

Genska struktura i raznolikost velike pliske, *Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat, 2007 u Kupi i Mrežnici

Razum, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:979113>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Razum

**Genska struktura i raznolikost velike pliske,
Alburnus sarmaticus Freyhof & Kottelat 2007
u Kupi i Mrežnici**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ana Razum

**Genetic structure and diversity of Pontian
shemaya, *Alburnus sarmaticus* Freyhof &
Kottelat 2007 in the Kupa and Mrežnica
Rivers**

Master thesis

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Buj na strpljenju i pomoći prilikom izrade ovoga rada.

Hvala mag. oecol. et prot. nat. Luciji Ivić i mag. educ. biol. et chem. Luciji Raguž na pomoći pri radu u laboratoriju.

Također se zahvaljujem svojim roditeljima te braći na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog studiranja.

Na kraju bih htjela posebno zahvaliti prijateljima što su uvijek bili uz mene i time mi olakšali studiranje.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genska struktura i raznolikost velike pliske, *Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat 2007 u Kupi i Mrežnici

Ana Razum

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi i analizirati raznolikost i gensku strukturu populacija vrste *Alburnus sarmaticus* (velika pliska) u Hrvatskoj. Ova vrsta u Europi obitava samo u crnomorskom slijevu, i to u nizvodnim dijelovima rijeke Dunav, te u Dnjeparu i Južnom Bugu na području Rumunjske, Ukrajine i Bugarske, dok se u Hrvatskoj može naći potpuno izolirana populacija ove vrste u rijekama Savi, Kupi i Mrežnici. Uzorci su prikupljeni na rijekama Mrežnica i Kupa. Analiza podataka je uključivala izolaciju ukupne genomske DNA, umnažanje odabranih genskih markera lančanom reakcijom polimerazom, sravnjivanje sekvenci, što sam provela pomoću programa BioEdit, prilikom čega su uočene i pojedine mutacije među sekvencama. Također sam izradila filogenetska stabla pomoću programa PAUP, prilikom čega sam koristila metode najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti. Utvrdila sam da sekvence velike pliske pripadaju monofiletskoj liniji. Zatim sam izradila filogenetsku mrežu dobivenih haplotipova korištenjem programa Network. Za utvrđivanje stupnja intrapopulacijske genske raznolikosti koristila sam program DnaSP. Intraspecijsku i interpopulacijsku strukturu velike pliske u Hrvatskoj detaljno sam analizirala korištenjem programa MIGRATE. Filogenetska stabla pokazuju kako vrsta *A. sarmaticus* pripada staroj monofiletskoj liniji. Rezultati su također pokazali visoku gensku raznolikost, što je vrlo pozitivan pokazatelj za budući povoljan razvitak ove vrste.

(35 stranica, 8 slika, 10 tablica, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: velika pliska, genska raznolikost, genska struktura, filogenija

Voditelj: doc. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Ivana Buj

Prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Prof. dr. sc. Ines Radanović

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Genetic structure and diversity of Pontian shemaya, *Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat 2007 in the Kupa and Mrežnica Rivers

Ana Razum

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The main goal of this thesis was to determine and analyze the diversity and genetic structure of populations of *Alburnus sarmaticus* (Pontian shemaya) in Croatia. In Europe, this species lives only in the Black Sea basin, in the downstream parts of the Danube, and in the Dnieper and Southern Bug in Romania, Ukraine and Bulgaria, while in Croatia a completely isolated population of this species can be found in the Sava, Kupa and Mrežnica Rivers. Samples were collected from the Mrežnica and Kupa Rivers. Data analysis includes isolation of total genomic DNA, amplification of selected gene markers by polymerase chain reaction, sequence alignment, which I performed using the BioEdit program, during which individual mutations between sequences were observed. I also made phylogenetic trees using the PAUP program, using the methods of the highest parsimony and the highest probability. I determined that the sequences of the Pontian shemaya belong to the monophyletic line. I then constructed a phylogenetic network of the obtained haplotypes using the Network program. I used the DnaSP program to determine the degree of intrapopulation gene diversity. I analyzed the intraspecific and interpopulation structure of the Pontian shemaya in Croatia in detail using the MIGRATE program. Phylogenetic trees show that the species *A. sarmaticus* belongs to the old monophyletic line. The results also showed high genetic diversity, which is a very positive indicator for the future favorable development of these species.

(34 pages, 8 figures, 10 tables, 58 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: Pontian shemaya, genetic diversity, genetic structure, phylogeny

Supervisor: Dr. Ivana Buj, Doc.

Reviewers:

Dr. Ivana Buj, doc

Dr. Iva Juranović Cindrić, Prof.

Dr. Ines Radanović, Prof.

Thesis accepted: September 15, 2021

Sadržaj:

1. Uvod.....	1
1.1. Biologija velike pliske (<i>Alburnus sarmaticus</i> Freyhof & Kottelat 2007).....	1
1.2. Važnost očuvanja raznolikosti riba.....	2
1.3. Genetika riba.....	4
1.4. Uporaba filogenetskih i populacijsko genskih metoda.....	5
1.5. Cilj istraživanja.....	6
2. Materijali i metode	7
2.1. Područje istraživanja.....	7
2.2. Materijali.....	9
2.3. Metode.....	10
2.3.1. Prikupljanje uzoraka.....	10
2.3.1. Izolacija DNA.....	10
2.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR reakcija).....	11
2.3.3. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	12
2.3.4. Sekvenciranje uzoraka.....	12
2.3.5. Analiza sekvenci.....	12
2.3.6. Filogenetska rekonstrukcija.....	13
2.3.7. Intrapopulacijska genska raznolikost.....	15
2.3.8. Intraspecijska i interpopulacijska struktura.....	16
3. Rezultati	17
3.1. Rezultati filogenetske rekonstrukcije za citokrom <i>b</i>	17
3.2. Rezultati filogenetske rekonstrukcije za rodopsin.....	21
3.3. Rezultati analize intrapopulacijske genske raznolikosti za gen <i>cyt b</i>	25
3.4. Rezultati analize intraspecijske i interpopulacijske strukture za gen <i>cyt b</i>	26
4. Rasprava	28
5. Zaključak.....	30
6. Literatura.....	31
7. Životopis.....	35

1. Uvod

1.1. **Biologija velike pliske (*Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat 2007)**

Velika pliska je bentopelagička slatkovodna riba iz porodice Cyprinidae, jedne od vrstama najbogatijih porodica među kralješnjacima (Nelson i sur., 2016), koja živi u rijekama i jezerima. Svi su pripadnici roda *Alburnus*, kao i ova vrsta, svijetle (gotovo bijele) boje, otkuda i potječe samo ime roda, budući da na latinskom riječ *albus* znači bijelo (Ćaleta i sur., 2015). Ovu se vrstu može prepoznati po izduženom obliku tijela veličine 15 – 40 cm koje je pokriveno srednje velikim ljuskama (Slika 1.), dok iza trbušnih peraja ima središnji greben čiji je stražnji dio bez ljuski (Mrakovčić i sur., 2006).

Velika pliska u Europi obitava samo u crnomorskom slijevu, i to u nizvodnim dijelovima rijeke Dunav te u Dnjeparu i Južnom Bugu na području Rumunjske, Ukrajine i Bugarske, dok se u Hrvatskoj može naći potpuno izolirana populacija ove vrste u rijekama Savi, Kupi i Mrežnici. S obzirom da je velika pliska migratorna vrsta (Ćaleta i sur., 2015), postoje česti pokazatelji njenih migracijskih aktivnosti. Smatra se da je ostatak populacije iz dunavskog slijeva posve izumro u posljednjih 100 godina (Kottelat i Freyhof, 2007).

Nužno je što hitnije osmisliti djelotvorni plan očuvanja preostalih populacija velike pliske, uključujući i hrvatsku populaciju, s obzirom da se prema statusu Međunarodnog saveza za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava (IUCN) velika pliska smatra ugroženom (EN) vrstom, dok je prema regionalnoj procjeni osjetljiva (VU) vrsta (Ćaleta i sur., 2015). Podaci o genskoj strukturi i raznolikosti nužni su za utvrđivanje stanja i stabilnosti populacija, kao i predviđanje njihove vijabilnosti.



Slika 1. Vanjski izgled vrste *Alburnus sarmaticus*

Izvor: Handbook of European Freshwater Fishes (Kottelat i Freyhof, 2007)

1.2. Važnost očuvanja raznolikosti riba

Vodena staništa imaju značajnu ulogu u ekosustavu kroz povijest pa sve do danas. Jedna od najvećih vrijednost vodenih ekosustava povezana je s redovitim poplavama. Umjerene redovite poplave na poplavnim područjima utječu na bioraznolikost biljnog i životinjskog svijeta u rijekama i uz rijeke (Craig, 2016).

Osim toga, vodena staništa se koriste i za opskrbu stanovništva vodom te kao izvor hrane kroz ribarstvo (Dodds i Whiles, 2010).

Ribe su najraznolikija i najmnogobrojnija, ali ujedno i najmanje istražena i najugroženija skupina kralješnjaka na Zemlji. Razlozi njihove ugroženosti u Europi se javljaju zbog sve većeg utjecaja čovjeka na različita vodena staništa; kao što su onečišćenje, unos alohtonih vrsta i degradacija staništa, dok razlozi za njihovu osjetljivost u Hrvatskoj nisu posve istraženi (Mrakovčić i sur., 2006).

Slatkovodna staništa su posebno osjetljiva na različita onečišćenja, pogotovo na onečišćenja toksičnim kemikalijama, kao što su to nafta i teški metali. Najveća opasnost za ribe su upravo teški metali koji se nakupljaju u tjelesnim tkivima i na taj način oštećuju organizam riba čime ih se čini osjetljivima na nagle promjene, poput visokih temperatura ili niskih razina kisika (Pough i Janis, 2019).

Slatkovodne vrste riba čine čak jednu trećinu svih vrsta riba usprkos tome što slatke vode predstavljaju mali udio ukupne površine svjetskih voda (Mrakovčić i sur., 2006).

U posljednjim istraživanjima se navodi kako se unutar dunavskog slijeva Hrvatske nalazi oko 87 ribljih vrsta. Od toga je oko 67 autohtonih vrsta i 20 stranih odnosno alohtonih vrsta, umjetno nastanjenih ili samostalno rasprostranjenih te se upravo slatkovodne ribe u današnje vrijeme smatraju jednom od najugroženijih skupina kralješnjaka (Ćaleta i sur., 2015).

