manje vrijednosti od ukupnih. Stoga je analize na temelju oba biljega potrebno ponoviti na većem broju uzoraka.

Lokalitet Mostarsko blato u riječnom bazenu Cetine pokazuje umjerene vrijednosti na temelju biljega *cyt b*, vrlo slične ukupnim vrijednostima svih proučavanih lokaliteta. Međutim analize za ovaj lokalitet također su uključivale mali broj uzoraka biljega *cyt b*, pa one možda ne oslikavaju stvarnu genetičku raznolikost populacije ovog lokaliteta. Također, za biljeg CR nisam uspjela izolirati sekvence koje bih uključila analizu pa je usporedba genetičke raznolikosti temeljem ova dva biljega nemoguća. Stoga je i za populaciju s ovog lokaliteta analize za oba biljega potrebno ponoviti na većem broju uzoraka.

4.3. Protok gena i efektivna veličina populacija

Procjene protoka gena između populacija s područja Krke, Cetine, Duvanjskog i Livanjskog polja te Mostarskog blata suprotno svim očekivanjima pokazale su da protoka gena nema. Međutim, kako bi se sa sigurnošću moglo utvrditi da migracija iz navedenih područja nema potrebno je ponoviti analize s većim brojem uzoraka ili provesti istraživanje metodom obilježavanja i praćenja jedinki.

Procjene efektivne veličine populacija temeljem biljega *cyt b* i CR pokazuju da su efektivne veličine populacija općenito male. S obzirom da se radi o endemskoj vrsti s vrlo rascjepkanim arealom možemo očekivati da će efektivne veličine populacija biti nešto manje.

Ipak analiza za marker CR pokazuje znatno veće vrijednosti za populaciju Krke koje u ovom slučaju nisu zabrinjavajuće, dok je populacija s Cetine u obje analize pokazuje veličine populacije na granici opstanka. Duvanjsko polje pokazuje najmanje zabrinjavajuće rezultate. Za Livanjsko polje ipak se ne može s sigurnošću ustvrditi stanje jer zbog neuspješne izolacije sekvenci CR nije bilo uključeno u obje analize. Međutim FRANKHAM I SUR. (2010) zaključuju kako populacije s efektivnom veličinom manjom od 1000 imaju smanjenu vijabilnost zbog smanjene sposobnosti da se nose s promjenama u okolišu. U našim rezultatima možemo primijetiti kontradikcije između *cyt b* i CR analiza za populaciju rijeke Krke gdje je za *cyt b* procijenjena $N_e < 200$, a za CR je $N_e \approx 2000$. Uzmemo li u obzir ostale rezultate analiza genskih polimorfizama možemo zaključiti da su ove populacije ipak znatno ugrožene ako ne zbog smanjene veličine populacije onda zbog smanjene genske raznolikosti. Populacije na rijeci Cetini niti za jedan marker ne pokazuju $N_e > 1000$ pa možemo zaključiti da, uzmemo li u obzir samo efektivne veličine populacija s rijeke Cetine već na kritičnoj točki gdje svaki potencijalni katastrofični događaj može uzrokovati njezino izumiranje. Populacije Duvanjskog polja iako na donjoj granici ipak pokazuju najveće efektivne veličine populacija za oba biljega, dok je za populacije Livanjskog polja i Mostarskog blata potrebno uključiti više uzoraka kako bi analize dale jasnije rezultate. U svakom slučaju možemo reći da su sve proučavane populacije na donjim granicama efektivnih veličina populacije potrebnih da se osigura preživljavanje te je potrebno hitno primijeniti efektivnu zaštitu kako bi se ovakav scenarij spriječio.

4.5. Konzervacijski prioriteti

Iako je oštrulja u Hrvatskoj zaštićena prema Pravilniku o strogo zaštićenim vrstama te ju nalazimo kao ciljnu vrstu za nekoliko područja ovo istraživanje samo je potvrdilo kako njezina zaštita u praksi nije efektivna. Procjene intraspecijske genske raznolikosti i efektivnih veličina populacije samo su potvrdile dosadašnja istraživanja temeljena na ekološkim i morfološkim analizama koje govore u prilog ugroženosti ove vrste. Bez obzira je li smanjena intraspecijska genska raznolikost posljedica čovjekovog utjecaja ili je ona uvjetovana efektom uskog grla u daljoj prošlosti, činjenica je da je sposobnost oštrulje da se prilagodi novonastalim okolišnim promjenama zbog nje, smanjena.