U ostatku Europe je do danas više od 12 vrsta slatkovodne ribe izumrlo, a 38 % od preostalih vrsta prijeto izumiranje (Pough i Janis, 2019).

Prema Ćaleta i sur. (2015), upravo zbog geografskog smještaja Hrvatske i složene geološke prošlosti te izolacije vodotoka jadranskog slijeva slatkovodna ihtiofauna Hrvatske je vrlo raznolika s obzirom na broj vrsta te ima osobito velik udio endema, zbog čega se Hrvatska smatra jednom od ihtiološki najraznolikijih zemalja Europe.

Na bioraznolikost vodenih staništa uvelike utječu svi faktori vezani za rast i razvoj riba, kao što su temperatura, dostupnost nutrijenata, kisika i svjetlosti, salinitet i sama genetička struktura vrsta. Između ostalog postoji i velika razlika u obliku veličine zubi, što se direktno povezuje s različitim načinima prehrane te vrstom hrane koju ribe konzumiraju (Schultz, 2003).

Iz tog je razloga potrebno proučavati neke od prethodno navedenih faktora s obzirom da utječu na raznolikost među populacijama, ne samo što se brojnosti tiče, već utječu i na ponašanje samih riba (Helfman i sur., 2009).

1.3. Genetika riba

Tijekom 530 milijuna godina, prirodna selekcija je neprestano mijenjala DNA riba kako bi jedinke bile spremne na razne izazove i nove mogućnosti. Današnji rezultati pokazuju kako je evolucija genetičkog materijala ribe zaslužna za posebne genetičke značajke preko 28 000 vrsta, a unutar svake vrste za između tisuću do milijun jedinstvenih jedinki (Helfman i sur., 2009).

Haploidna mitohondrijska DNA čini zatvoreni krug dvolančane DNA koja se nalazi u ribama i ostalim eukariotima. Ovaj genom ima protein – kodirajuće gene koji mogu mutirati puno većom brzinom nego što je to slučaj kod većine gena molekule DNA koji su sastavni dio jezgre eukariotske stanice. Takvi geni mitohondrijske DNA omogućuju bolje i lakše razumijevanje sveukupnog ponašanja riba unutar populacija, kao i evolucijske linije na taksonomskoj razini roda i vrsta (Helfman i sur., 2009).

Mitohondrijska DNA kralješnjaka sadrži ukupno 13 protein – kodirajućih gena, od kojih se citokrom *b* najčešće upotrebljava za utvrđivanje filogenetičke strukture vrsta (Nei i Kumar, 2000).

Rodopsin je nuklearni gen s jednom kopijom koji kodira za receptor povezan sa sedam transmembranskih G-proteina te tako čini prvi korak vizualnog prijenosa u fotoreceptorima oka. Kod kralješnjaka je izražen na visokim razinama u staničnim fotoreceptorskim stanicama. Bio je prisutan već kod kralješnjaka koji su živjeli prije 700 milijuna godina, a nastao je duplikacijom vizualnog pigmenta kod predaka prije 800 milijuna godina (Passarge, 2007).

Iako ovaj marker u pojedinim istraživanjima nije uspio razlikovati blisko povezane vrste, koristan je pokazatelj taksonomskih odnosa pružajući dodatne informacije (Behrens – Chapuis, 2015).

Rodopsin se često koristi i kao genski marker jer se pomoću njega može saznati od kojeg je roditelja jedinka naslijedila alel (Passarge, 2007).

1.4. Uporaba filogenetskih i populacijsko genskih metoda

Filogenetika ili molekularna filogenija pripada znanstvenoj disciplini koja nam pomaže da pomoću genetskog materijala utvrdimo evolucijske odnose organizama. Filogenija je vrlo važna disciplina s obzirom da njome izravno saznajemo evolucijsku prošlost pojedine jedinke (Lipscomb, 1998).

Monofiletska skupina predstavlja skupinu organizama koja uključuje sve potomke zajedničkog pretka (Lemey i sur., 2009).

Metoda najveće parsimonije je jedna od metoda filogenetske rekonstrukcije koja se koristila prilikom analize u ovom istraživanju, a pomoću koje se dobivaju filogenetska stabla. Zajedno s metodom najveće vjerojatnosti (ML) i Bayesovom metodom (BAY), izravno obrađuje sekvence.

Iako su metode najveće vjerojatnosti i najveće parsimonije sa statističkog gledišta vrlo slične (Posada, 2009), razlikuju se u tome što se prilikom obrade podataka gledaju različite vrijednosti.

Ova metoda se razlikuje od ostalih metoda izrade filogenetskih stabala po tome što je glavni princip metode procjenjivanje na temelju minimalne duljine, a to znači minimalne promjene u parametrima koje bi mogle utjecati na hipotezu. Dakle sami cilj parsimonije je uštediti odnosno što više smanjiti brojne vrijednosti rezultata. Tumačenje stabla najveće parsimonije ovisi na koji će način autor objasniti odnose i prirodu rubova i čvorova na stablu.

Metoda najveće vjerojatnosti bazira se na vjerojatnosti da će događaj koji se dogodio u prošlosti donijeti određeni ishod odnosno rezultat. Koristi se za postupak određivanja vrijednosti jednog ili više parametara za zadani model koji promatramo. Rezultati se dobivaju na način da podaci kojima trenutno raspolažemo postignu svoju najveću vrijednost. (Wiley i Lieberman, 2011).

Često se pri izradi stabala koristi metoda podržanosti (eng. *bootstrap*) koja određuje varijabilnost parametara (Efron i Gong, 1983).

Prema Wiley i Lieberman (2011), filogenetske mreže predstavljaju kružne grafove te ih se ne smije izjednačavati s filogenetskim stablima s obzirom da ovakav prikaz pokazuje odnose među populacijama u obliku mreže, ali se mogu dogoditi i slučajevi u kojima dvosmislenost parametara onemogućuje razrješenje hijerarhijskih odnosa. Ovakav način prikaza može biti vrlo koristan za vizualizaciju i bolje razumijevanje složenih evolucijskih odnosa (Helfman i sur., 2009).

Pri izradi filogenetičkih stabala, poželjno je u analizu uvrstiti i vanjsku skupinu (outgroup).

Vanjska skupina je vrsta ili viši takson koji se koristi u filogenetskoj analizi prilikom koje se procjenjuje koji pretpostavljeni homolozi ukazuju na rodoslovni odnos unutar proučavane skupine, a koji su jednostavnog karaktera. Vanjska skupina koristi se za određivanje korijena filogenetskog stabla te polarnosti karaktera. (Wiley i Lieberman, 2011).

Iako je filogenetska rekonstrukcija koja se temelji na usporedbi zajedničkih morfoloških karakteristika životinja u uporabi samo 60 godina, uspostava filogenetskih stabla, mreža i filograma je bio dugotrajan proces koji je trajao dulje od 140 godina. Prvi koji je predložio princip izrade filogenetskih stabala je bio njemački entomolog Willi Hennig. U današnje vrijeme takvu vrstu metode filogenetske rekonstrukcije nazivamo kladistika (Brooks i McLennan, 1991).

Populacijska genetika je znanstveno proučavanje genetskog sastava populacija. Glavni cilj je procijeniti učestalost alela na različitim genskim lokusima u prirodnim populacijama (učestalost alela, koja se naziva i učestalost gena). Iz toga se mogu izvući zaključci o mogućim selektivnim utjecajima koji bi mogli objasniti uočene razlike. Populacija se može okarakterizirati na temelju učestalosti alela na različitim genskim lokusima (Passarge, 2007).

1.5. Cilj istraživanja

Ovaj diplomski rad se temelji na analizi genetičkog materijala ribe *Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat, 2007 (velika pliska).

Ciljevi istraživanja genske strukture i raznolikosti velike pliske su bili:

1. Utvrditi filogenetski položaj i filogeografski obrazac populacija velike pliske u Hrvatskoj
2. Opisati gensku strukturu velike pliske u Hrvatskoj
3. Odrediti razlike na genskoj razini između populacija velike pliske Mrežnice i Kupe
4. Opisati gensku raznolikost velike pliske u Hrvatskoj i diskutirati njenu važnost za zaštitu ove vrste