U cilju efektivnije zaštite potrebno je definirati konzervacijske prioritete.

2001. godine FRASER I BERNATCHEZ definirali su evolucijski značajne jedinice (ESU) kao grupe koje pokazuju vrlo ograničen protok gena prema drugim takvim grupama unutar vrste. S obzirom da temeljem ovog istraživanja ne možemo sa sigurnošću govoriti o razini protoka gena između populacija prema ovoj definiciji ESU ne možemo sa sigurnošću definirati između proučavanih populacija. S obzirom da ne postoje niti stariji podaci koje govore o interpopulacijskoj strukturi oštrulje za sada nije moguće definirati niti jedinice genetskog gospodarenja (eng. genetic management units, MUs) koje prema WAPES (1991) i MOTIRT (1994) povezane malim ili nikakvim suvremenim protokom gena, ali povijesno odvojene vrlo dugi vremenski periodi. Isto vrijedi i za ostale definirane konzervacijske jedinice. Potrebno je ustanoviti sa sigurnošću postoji li protok gena i ako da u kojoj mjeri, ili ako ne koliko dugo.

U ovom slučaju najbolje je primjenjiva izvorna definicija evolucijski značajne jedinice koju je definirao RYDER (1986) kao podskup sveobuhvatnijih vrsta entiteta koji posjeduju značajne genetske atribute za sadašnju i buduću generaciju dotične vrste.

Također podrazumijevaju jedinice ispod razine vrste koja su od iznimne važnosti za budući razvoj i opstanak dotične vrste, to mogu ili ne moraju genetski razlikovati od drugih jedinica (linije, populacije, subpopulacije). Istom logikom vodili su se i BUJ I SUR. (2014.) prilikom definiranja konzervacijskih prioriteta među populacijama *Cobitis narentana* Karaman, 1928 (neretvanski vijun).

Stoga na temelju dobivenih rezultata filogenetskih analiza i analiza genskih polimorfizama zaključujem kako bi kao konzervacijske prioritete trebalo zaštititi sljedeće populacije na sljedećim lokalitetima:

1. Roški slap – za šire područje rijeke Krke i pritoka
2. Ruda – za šire područje rijeke Cetine i pritoka
3. Rijeka Šujica i povremeni vodotoci oko Tomislavgrada – za šire područje Livanjskog i Duvanjskog polja

5. Zaključak

Na temelju rezultata dobivenih na temelju mitohondrijskih genskih biljega citokroma *b* i kontrolne regije može se zaključiti sljedeće:

- Na istraživanim lokalitetima utvrđena je prisutnost 13 haplotipova citokroma *b* i 11 haplotipova kontrolne regije na istraživanim lokalitetima.
- Intraspecijska filogenetska struktura oštrulje ne pokazuje veliku strukturiranost za genske biljege citokrom *b* i mitohondrijsku kontrolnu regiju.
- Filogrami temeljeni na haplotipovima cyt *b* pokazuju rapidnu diferencijaciju haplotipova. Uzrok ovoj rapidnoj diferencijaciji potrebno je detaljnije istražiti.
- Intraspecijska genska raznolikost oštrulje temeljem vrijednosti mjera genskog polimorfizma biljega cyt *b* je umjerena.
- Vrijednosti mjere intrapopulacijskog genskog polimorfizma biljega cyt *b* pokazuju velike razlike između genske raznolikosti proučavanih populacija oštrulje.
- Populacije s pojedinih lokaliteta (jezero Brljan, Krka manastir, rijeka Čikola i Miloševo jezero) pokazuju zabrinjavajuće nisku razinu genetičke raznolikosti što je u skladu s rezultatima koje su dale ekološke i morfološke analize populacija Krke, Čikole i Cetine.
- Smanjene vrijednosti intrapopulacijskog genskog polimorfizma primijećene su i za jezero Mandek međutim ove je rezultate potrebno potvrditi istraživanjima na većem broju uzoraka.
- Populacije s lokaliteta (Roški slap, Ruda, Tomislavgrad, Šujica) pokazuju zadovoljavajuću razinu genetičke raznolikosti.
- Procjene protoka gena između populacija na područjima Krke, Cetine, Duvanjskog i Livanjskog polja te Mostarskog blata pokazale da protoka gena nema. Kako bi se to sa sigurnošću ustvrdilo potrebno je ponoviti analize temeljem oba biljega za veći broj uzoraka ili provesti istraživanje metodom obilježavanja jedinki.
- Procjene efektivne veličine populacija pokazuju niske vrijednosti što je i očekivano za jednu endemsku vrstu.
- Populacije iz Krke, Čikole i Cetine pokazuju zabrinjavajuće male efektivne veličine što je u skladu s prijašnjim istraživanjima.
- Duvanjsko polje pokazuje zadovoljavajuću efektivnu veličinu populacije, a za populacije lokaliteta Mostarsko blato i Livanjsko polje potrebna su daljnja istraživanja.
- Prema dobivenim rezultatima ovog istraživanja kao konzervacijski prioriteti na temelju originalne definicije evolucijski značajnih jedinica (RYDER 1986) određene su sljedeće populacije:
 1. Roški slap – za šire područje rijeke Krke i pritoka
 2. Ruda – za šire područje rijeke Cetine i pritoka
 3. Rijeka Šujica i povremeni vodotoci oko Tomislavgrada – za šire područje Livanjskog i Duvanjskog polja

Literatura

- AGANOVIĆ M. 1970: Plodnost oštrulja (*Aulopyge hugelii* Heckel) iz voda Livanjskog polja. Ribarstvo 25(1):15-18.
- AGANOVIĆ M. I VUKOVIĆ T. 1966: Odnos dužine crijevnog trakta i dužine tijela kod tri lokalne populacije oštrulja (*Aulopyge hugelii* Heckel). Ribarstvo 21(1):30-33.
- AGANOVIĆ M. I VUKOVIĆ T. 1968: Uzrasno variranje nekih morfometrijskih karaktera oštrulja iz vodotoka sa područja Livanjskog polja. Ribarstvo 23(2):30-33.
- ARAI R. 1982: A chromosome study on two cyprinid fishes, *Acrossocheilichthys labiatus* and *Pseudorasbora pumila pumila*, with notes on Eurasian cyprinids and their karyotypes. Bulletin of the National Science Museum Tokyo, Series A, 8(3).
- AVISE, J.C. 1998: The history and purview of phylogeography: a personal reflection. Molecular Ecology 7: 371-379.
- 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.
- BENOVICS M., KIČINJAOVÁ M.L. I ŠIMKOVA A. 2017: The phylogenetic position of the enigmatic Balkan *Aulopyge huegelii* (Teleostei: Cyprinidae) from the perspective of hostspecific *Dactylogyrus* parasites (Monogenea), with a description of *Dactylogyrus omenti* n. sp. Parasites & Vectors 10:547 DOI 10.1186/s13071-017-2491-z
- BERMINGHAM E., MORITZ C. 1998: Comparative phylogeography: concepts and applications. Molecular Ecology 7: 367-369.
- BERREBI P. I TSIGENOPOULOS C. 2003: Phylogenetic organization of the genus *Barbus* sensu stricto. The Freshwater Fishes of Europe 5: 11-22.
- BIONDIĆ R., BRUN C., CRNKO, T., DIKOVIĆ S., KOGOVAŠEK J., KOŽELJ A., MALEČKAR F., MIHEVC A., OTONIČAR B., PETRIČ M., PIPAN T., PRETNAR G., RADIŠIĆ M., RAVBAR N., RUBINIĆ J., RUŽIĆ I., ZUPAN HAJNA N., ZUPAN HAJNA N., RAVBAR N., RUBINIĆ J., PETRIČ M., KOVAČIĆ G., KRANJC A., MULEC J., BROWN H., METCALFE R., ALTSHUL P., PERENČEVIĆ P. I CULVER D 2015: Life And Water On Karst. Ljubljana: Založba ZRC.
- BLESS R. I RIEHL R. 2002: Biology and egg morphology of the Dalmatian barbelgudgeon *Aulopyge huegelii*, an endangered species in Croatia. Environmental Biology of Fishes 63(4):451-456
- BONACCI, O. 1987: Karst Hydrology, With Special Reference To The Dinaric Karst. Berlin: Springer-Verlag.