5. Provjeriti taksonomski status populacija velike pliske u Hrvatskoj na temelju molekularno genetičkih analiza

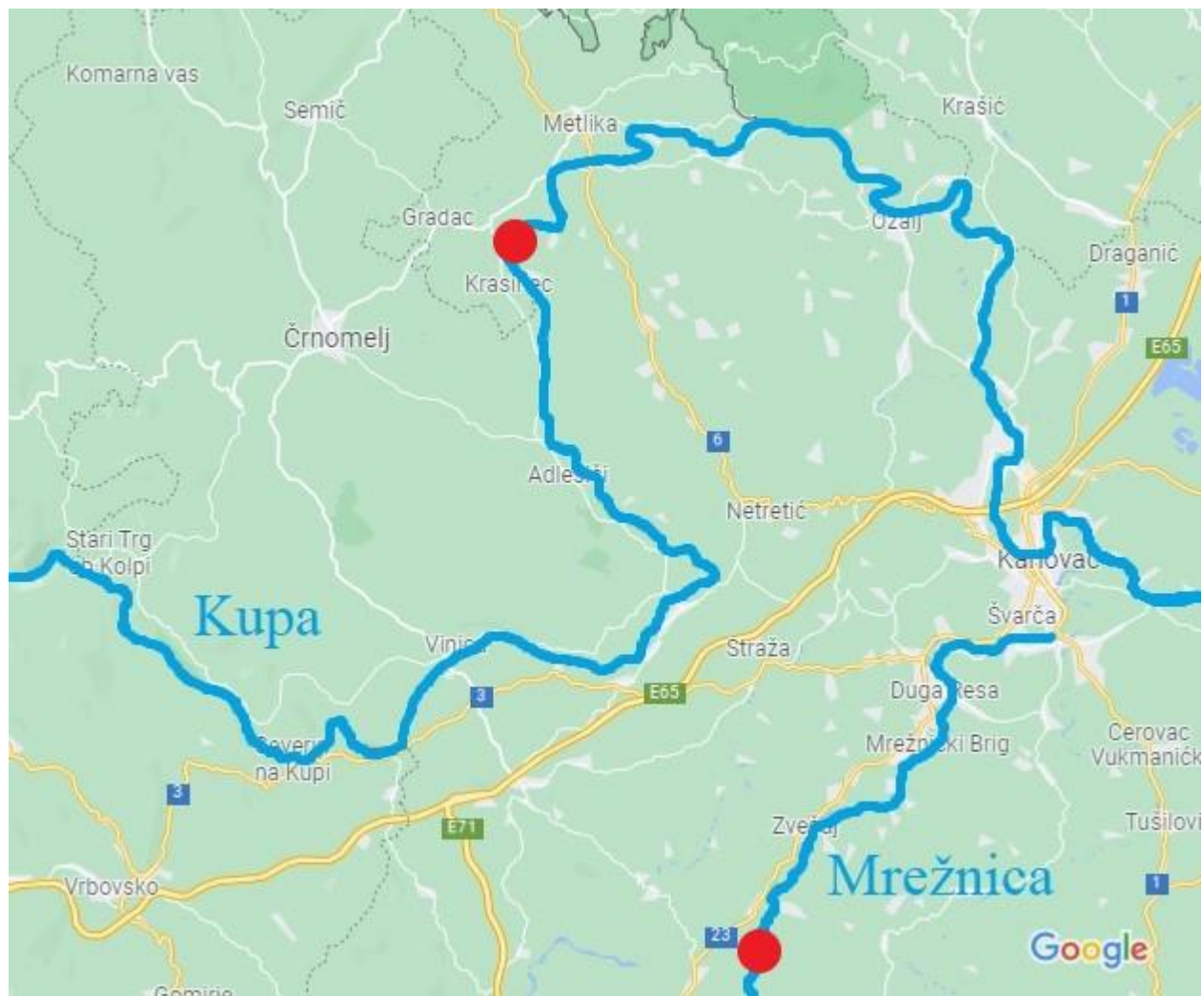
2. Materijali i metode

2.1. Područje istraživanja

Rijeka Kupa izvire u Kupskom jezeru u Gorskom Kotaru, a teče prema istoku te se ulijeva u Savu kod Siska. Dužina njenog toka iznosi 294 km, a porječje pokriva površinu od 10457,9 km². Tok Kupe može se podijeliti na dva dijela: gornji i srednji tok s puno brzaca i slapova te donji, mirniji tok. Glavni desni pritoci su joj Korana, Dobra, Glina i Petrinjčica, a lijevi Odra, Kupčina, Čabranka (Anić – Antić i sur., 2006). Na rijeci su izgrađene tri hidroelektrane, Ozalj I, Ozalj II i Ilovac. Prosječno najviši vodostaj je krajem svibnja, a najniži je u kolovozu te se njena dubina kreće između jednog i deset m. Srednji protok rijeke u blizini ušća iznosi 201 m³/s (www.voda.hr). U rijeci Kupi obitavaju sljedeće vrste riba: dunavska i kalifornijska pastrva, lipljen i mladica u salmonidnom gornjem dijelu; podust, mrena, klen, plotica i mladica u srednjem toku; te šaran, som, štika, grgeč, deverika, jez i ostale ciprinidne vrste nizinskih voda dunavskog slijeva u donjem toku (<http://ribolovni-savez.hr/ribolovne-vode/kupa/>).

Rijeka Mrežnica izvire oko 1 km sjeverno od Popovića Vrha i oko 7,5 km jugozapadno od Slunja, teče prema sjeveru, te se ulijeva u Koranu kod Turnja. Dugačka je 62,6 km, dok njezino porječje pokriva površinu od 1491 km² (Anić – Antić i sur., 2006). Na toku rijeke se nalaze 93 slapa koji su nastali taloženjem sedre (Pavlič, 2016). Mrežnica prolazi kroz različite reljefne cjeline i ima mnoge pritoke što rezultira varijacijama u protoku. Prosječan protok rijeke iznosi 26,6 m³/s (www.voda.hr). Od ribljih vrsta koje obitavaju u Mrežnici, najznačajnije su šaran, mladica, manjić, potočna mrena, piškur, potočna pastrva, blistavac i mali vretenac (Hršak, 2010).

Uzorci istraživanih jedinki su prikupljeni na lokalitetima Generalski Stol na rijeci Mrežnici i Gornja Pravutina na rijeci Kupi, prikazani na Slici 2.



Slika 2. Prikaz lokacija prikupljanja istraživane vrste *A. sarmaticus*
Izvor: Google karte

2.2. Materijali

Ovaj rad će se temeljiti na analizi uzoraka prikupljenih na rijekama Kupa i Mrežnica. Uzorci su prikupljeni elektroribolovom prilikom terenskih istraživanja Grupe za kralješnjake i zaštitu prirode Zoologijskog zavoda. Ukupan broj uzoraka je 15, od kojih je 10 prikupljeno na Mrežnici, a 5 uzoraka na rijeci Kupi (Tablica 1.). Od navednih jedinki, za citokrom *b* sam sravnala 9 sekvenci različitih jedinki kodnih imena SRMR5, SRMR8, SRMR9, SRKU1, SRKU2, SRKU3, SRKU4 i SRKU5 dok su za genski marker rodopsin sravnjene sekvence SRKU1, SRKU2, SRKU3, SRMR1, SRMR2, SRMR3, SRMR4, SRMR5 i SRMR7.

Tablica 1. Prikupljena vrsta, lokacije prikupljanja, broj jedinki te kodna imena

Vrsta	lokaliitet	broj jedinki	kodna imena
<i>Alburnus sarmaticus</i>	Mrežnica – Generalski Stol	10	SRMR1 SRMR2 SRMR3 SRMR4 SRMR5 SRMR6 SRMR7 SRMR8 SRMR9 SRMR10
<i>Alburnus sarmaticus</i>	Kupa – Gornja Pravutina	5	SRKU1 SRKU2 SRKU3 SRKU4 SRKU5

2.3. Metode

2.3.1. Prikupljanje uzoraka

Istraživani uzorci su prikupljeni pomoću elektroribolova.

Elektroribolov se smatra jednim od najmodernijih metoda ribolova, a opisuje se kao narkoza riba pomoću električne struje pri čemu se tijelo riba otupljuje. Cilj ovakve metode je jednak ciljevima kemijskih i mehaničkih metoda; ribe se narkotiziraju čime im je onemogućeno bježanje a time i što lakši ulov. Ovakva vrsta ribolova je često i jedini način lova slatkovodnih ribljih vrsta budući da se mogu javiti mnoge prepreke koje otežavaju prilazak pojedinim mjestima na kojima se odvija lov. Također je korisna za kontrolu i utvrđivanje opsega zalihe riba, prilikom čega se lako mogu ukloniti bolesne, prestare ili neželjene vrste riba (Gabriel i sur., 2005).

2.3.1. Izolacija DNA

Iz uzoraka sam najprije izolirala ukupnu genomsku DNA pomoću kompleta za izolaciju Dneasy Blood & Tissue (Qiagen), prema uputama proizvođača.

Dodala sam 180 µl ATL otopine i 20 µl otopine proteinaze K na komadić tkiva peraje u Eppendorf epruvetu od 2 ml. ATL otopina služi za razaranje stanične i jezgrene membrane čija je inače uloga da sprječava odvajanje DNA iz stanice. Nakon toga sam pripremljene uzorke stavila na inkubaciju u vodenu kupelj preko noći na 56°C kako bi moglo doći do lize tkiva. Sljedeći dan sam promiješala sadržaj epruvete te poslije toga dodala 200 µl AL otopine i 200 µl 100% - tnog etanola. Sadržaj epruvete sam zatim pipetom prenijela u epruvetu s membranom (DNeasy Mini spin column) koja je bila smještena unutar 2 ml epruvete za skupljanje uzorka. Epruvetu sam stavila na centrifugiranje pri 6000 okretaja u minuti na jednu minutu, nakon čega sam epruvetu za skupljanje uzorka bacila. Kolonu sam smjestila u novu epruvetu za skupljanje uzorka, dodala 500 µl AW1 pufera te ponovila centrifugiranje pri uvjetima od prije. Isti sam postupak ponovila prije nego sam dodala 500 µl AW2

pufera. Ponovno sam ponovila postupak te sam dodala AE pufer koji ima elucijsko djelovanje, nakon čega sam centrifugirala sadržaj na 8000 okretaja u minuti na 1 minutu. Izoliranu DNA sam skupila u Eppendorf epruvetu od 2 ml i označila odgovarajućim kodom.

2.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR reakcija)

Nakon izolacije DNA, uzorci su bili podvrgnuti lančanoj reakciji polimerazom (PCR reakcija) kako bih umnožila odabrane genske markere (gen za citokrom *b* te nuklearni gen za rodopsin). Citokrom *b* je dio mitohondrijske DNA.

PCR reakcija je provedena pomoću PCR uređaja (Eppendorf Mastercycler Nexus GX2) te sam u njega stavila epruvete za PCR s reakcijskim smjesama. Prije same provedbe PCR reakcije, pripremila sam reakcijske smjese za PCR. U svakoj epruveti se nalazilo 12,5 µl mješavine za PCR (HotStarTaq Master Mix, Qiagen), po 2 µl svake početnice koncentracije 10 pmol/µl, 2 µl vode i 4 µl DNA. Početnice koje sam koristila za PCR reakciju za citokrom *b* su bile GluF (5` GAA GAA CCA CCG TTG TTA TTC AA 3`) te ThrR (5` ACC TCC RAT CTY CGG ATT ACA 3`), dok sam za PCR reakciju za rodopsin koristila RhR (5` CCR CAG CAC ARC GTC GTG ATC ATG 3`) i RhF (5` CNT ATG AAT AYC CTC AGT ACT ACC 3`).

PCR reakcija za *cyt b* se odvijala u tri faze. Prva faza je faza aktivacije DNA polimeraze na 95°C na 15 min. Druga se faza sastoji od ciklusa umnažanja DNA od 35 ciklusa, a svaki se ciklus sastoji od denaturacija na 94°C po 30 s, sparivanja početnica na 50°C po 30 s i produljivanja DNA na 72°C po 90 s. Treća faza uključuje završno produljivanje DNA na 72°C po 7 min.

2.3.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Uspješnost PCR reakcija provjeravala sam pomoću elektroforeze na agaroznom gelu.

Pripremila sam gel od 1 g agaroze i 100 ml pufera TAE. Smjesa je ulivena u kalup s češljicom te je nakon hlađenja podignut češljic prilikom čega su ostale jažice. Nakon što sam uzorke pažljivo odpipetirala u jažice na gelu, na uređaju sam podesila jačinu od 120 V na vremenskom periodu od 30 minuta kako bi se mogla početi odvijati elektroforeza. Gel s uzorcima sam zatim stavila u uređaj za slikanje gela, nakon čega sam mogla točno utvrditi uspješnost prethodno napravljene PCR reakcije na uzorcima.

2.3.4. Sekvenciranje uzoraka

Nakon provjere uspješnosti PCR reakcije elektroforezom na agaroznom gelu, uzorke kod kojih je PCR metoda uspjela sam slala na određivanje primarne strukture nukleotida (sekvenciranje) u servis za sekvenciranje MacroGen Europe. Za sekvenciranje gena *cyt b* korištene su početnice ALB – GLU (5' CCT GAA AYA TYG GYG TRGT 3') i reverzna početnica PHOX – THR (3' AGG AGG AAR TGR AAT GCG AA 5'). Za sekvenciranje nuklearnog gena za rodopsin koristila se početnica RhF (5' CNT ATG AAT AYC CTC AGT ACT ACC 3').

2.3.5. Analiza sekvenci

Analiza sekvenci je obuhvaćala sravnjivanje gena nakon dobivenih sekvenciranih uzoraka, što sam provela pomoću programa BioEdit, prilikom čega su se mogle uočiti i pojedine mutacije među sekvencama. Sve kromatograme sam provjeravala vizualno. To je bilo posebno važno kako bih za nuklearni alel mogla primijetiti heterozigotne pozicije.

2.3.6. Filogenetska rekonstrukcija

Nakon sravnjivanja gena, slijedila je analiza uzoraka pomoću filogenetske rekonstrukcije. Filogenetička stabla izradila sam pomoću programa PAUP, korištenjem metoda najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti. Također sam izradila i filogenetsku mrežu dobivenih haplotipova korištenjem programa Network.

Podaci prikazani u Tablici 2. se odnose na sekvence pojedinih srodnih vrsta koje sam preuzela iz banke gena, a te vrste su *Alburnus alburnus*, *Alburnus albidus*, *Alburnus arborella*, *Alburnus belvica*, *Alburnus macedonicus*, *Alburnus scoranza*. Za vanjsku grupu (eng. outgroup) sam preuzela sekvencu vrste *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758). Podaci u Tablici 3. prikazuju sekvence za rodopsin vrsta *Alburnus alburnus* i *Squalius cephalus*, također preuzetih iz banke gena.

Filograme za gene citokrom *b* te rodopsin izradila sam uz analizu podržanosti (eng. bootstrap). Na ovaj sam način provjerila je li dobiveno stablo nastalo pomoću podataka cijelog seta ili je nastao kao posljedica izbora od više alternativnih stabala (Baldauf, 2003).

Koristeći se analizom podržanosti, podržanost stabala istraživanih gena za ovu vrstu je bila određena uz 1000 ponavljanja. Pritom je postignut visok postotak podrške što ukazuje na to da čvor stabla podržava puno karaktera te su takvi rezultati vrlo povoljni.

Tablica 2. Sekvence za gen citokrom *b* (*cyt b*) preuzete iz banke gena

Vrsta	Pristupni broj	Autori	Lokalitet
<i>Alburnus alburnus</i>	MG806649	Schonhuth,S., Vukic,J., Sanda,R., Yang,L. i Mayden,R.L.	rijeka Kupa
	AF090745	Zardoya,R. i Doadrio,I.	rijeka Struma
<i>Alburnus albidus</i>	KJ463893	Milana,V. i Rossi,A.R.	Italija
<i>Alburnus arborella</i>	MK482021	Benovics,M., Desdevises,Y., Vukic,J., Sanda,R. i Simkova,A.	Italija: canale maestro de la Chiana,

	HM560064	Perea,S., Bohme,M., Zupancic,P., Freyhof,J., Sanda,R., Ozulug,M., Abdoli,A. i Doadrio,I.	Chuisa dei Capannoi, Arno BiH: rijeka Trebižat, porječje Neretve
<i>Alburnus belvica</i>	MG806650	Schönhuth,S., Vukic,J., Sanda,R., Yang,L. i Mayden, R.L.	Albanija: Jezero Prespa
<i>Alburnus macedonicus</i>	AF090743	Zardoya,R. i Doadrio,I.	Makedonija: Dojransko jezero
<i>Alburnus scoranza</i>	MT543238	Grapci-Kotori,L., Vavalidis,T., Zogaris,D., Sanda,R., Vukic,J.,	Albanija: Bijeli Drim, Zllakuqan
<i>Squalius cephalus</i>	MG806701	Schönhuth,S., Vukic,J., Sanda,R., Yang,L. i Mayden,R.L.	Češka: rijeka Berounka

Tablica 2. (nastavak)

Tablica 3. Sekvence za rodopsin preuzete iz Banke gena

Vrsta	Pristupni broj	autori	lokalitet
<i>Alburnus alburnus</i>	FJ197044	Mayden,R.L., Chen,W.J., Bart,H.L., Doosey,M.H., Simons,A.M., Tang,K.L., Wood,R.M., Agnew,M.K., Yang,L., Hirt,M.V., Clements,M.D., Saitoh,K., Sado,T., Miya,M. i Nishida,M.	Nepoznat
<i>Squalius cephalus</i>	KC355062	Denys,G.P.J., Dettai,A., Persat,H., Doadrio,I., Cruaud,C. i Keith,P.	Francuska: Aquitaine, Landes, Adour, Luy, Saugnac i Cambran

2.3.7. Intrapopulacijska genska raznolikost

Odredila sam osnovne mjere genskog polimorfizma za hrvatsku populaciju ove vrste i to broj haplotipova, broj polimorfnih mjesta, ukupan broj mutacija, raznolikost haplotipova, nukleotidna raznolikost i prosječan broj razlika nukleotida.

Za utvrđivanje stupnja intrapopulacijske genske raznolikosti sam koristila program DnaSP. Pritom su zadani sljedeći parametri, radi utvrđivanja DNA polimorfizma unutar populacija:

- N – ukupan broj sekvenci,
- h – broj haplotipova,
- S – broj polimorfnih mjesta,
- η - ukupan broj mutacija,
- H_d – raznolikost haplotipova,
- π - nukleotidna raznolikost,
- k – prosječna raznolikost nukleotida.

Većina gena javlja se u različitim kopijama, zvanim aleli. Postojanje više alela na jednom određenom mjestu naziva se polimorfizam. Polimorfizam DNA neovisan je o funkciji gena. Razlike u jednom nukleotidu na jednom određenom mjestu nazivaju se jednonukleotidni polimorfizam (eng. single nucleotide polymorphism, SNP) (Passarge, 2007).

Mutacije u genu koje se prenose na potomstvo i koje opstaju s izvornim genom rezultiraju polimorfizmima. Na polimorfnom mjestu u populaciji istovremeno cirkuliraju dvije ili više varijanti gena. Populacijski genetičari obično proučavaju dinamiku učestalosti ovih polimorfnih mjesta tijekom vremena.

Budući da S predstavlja broj polimorfnih mjesta, ali zanemaruje njihovu učestalost u populaciji, osjetljiv je na postojanje rijetkih, niskofrekventnih varijanti. Nasuprot tome, postojanje međufrekventnih varijanti više utječe na π , jer one stvaraju razlike između više parova sekvenci u uzorku (Lemey i sur., 2009).

Genotip predstavlja opis alela na lokusu, koji pokazuje koja se dva alela javljaju na diploidnom lokusu.

Haplotip je isto što i genotip, ali se primjenjuje na haploidni genom mtDNA. Različiti haplotipovi razlikuju se po jednoj ili više mutacija i obično im se dodjeljuju slova ili brojevi (Helfman i sur., 2009).

2.3.8. Intraspecijska i interpopulacijska struktura

Intraspecijsku i interpopulacijsku strukturu velike pliske u Hrvatskoj detaljno sam utvrđivala korištenjem programa MIGRATE, pomoću kojeg sam odredila uspješnost migracija među populacijama, kao i njihovu efektivnu veličinu. Pritom sam rezultate za oba parametra dobila koristeći se Bayesovom metodom te metodom najveće vjerojatnosti.

Efektivna veličina populacije, N_e - predstavlja broj jedinki u populaciji koje prenose svoje gene na sljedeću generaciju. To se obično procjenjuje na temelju razine nukleotidne raznolikosti (π) unutar populacija, pri čemu velika raznolikost ukazuje na veliku stabilnu populaciju. Migratorne aktivnosti riba su vrlo često učestale. Migracije imaju nekoliko općih oblika. Reproductivne migracije, odnosno mriješćenje odvode životinje s mjesta hranjenja na mjesto mriješćenja, premještajući životinju sa staništa koje je optimalno za preživljavanje odraslih jedinki na mjesto koje je bolje za preživljavanje ličinki ili mladih jedinki.

Postoje i populacije velike pliske koje su anadromne (Kottelat i Freyhof, 1972).

Helfman i sur. (2009) napominju kako neke anadromne ribe razvijaju populaciju bez izlaza na more koja nikada ne migrira u more, već se mrijesti u ulaznim tokovima do velikih jezera.