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.

BUJ, I., ŠANDA, R., ZOGARIS, S., FREYHOF, J., GEIGER, M. I VUKIĆ, J., 2019: Cryptic diversity in *Telestes pleurobipunctatus* (Actinopterygii; Leuciscidae) as a consequence of historical biogeography in the Ionian Freshwater Ecoregion (Greece, Albania). Hydrobiologia 835(1): 147-163.

CRIVELLI A. J. 2006: *Aulopyge huegelii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2006:e.T61350A12466288. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2006.RLTS.T61350A12466288.en>.

CRKVENČIĆ I., DERADO K., FRIGANOVIĆ M., KALOĐERA A., MIRKOVIĆ D., RADICA T., RIĐANOVIĆ J., ROGIĆ V. ROGLIĆ J., STRAŽIČIĆ N. I ŠEGOTA T. 1974: Geografija SR Hrvatske 6, Južno hrvatsko primorje. Školska knjiga, Zagreb. 229. str.

ČALETA M., BUJ I., MRAKOVČIĆ M., MUSTAFIĆ P., ZANELLA D., MARČIĆ Z., DUPLIĆ A., MIHINJAČ T. I KATAVIĆ I. (2015): Hrvatske endemske ribe. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb, Hrvatska. 116 str.

ČALETA M., MRAKOVČIĆ M., BUJ I., MUSTAFIĆ P., ZANELLA D. I MARČIĆ Z. 2009: Threatened fishes of the world: *Aulopyge huegelii* Heckel, 1842 (Cyprinidae). Environmental Biology of Fishes 85:21-22.

DELIĆ A., KUČINIĆ M., MARIĆ D. I BUČAR D. 2005: New data about the distribution of the *Phoxinellus alepidotus* (Heckel, 1843) and *Aulopyge huegelii* (Heckel, 1841). Natura Croatia 14(4):351-355.

ĐUROVIĆ E. I VUKOVIĆ T. 1975: Vještačka hibridizacija *Aulopyge hügelii* Heckel, 1843 sa vrstama *Leuciscus cephalus* (Linnaeus, 1758), *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) i *Alburnoides bipunctatus* (Bloch, 1782) (Pisces, Cyprinidae). Godišnjak Biološkog instituta Univerziteta u Sarajevu 28:83-92.

EMERSON B., HEWITT G. 2005: Phylogeography. Current Biology 15 (10): 367-371.

FRANKHAM R., BALOU J.D. I D. A. BRISCOE 2010: Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.

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 Conservations 170: 56-63.

FRASER DJ., BERNANTCHEZ L. 2001: Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. Mol Ecol 10: 2741–2752. PMID: 11903888