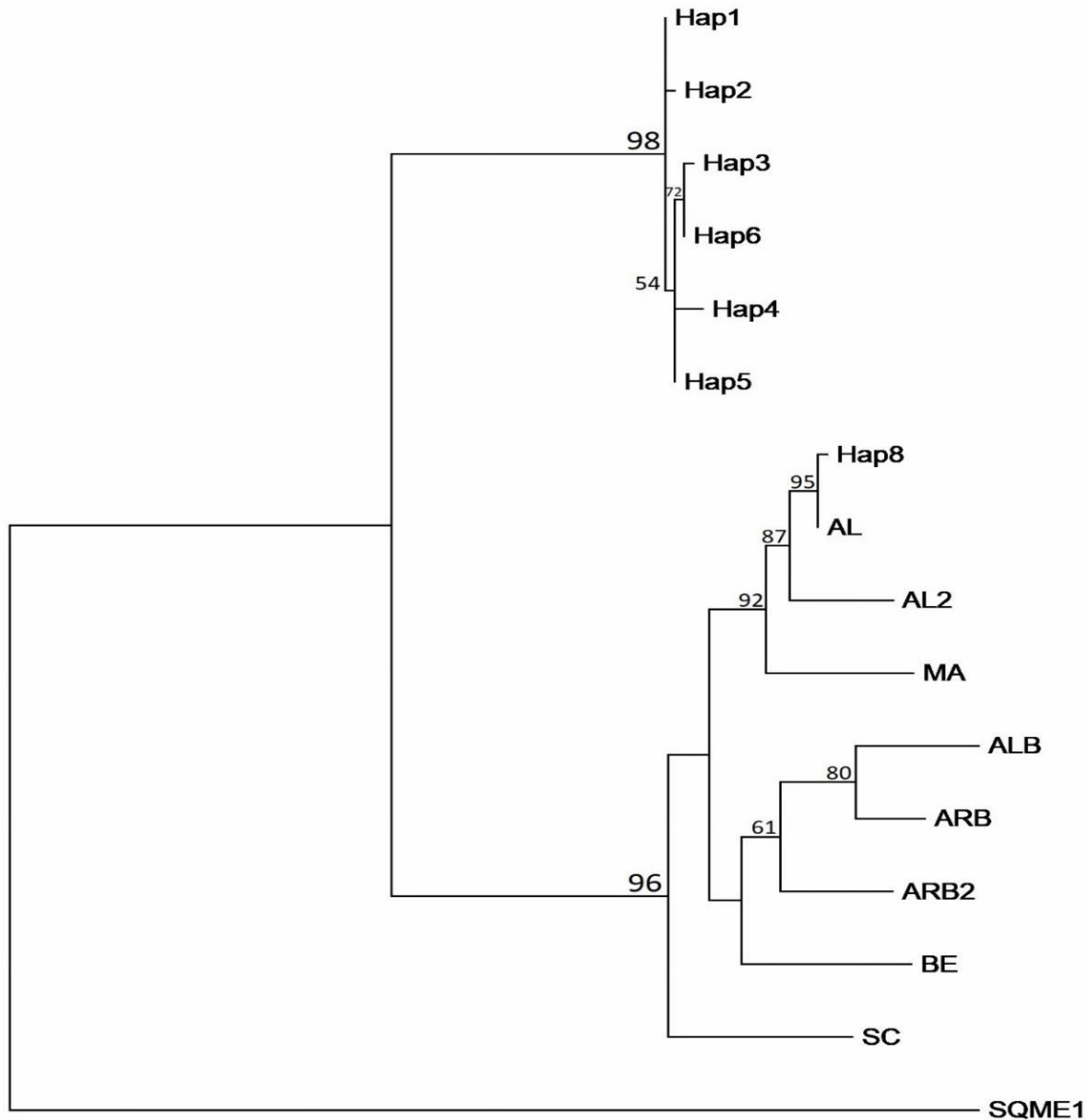
3. Rezultati

3.1. Rezultati filogenetske rekonstrukcije za citokrom *b*

Prema dobivenim filogramima (Slike 3. i 4.), jasno se vidi kako se velika pliska odvojila u monofiletsku liniju. Uočava se i blaga strukturiranost filograma.

Na Slici 5. nalazi se filogenetska mreža koju sam napravila u programu Network, a pomoću koje se mogu utvrditi odnosi između pojedinih haplotipova. Manji crveni krugovi se nazivaju medijskim vektorima, a oni predstavljaju haplotipove koji su prisutni u populaciji ali nisu uzorkovani. Dužina grana te prostor između crvenih krugova odražavaju mutacije nastale između različitih haplotipova. Radi dobivanja ovakvih rezultata sam uvrstila i haplotipove koji nisu uključeni u ostale rezultate, a to su Hap 4, Hap 11 te Hap 1. Iz navedene slike može se uočiti kako je najveći broj mutacija prisutan kod Hap 11 i Hap 4, u odnosu na ostale haplotipove. Ovakav rezultat je posebno iznenađujući budući da haplotipovi jedinki prikupljenih u Mrežnici (Hap 4) pokazuju isto odstupanje u broju mutacija kao i haplotipovi jedinki roda *Alburnus* prikupljenih u Bosni (Hap 11).

Veličine krugova koji predstavljaju haplotipove, označavaju frekvenciju haplotipova, pri čemu se može opaziti visoka frekvencija haplotipova 2 i 3. Općenito možemo vidjeti različite veličine frekvencija među haplotipovima 1,2,3,5,6,7,8,9 i 10.



Slika 3. Prikaz filograma za *cyt b* dobivenog metodom najveće vjerojatnosti, s dodanim podržanim vrijednostima.

Legenda:

Hap 1 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Kupe i Mrežnice (SRMR5 i SRKU4)

Hap 2 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Mrežnice (SRMR8)

Hap 3 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Mrežnice (SRMR9)

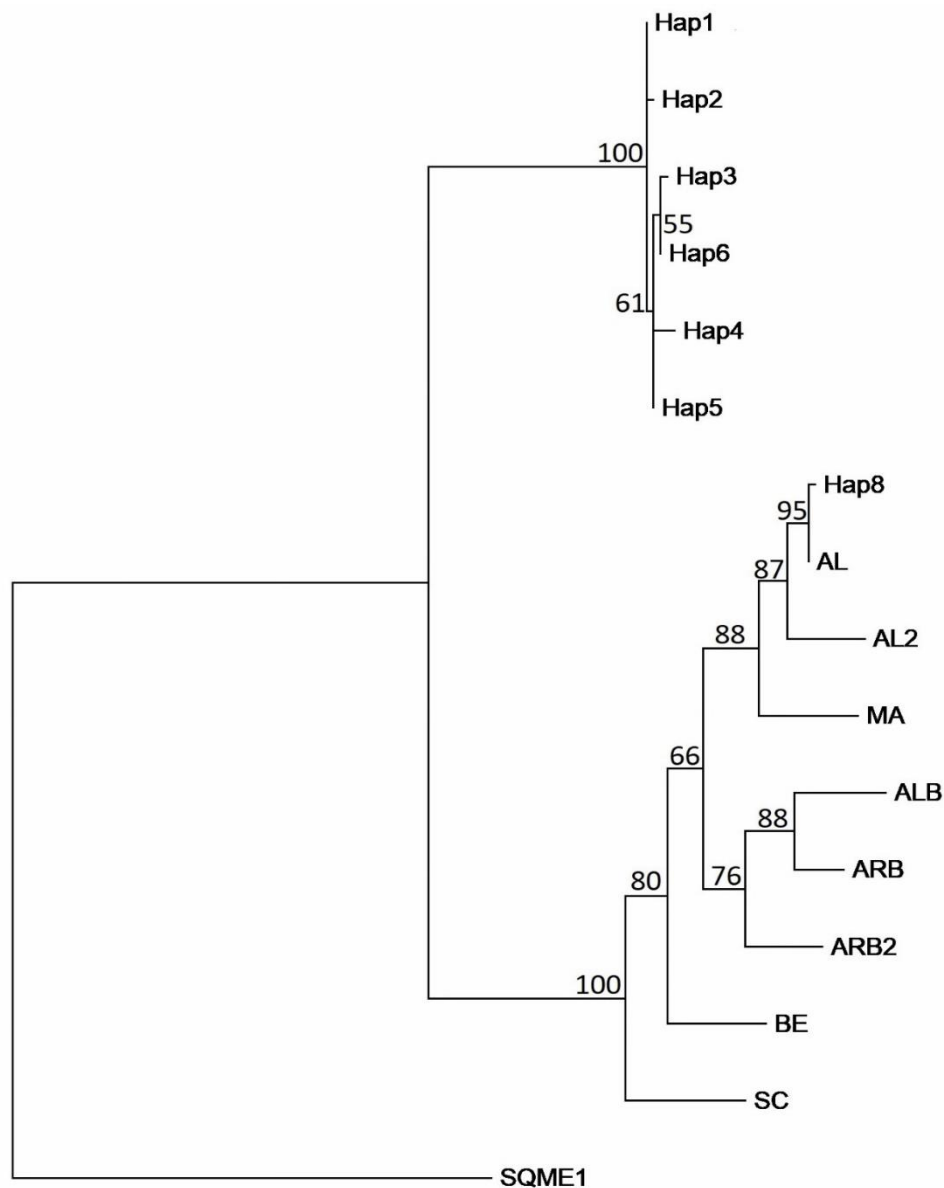
Hap 4 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Kupe (SRKU1)

Hap 5 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Kupe (SRKU2, SRKU3)

Hap 6 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Kupe (SRKU5)

Hap 8 – haplotip roda *Alburnus* s područja Bosne (ALBO1)

Sekvence iz banke gena: **AL** – *Alburnus alburnus*, **AL2** – *Alburnus alburnus 2*, **MA** – *Alburnus macedonicus*, **ALB** – *Alburnus albidus*, **ARB** – *Alburnus arborella*, **ARB2** – *Alburnus arborella 2*, **BE** – *Alburnus belvica*, **SC** – *Alburnus scoranza*, **SQME** – *Squalius cephalus*.



Slika 4. Prikaz filograma za *cyt b* dobivenog metodom najveće parsimonije s dodanim podržanim vrijednostima.

Legenda:

Hap 1 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Kupe i Mrežnice (SRMR5 i SRKU4)

Hap 2 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Mrežnice (SRMR8)

Hap 3 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Mrežnice (SRMR9)

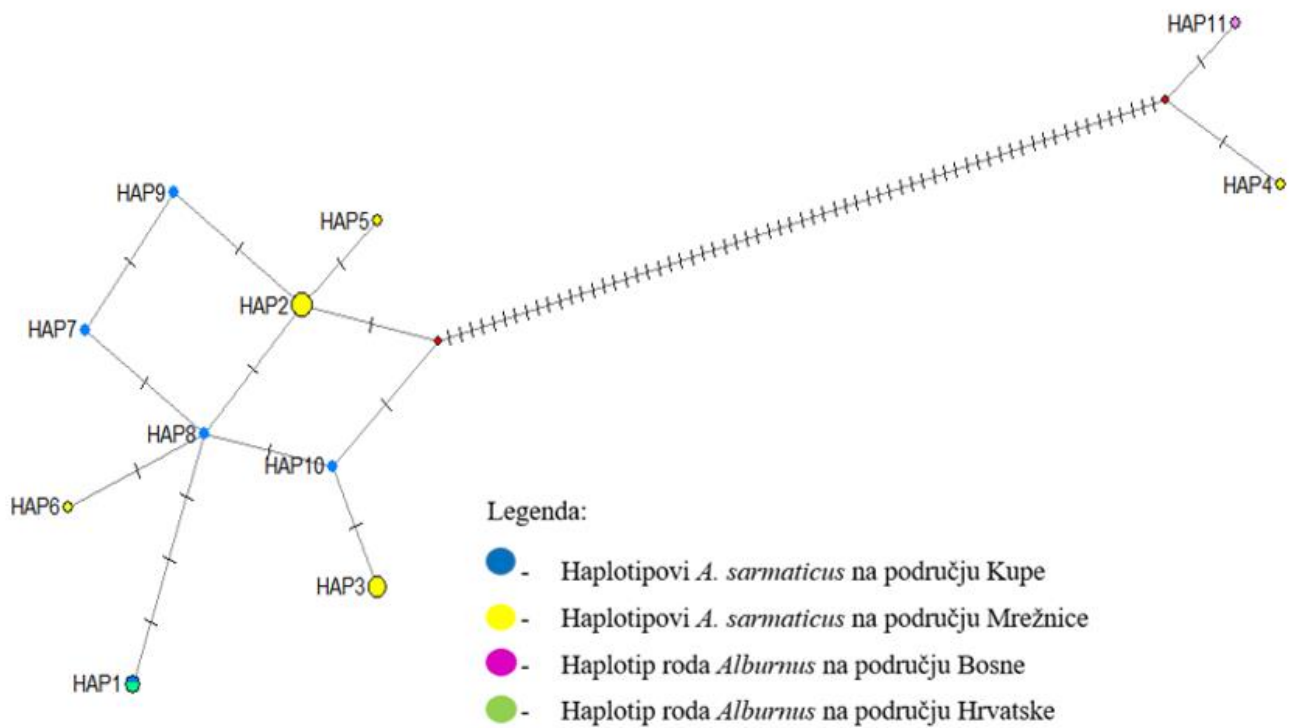
Hap 4 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Kupe (SRKU1)

Hap 5 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Kupe (SRKU2, SRKU3)

Hap 6 – haplotip *A. sarmaticus* s područja Kupe (SRKU5)

Hap 8 – haplotip roda *Alburnus* s područja Bosne (ALBO1)

Sekvence preuzete iz banke gena: **AL** – *Alburnus alburnus*, **AL2** – *Alburnus alburnus 2*, **MA** – *Alburnus macedonicus*, **ALB** – *Alburnus albidus*, **ARB** – *Alburnus arborella*, **ARB2** – *Alburnus arborella 2*, **BE** – *Alburnus belvica*, **SC** – *Alburnus scoranza*, **SQME** – *Squalius cephalus*



Slika 5. Filogenetska mreža za *cyt b* koja prikazuje odnos između haplotipova u veličini frekvencija i broju mutacija, uz legendu objašnjenja lokacija

3.2. Rezultati filogenetske rekonstrukcije za rodopsin

Nuklearni geni su u stanicama prisutni u dvije kopije, zbog čega smo dobili po dvije sekvence za uzorke. Na svim uzorcima su pronađena heterozigotna mjesta, osim za Hap 4.

Filogrami (Slike 6. i 7.) pokazuju odvajanje velike pliske u monofiletsku liniju.

Tablica 5. pokazuje podjelu analiziranih sekvenci gena za rodopsin u haplotipove.

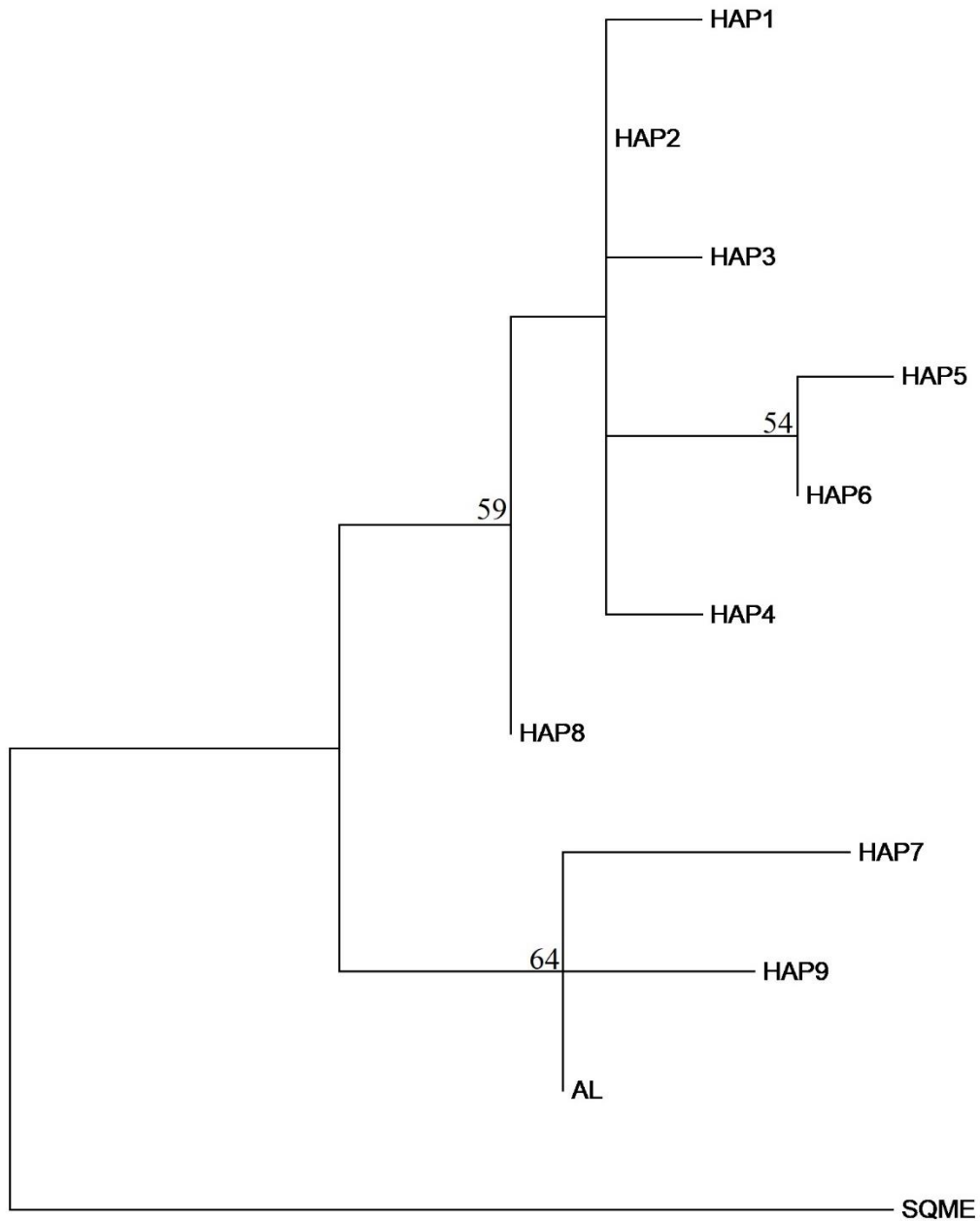
Pomoću programa Network napravila sam filogenetsku mrežu za rodopsin.

Crveni mali krugovi predstavljaju haplotipove koji su u populaciji prisutni ali nisu uzorkovani i nazivaju se medijskim vektorima. Crtice koje su vidljive na granama, a i sama duljina grana pokazuju mutacije nastale među haplotipovima.

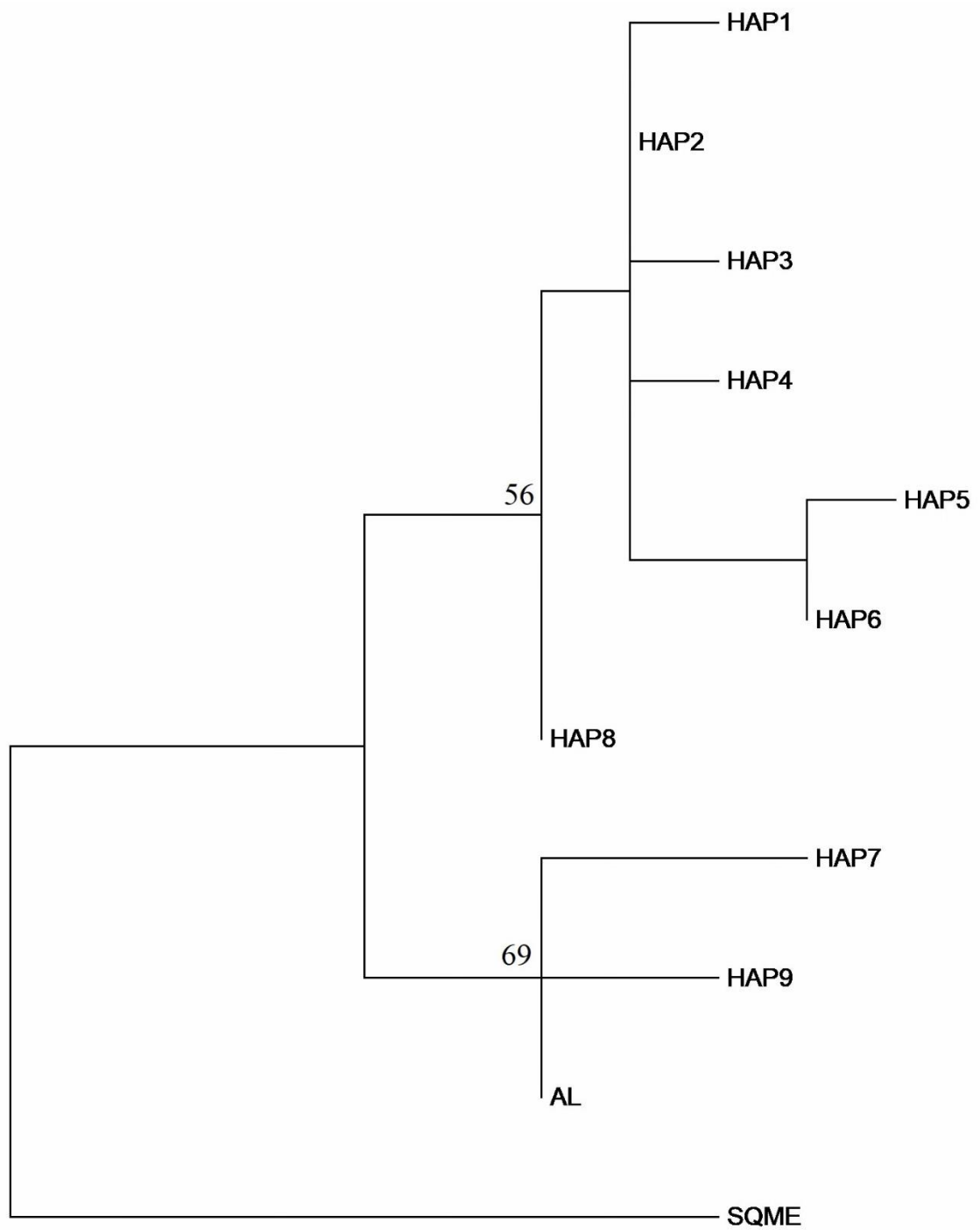
Proučavanjem filogenetske mreže (Slika 8.), primijećuju se uglavnom podjednake učestalosti mutacija među haplotipovima, jedino je malo veći broj mutacija uočljiv kod Hap7 u odnosu na ostale haplotipove.