- GANTE H. F. 2011. Diversification of Circum-Mediterranean Barbels. U Grillo O. (ur.): Changing Diversity in Changing Environment, InTech, DOI: 10.5772/24639.
- GUZINA N. 2000: Morfološko – taksonomske karakteristike vrste *Aulopyge hügelii* Heckel, 1841. Doktorska disertacija. Univerzitet u Sarajevu, Prirodno – matematički fakultet, 429 str.
- GUZINA N. I VUKOVIĆ T. 1987: Prvi podaci o nalazu i morfologiji krljušti kod *Aulopyge hügelii* Heckel, 1841 iz Buškog jezera. Godišnjak Biološkog instituta Univerziteta u Sarajevu 40:27-38.
- GUZINA N., SERATLIĆ D. I VUKOVIĆ T. 1986: Vještačka hibridizacija između vrsta *Aulopyge hügelii* Heckel, 1841 i *Leuciscus turskyi* (Heckel, 1843). Godišnjak Biološkog instituta Univerziteta u Sarajevu 39:39-48.
- GVOZDENOVIĆ O., KEKIĆ H., PAVLOVIĆ V., IVANČIĆ A., MIJATOVIĆ N. I PEJIĆ K. 1985: Ugljeni hidrati oštrulja (*Aulopyge hügelii* Heckel, 1841) u uslovima totalnog gladovanja. Godišnjak Biološkog instituta Univerziteta u Sarajevu 38:77-83.
- HECKEL J. J. 1842: Amtlicher Bericht über die neunzehnte Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte im Braunschweig in September 1841. Braunschweig, Njemačka. str. 73-74
- HECKEL J. J. 1843: Abbildungen und Beschreibungen der Fische Syriens: nebst einer neuen Classification und Characteristik sämmtlicher Gattungen der Cyprinen. E. Schweizerbart'sche Verlagehandlung, Stuttgart. str. 1021.
- HECKEL J. J. I KNER R. 1858: Die Süßwasserfische der Österreichischen Monarchie mit Rücksicht auf die Anränzenden Länder. Engelmann, Leipzig. str. 95-99.
- HEWITT, G.M. 2001: Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10, 537-549.
- HOWES G. J. 1987: The phylogenetic position of the Yugoslavian cyprinid fish genus *Aulopyge* Heckel, 1841, with an appraisal of the genus *Barbus* Cuvier & Cloquet, 1816 and the subfamily Cyprininae. *Bulletin of the British Museum (Natural History)* 52(5):165-196.
- KALAMUJIĆ STROJIL B., MUŠOVIĆ A, ŠKRIJELJ R., Dorić S., ĐUG S., POJSKIĆ N. 2019: Molecular-genetic diversity of the endangered Dalmatian barbelgudgeon, *Aulopyge hügelii* from the Buško Blato reservoir. *Genetica* 147: 269–280. <https://doi.org/10.1007/s10709-019-00069-z>
- KAPETANOVIĆ N., AGANOVIĆ M., VUKOVIĆ T. 1966: O specifičnostima oblika otolita kod jedinki iz tri lokalne populacije oštrulja (*Aulopyge hügelii* Heckel). *Ribarstvo* 21(6):134-137.
- KARAMAN M. S. 1971: Süßwasserfische der Türkei. 8. Teil. Revision der Barben Europas, Vorderasiens und Nordafrikas. *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut* 67:175-254.
- KOTTELAT M. I FREYHOF J. 2007: Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.

LIPSCOMB D. 1998: Basics of Cladistic Analysis. George Washington University, Washington D.C.

MACHORDOM A. I DOADRIO I. 2001: Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. Proceedings of the Royal Society B 268(1473):1297-1306.

MIHALIĆ M. 2016: Reproduktivne značajke oštrulje *Aulopyge huegelii* Heckel, 1843 (Cyprinidae, Actinopterygii). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno - matematički fakultet, 33 str.

MIHINJAČ T. 2018: Biološko – ekološke značajke oštrulja *Aulopyge huegelii* Heckel, 1843 (Cyprinidae, Actinopterygii). Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, 221 str.

MORITZ C 1994: Defining 'evolutionary significant units' for conservation. Trends Ecol Evol 9: 373–375. doi: 10.1016/0169-5347(94)90057-4 PMID: 21236896

MRAKOVČIĆ M. I MIŠETIĆ S. 1990: Status, distribution and conservation of the salmonid, *Salmothymus obtusirostris* (Heckel) and the cyprinid, *Aulopyge hugeli* (Heckel) in Yugoslavia. Journal of Fish Biology 31(A):241-242.

MRAKOVČIĆ M. I MIŠETIĆ S. 1990: Status, distribution and conservation of the salmonid, *Salmothymus obtusirostris* (Heckel) and the cyprinid, *Aulopyge hugeli* (Heckel) in Yugoslavia. Journal of Fish Biology 31(A):241-242.

MRAKOVČIĆ M., BRIGIĆ A., BUJ I., ČALETA M., MUSTAFIĆ P. I ZANELLA D. 2006: Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, Hrvatska.

MUŠOVIĆ A., ĐUG S., POJSKIĆ N., KALAMUJIĆ STROIL B., VESNIĆ A. I ŠKRIJELJ R. 2018: Status of endangered fish species *Aulopyge huegelii* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae) in the Buško Blato reservoir, Bosnia and Herzegovina. Iranian Journal of Ichthyology 5(3): 212-231.

NAKHLEH L., GUOHUA J., FENGMEI Z. I MELLOR-CRUMMEY J. 2005: Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony. IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB'05).

NARODNE NOVINE 124/13: Uredba o ekološkoj mreži.

NARODNE NOVINE 144/2013: Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama.

NARODNE NOVINE 73/2016: Pravilnik o izmjenama i dopunama pravilnika o strogo zaštićenim vrstama.

PAVLICA M. 2012: Mrežni udžbenik iz genetike. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Udžbenici zagrebačkog sveučilišta, elektronička izdanja, I izdanje, Zagreb.

PEREA S., BOHME M., ZUPANCIC P., FREYHOF J., Sanda R., OZULUG M., ABDOLI A. I DOADRIO I. 2010: Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in circumMediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. BMC Evolutionary Biology 10: 265.

RYDER OA. 1986: Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. Trends Ecol Evol 1: 9–10.

Službene novine Federacije BiH 7/14: Crvena lista divljih vrsta i podvrsta biljaka, životinja i gljiva.

ŠORIĆ V. M. I BĂNĂRESCU P. M. 1999: *Aulopyge Heckel*, 1841. U Bănărescu P. M. (ur.): The Freshwater Fishes of Europe, Vol. 5/I, Cyprinidae 2/I. AULA-Verlag GmbH, Njemačka. str. 368-381

TSIGENOPOULOS C. S. I BERREBI P. 2000: Molecular phylogeny of North Mediterranean freshwater barbs (Genus *Barbus*: Cyprinidae) inferred from cytochrome b sequences: biogeographic and systematic implications. Molecular Phylogenetics and Evolution 14(2):165-179.

WANG J., WU X. Y., CHEN Z. M. I SUR. 2013: Molecular phylogeny of European and African *Barbus* and their West Asian relatives in the Cyprininae (Teleostei: Cypriniformes) and orogenesis of the Qinghai-Tibetan Plateau. Chin Sci Bull, 2013

Waples RS. 1991: Pacific Salmon, *Oncorhynchus* spp. and the definition of 'species' under the endangered species act. Mar Fish Rev 53: 11–22. 39.

Web stranice:

<http://np-krka.hr/> Pristup: 13.9.2020.

<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=11348> Pristup: 13.9.2020.

<http://www.moreikrs.hr/znacajni-krajobraz/ruda> Pristup: 13.9.2020.

<https://www.dinarskogorje.com/dinarski-krscaron.html> Pristup: 13.9.2020.

<http://prirodahrvatske.com/kraska-polja/> Pristup: 13.9.2020.

Životopis

Mia Knjaz

Datum i mjesto rođenja: 16.7.1995., Zagreb

Adresa: Zvečaj 3, 10000 Zagreb

Mobitel: 099 3409131

Mail: mknjaz@gmail.com

Obrazovanje

2017.-2020. Diplomski studij: Eksperimentalna biologija, Modul: Zoologija, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2014.-2017. Prediplomski studij biologije Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2010.-2014. 11. Gimnazija u Zagrebu

2002-2010 Osnovna škola Vrbani u Zagrebu

Aktivnosti vezane za obrazovanje

2016–2018 Članica upravnog odbora Udruge studenata biologije – BIUS

2016-2017 Članica Sekcije za kakavce i zrikavce Udruge studenata biologije – BIUS

2016-2018 Voditeljica Sekcije za leptire Udruge studenata biologije – BIUS

2014–2017 Noć biologije, edukator

2015–2017 Znanstveni piknik, edukator

2016 Znanstveni kvart na Interliberu, edukator

2015 Istraživačko - edukacijski projekt: Papuk 2015, sudionik

2016 Istraživačko edukacijski projekt: Mura - Drava 2017., sudionik

2017 Istraživačko edukacijski projekt: Insula Tilagus 2017., član organizacijskog odbora

2018 Istraživačko - edukacijski projekt: Šuma Žutica 2018.

2018 Voditeljica projekta Leptiri Arboretuma Trsteno (Udruga Aurelia)

2019 Voditeljica projekta Insula Auri 2019.

2020 Članica Društva istraživača mora „20 000 milja“

Jezici

Engleski – C1

Njemački – C2

Ostalo

Vozačka dozvola B kategorije