Tablica 5. Popis haplotipova za rodopsin te naziv kodnih imena sekvenci koje se nalaze unutar haplotipova

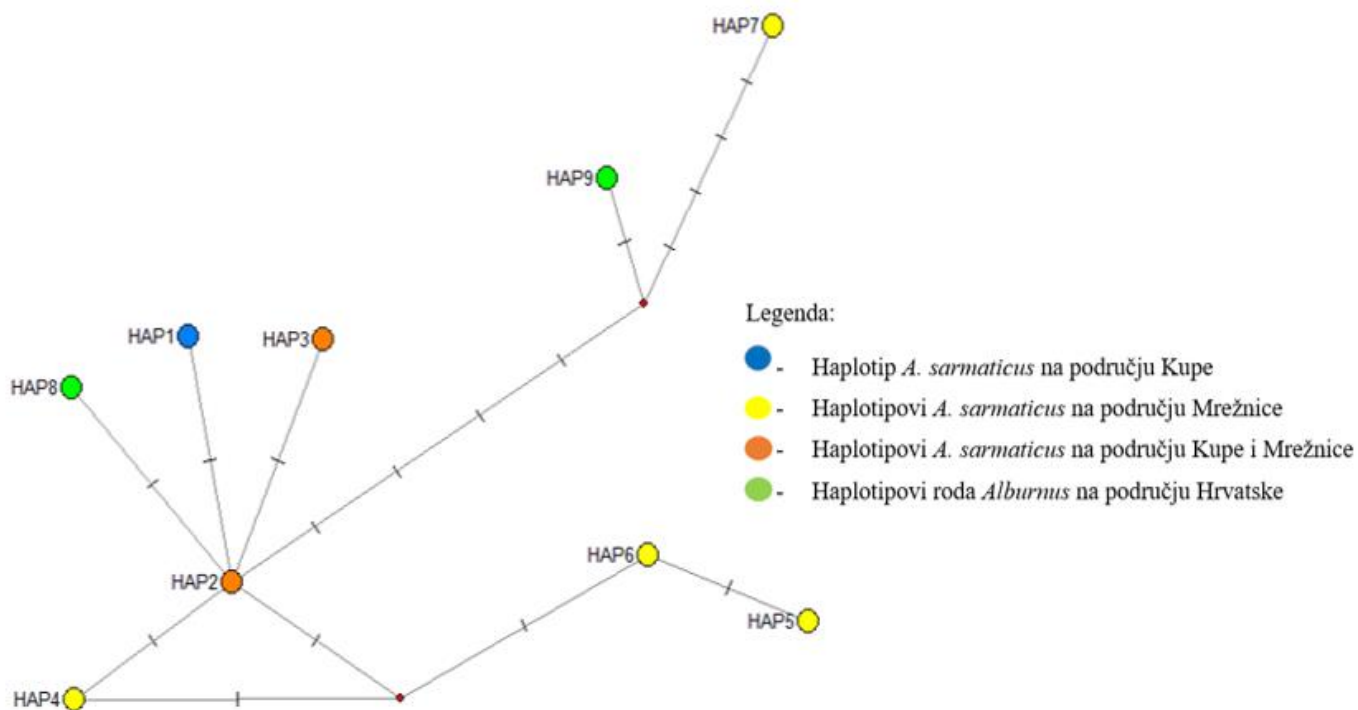
<u>Haplotipovi</u>	Kodna imena
Hap1	SRKU1 1, SRKU2 2
Hap2	SRKU1 2, SRKU2 1, SRKU3 2, SRMR1 1, SRMR2 2, SRMR3 2
Hap3	SRKU3 1, SRMR1 2, SRMR2 1, SRMR3 1
Hap4	SRMR4
Hap5	SRMR5 1
Hap6	SRMR5 2, SRMR7 1
Hap7	SRMR7 2
Hap8	ALSR1 1
Hap9	ALSR1 2



Slika 6. Prikaz filograma za rodopsin dobivenog metodom najveće vjerojatnosti s dodanim vrijednostima podržanosti. Na filogramu se nalaze haplotipovi prikazani u Tablici 5., uz vrste *Alburnus alburnus* te vanjsku skupinu *Squalius cephalus*, koji su preuzeti iz banke gena.



Slika 7. Prikaz filograma za rodopsin dobivenog metodom najveće parsimonije s dodanim vrijednostima podržanosti. Na filogramu se nalaze haplotipovi prikazani u Tablici 5., uz vrste *Alburnus alburnus* te vanjsku skupinu *Squalius cephalus*, koji su preuzeti iz banke gena.



Slika 8. Filogenetska mreža za rodopsin, uz legendu pojašnjenja lokacija za određene haplotipove, koja prikazuje odnose među haplotipovima

3.3. Rezultati analize intrapopulacijske genske raznolikosti za gen *cyt b*

Iz podataka u Tablici 6. može se iščitati da je raznolikost vrste visoka, posebno u rijeci Kupi.

Broj polimorfnih mjesta je veći kod populacije iz Kupe.

Važno je primijetiti i veći ukupan broj mutacija kod populacije s područja Kupe usprkos manjem ukupnom broju sekvenci, u odnosu na populaciju iz Mrežnice.

Raznolikost haplotipova populacije (H_d) iz Kupe je u skladu s njenim većim brojem haplotipova unutar populacije. Nadalje, nukleotidna raznolikost (π), broj polimorfnih mjesta (S) i prosječna raznolikost nukleotida (k) isto tako pokazuju veću vrijednost kod populacije iz Kupe.

Tablica 6. Rezultati dobiveni na temelju provjere genskog polimorfizma u rijekama Mrežnica i Kupa za gen *cyt b*. N – ukupan broj sekvenci, h – broj haplotipova, S – broj polimorfnih mjesta, η - ukupan broj mutacija, H_d – raznolikost haplotipova, π - nukleotidna raznolikost, k – prosječna raznolikost nukleotida.

populacija	N	h	S	η	H_d	π	k
Mrežnica	9	4	5	5	0,75	0,00175	2,000
Kupa	5	5	6	6	1,000	0,00228	2,600
Ukupno	14	9	9	9	0,901	0,00202	2,308

3.4. Rezultati analize intraspecijske i interpopulacijske strukture za gen *cyt b*

Iz prikazanih rezultata u Tablicama 7. i 9., uočava se da je migracija veća iz Kupe u Mrežnicu nego obrnuto.

Općenito je malo migracija, što ukazuje na to da se populacije Mrežnice i Kupe većinom drže svojih staništa.

Za efektivnu veličinu populacije (N_e) za rijeku Kupu nismo mogli dobiti realne vrijednosti, ni za Bayesovu ni za metodu najveće vjerojatnosti (ML), vjerojatno zbog malog broja uzorka. Kod Bayesove metode vrijednosti broja migranata po generaciji (N_m) su točnije nego kod metode najveće vjerojatnosti (Tablice 8. i 10.)

Tablica 7. Izračun broja migranata metodom najveće vjerojatnosti (ML).

Populacija + – populacija koja se uslijed migracije s drugog staništa povećava,

Populacija – populacija koja se uslijed migracije s tog staništa smanjuje,

Θ – umnožak efektivne veličine populacija (N_e) i M parametra

M – parametar koji pokazuje koliko je migracija važnija od mutacije

N_m – broj migranata po generaciji

Populacija+	Populacija	M	Θ	N_m
Mrežnica	Kupa	1,82E+03	0,0015	2,73
Kupa	Mrežnica	1,58E-04	1,79E+04	10,382

Tablica 8. Izračun efektivne veličine populacije metodom najveće vjerojatnosti (ML)

Θ – umnožak efektivne veličine populacija (N_e) i M parametra

μ – stopa mutacije sekvenci po generaciji

N_e – efektivna veličina populacije

*efektivna veličina populacije (N_e) za Kupu pokazala je nerealnu vrijednost

Rijeka	Θ	μ	N_e
Mrežnica	0,0015	0,0000023	652,1739
Kupa	1,79E+04	0,0000023	*

Tablica 9. Izračun broja imigranata Bayesovom metodom

Populacija + – populacija koja se uslijed migracije s drugog staništa povećava,

Populacija – populacija koja se uslijed migracije s tog staništa smanjuje,

Θ – umnožak efektivne veličine populacija (N_e) i M parametra

M – parametar koji pokazuje koliko je migracija važnija od mutacije

N_m – broj migranata po generaciji

Populacija +	Populacija	M	Θ	N_m
Mrežnica	Kupa	352,3	0,00171	60,19713
Kupa	Mrežnica	781,3	0,05012	39,15876

Tablica 10. Izračun efektivne veličine populacije Bayes

Θ – umnožak efektivne veličine populacija (N_e) i M parametra

μ – stopa mutacije sekvenci po generaciji

N_e – efektivna veličina populacije

*efektivna veličina populacije (N_e) za Kupu pokazala je nerealnu vrijednost

Rijeka	Θ	μ	N_e
Mrežnica	0,00171	0,0000023	743,4783
Kupa	0,05012	0,0000023	*

4. Rasprava

Ovaj rad je bio tek drugo istraživanje o genetici vrste *A. sarmaticus* u Hrvatskoj. Pritom su ciljevi istraživanja genske strukture i raznolikosti velike pliske bili utvrditi filogenetski položaj i filogeografski obrazac populacija velike pliske u Hrvatskoj, opisati gensku strukturu velike pliske u Hrvatskoj te odrediti razlike na genskoj razini između populacija velike pliske Mrežnice i Kupe. Također, cilj istraživanja je bio i opisati gensku raznolikost velike pliske u Hrvatskoj i diskutirati njenu važnost za zaštitu ove vrste, kao i provjeriti taksonomski status populacija velike pliske u Hrvatskoj na temelju molekularno genetičkih analiza. Za istraživanje su prikupljeni uzorci vrste *A. sarmaticus* iz rijeka Kupa i Mrežnica.

Nakon odrađene filogenetske rekonstrukcije koja se sastojala od izrade filograma uz dodatak vrijednosti podržanosti i filogenetskih mreža, jasno se uočava pripadnost istraživane vrste monofiletskoj skupini.

Temeljem rezultata dobivenih utvrđivanjem genskog polimorfizma u rijekama Mrežnici i Kupi za gen *cyt b*, može se uočiti visoka genska raznolikost ove vrste. Ukupan broj mutacija kod analiziranih 14 sekvenci iznosio je 9, od čega je ukupan broj mutacija kod populacije iz Kupe iznosio 6, u odnosu na populaciju Mrežnice kod koje je ta vrijednost bila 5. To upućuje na veći broj mutacija nastalih kod populacije iz Kupe.

Do ovakvih rezultata može doći ako su populacije u evolucijskoj prošlosti obitavale u nekadašnjim glacijalnim refugijima, uslijed čega su se mogle povući od eventualnih negativnih utjecaja izvan svoga staništa te se neometano nastaviti dobro razvijati s obzirom da su bile blisko vezane za svoje stanište; (Ćaleta i sur., 2015), na kojem i danas pretežno žive.

Uporabom ovakvih i sličnih vrsta i njihovih pokazatelja genske raznolikosti moguće je pomoći u identifikaciji glacijalnih refugija te rekolonizacijskih puteva (Helfman i sur., 2009).

Još je i Charles Darwin naišao na spoznaju kako su mnoge slatkovodne vrste relikti ranijih doba, koje su uspjele preživjeti u slatkoj vodi jer se ne moraju natjecati protiv naprednih morskih oblika (Pauly, 2004).

Iako velika pliska ne pripada kategoriji endema ili relikta, postoji očiti općeniti potencijal proučavanja slatkovodnih vrsta riba u cilju što bolje spoznaje o evolucijskoj prošlosti, evolucijskim odnosima i načinu sačuvanja bioraznolikosti slatkovodnih ekosustava.

Migracije su bile minimalne, vjerojatno iz razloga što se populacije drže svog staništa, što je opet povezano i s njihovom evolucijskom povijesti i pripadanjem glacijalnom refugiju. Iako su migratorne aktivnosti niske, migracije su ipak učestalije iz Kupe u Mrežnicu.

Razlozi takve manje učestalosti migracija populacija velike pliske mogle bi se javiti uslijed izgradnje neke vrste prepreke koja bi im onemogućila kretanje, kao što su to brane na rijekama uz koje ribe imaju ograničeno kretanje (Mrakovčić i sur., 2006).

S druge strane, opravdano je očekivati veću učestalost kretanja populacija, pogotovo na istraživanim područjima s obzirom da su manja staništa te bi samim time njihova kretanja trebala biti potaknuta mriještenjem riba.

Iako postoje populacije velike pliske koje su anadromne (Kottelat i Freyhof, 1972), to nije slučaj i za populacije koje su istraživane u sklopu ovog rada, s obzirom na dane rezultate.

Budući da je rodopsin nuklearni gen koji je vrlo dobro istražen, napravljena je i analiza filogenetske rekonstrukcije za rodopsin, upravo zbog velike dostupnosti informacija o njegovoj funkciji i molekularnoj evoluciji zbog čega se i smatra idealnim genetskim sustavom (Chang and Campbell, 2000).

S obzirom na nedovoljnu istraženost i osjetljivost vrste *A. sarmaticus* (Ćaleta i sur., 2015), mogla bi postojati prijetnja da ova vrsta postane i ugrožena u budućnosti, ukoliko dođe do nepredvidivih ljudskih djelatnosti, kao što su izgradnje hidroelektrana, ispuštanje toksičnih kemikalija koje sadrže teške metale ili sličnih prepreka koje bi mogle ugroziti neometano kretanje velike pliske.

Nadalje, budući da su rezultati pokazali kako je veći broj mutacija nastao kod populacija iz Kupe, to bi ujedno značilo da populacije s tog područja više pridonose genskoj raznolikosti u odnosu na populacije iz Mrežnice. Ovakav rezultat bi mogao upućivati na štetne ljudske djelatnosti usmjerene na područje Mrežnice te bi po tom pitanju trebalo što brže djelovati.

Iz svih navedenih razloga bi se trebalo više voditi računa o dobrobiti rijeka, ne samo radi očuvanja raznolikosti ove vrste već i općenito svih slatkovodnih vrsta. Bilo bi poželjno napraviti i usporedbu parametara određenih ekoloških čimbenika koji bi za ovu vrstu bili optimalni, na području što više

hrvatskih rijeka te ispitati koji bi uvjeti negativno utjecali na ovu vrstu u slučaju da se uvjeti naglo promijene.

5. Zaključak

S obzirom na sve dobivene rezultate, filograme, filogenetske mreže, gensku raznolikost, gensku strukturu te efektivnu veličinu, može se doći do zaključka da:

1. Populacije *A. sarmaticus* koje obitavaju u rijekama Mrežnici i Kupi pripadaju monofiletskoj liniji što pokazuje da se ova vrsta vrlo dobro održala kroz evolucijsku prošlost te se zato može pretpostaviti da će i u budućnosti ova vrsta opstati.
2. Možemo uočiti visoku gensku raznolikost unutar populacija *A. sarmaticus*, što je pozitivan ukazatelj na dobro očuvanje raznolikosti vrste *A. sarmaticus* u rijekama Mrežnici i Kupi.
3. Migracije jedinke *A. sarmaticus* u rijekama Mrežnici i Kupi su se pokazale minimalnima, što pokazuje kako su populacije usko povezane sa svojim staništem. Jedan od razloga bi mogla biti spriječenost kretanja zbog izgradnji brana ili usred pojave sličnih prepreki. Ipak, iz rezultata se može očitati veća migratorna aktivnost iz Kupe u Mrežnicu nego obratno.
4. Na temelju svih rezultata, a posebice onih vezanih za veliku gensku raznolikost, možemo zaključiti kako postoji velika važnost naših rijeka za očuvanje vrste *A. sarmaticus*, koja inače obitava na fragmentiranom staništu.

6. Literatura

- Anić – Antić Ž., Balen D., Bauman I., Belan – Simić A., Čanjevac I., Čoralić L., Domitrović H., Dugački V., Dugački D., Ferenčić Ž., Geiger V., Gilić N., Glavan D., Gluhak A., Grubiša D., Hemar E., Ilić M., Ivanković M., Jajčević Z., Jakovčić M., Jambrošić K., Jurčić LJ., Karbić D., Korade M., Košutić K., Kovač G., Kukoč J., Kutleša S., Ladić Z., Marijan D., Marković L., Marušić M., Matanić-Živanović K., Muraj A., Njegač D., Orešić D., Pranić M., Spevec D., Štiks I., Tomašek A., Tomašević N., Turković H., Vrčec V., Vujčić-Karlo S., Vujić A., Zlatar A. (2006). *Opća i nacionalna enciklopedija*. Pro leksis d.o.o. i Večernji list d.d., Zagreb.
- Baldauf, S. L. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial, 19: 345-351.
- Behrens – Chapuis, S., Herder, F., Esmaili, H. R., Freyhof, J., Hamidan, N. A., Ozulug, M., Šanda, R., Geiger, M. F. (2015). Adding nuclear rhodopsin data where mitochondrial COI indicates discrepancies – can this marker help to explain conflicts in cyprinids?, *Journal: DNA Barcodes*, 2299-1077.
- Berra, T. (2001). *Freshwater fish distribution*. Academic Press, San Diego.
- Brooks, D. R. i McLennan, D. A. (1991). *Phylogeny, Ecology, and Behavior: A Research Program in Comparative Biology*. *Copeia*, 1991: 1151-1154.
- Chang, B. S. W. i Campbell, D. L. (2000). Bias in phylogenetic reconstruction of vertebrate rhodopsin sequences. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1220-1231.
- Craig, J. F. (2016). *Freshwater Fisheries Ecology*. Wiley Blackwell, Dumfries, Scotland.

- Čaleta, M., Buj, I., Mrakovčić, M., Mustafić, P., Zanella, D., Marčić, Z., Duplić, A., Mihinjač, T., Katavić, I. (2015). Hrvatske endemske ribe. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb.
- Dodds, W. K. i Whiles, M. R. (2010). *Freshwater Ecology: Concepts and Environmental Applications of Limnology*, 2nd edition. Academic Press, San Diego.
- Efron, B. i Gong, G. (1983). A Leisurely Look at the Bootstrap, the Jackknife, and Cross-Validation. *The American Statistician*, 37: 36-48.
- Freyhof, J. i M. Kottelat, (2007). Review of the *Alburnus mento* species group with description of two new species (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 18: 213-225.
- Gabriel O., Lange K., Dahm E., Wendt T. (2005). *Fish Catching Methods of the World*, 4th edition. Blackwell Publishing, Oxford.
- Helfman, G. S., Collette, B. B., Facey, D. E., Bowen, B. W. (2009). *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution and Ecology*. Wiley – Blackwell, West Sussex.
- Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.- M. (2009). *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lipscomb, D. (1998). *Basics of Cladistic Analysis*. George Washington University. Washington D. C.
- Mrakovčić, M., Brigić, A., Buj, I., Čaleta, M., Mustafić, P., Zanella, D. (2006). *Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske*. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska, Zagreb.

- Nei, M. i Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World*, 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Passarge, E. (2007). *Color Atlas of Genetics*, 3rd edition. Thieme, Stuttgart.
- Pauly, D. (2004). *Darwin's Fishes: An Encyclopedia of Ichthyology, Ecology, and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pavlić, K. (2016). *Regionalna hidrološka analiza krškog porječja Kupe*, doktorska disertacija, Zagreb, str. 18-19.
- Posada, D. (2009). *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis*, Humana Press, New York.
- Pough, H. F. i Janis, C. M. (2019). *Vertebrate life*, 10th editio. Oxford University Press, New York.
- Schultz, K. (2003). *Ken Schultz's Field Guide to Freshwater Fish*. Wiley, New Jersey.
- Hršak, V. (2010). *Stručna podloga za zaštitu porječja rijeke Mrežnice*. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb
- Wiley, E. O. i Lieberman, B. S. (2011). *Phylogenetics: Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*, 2nd edition. Wiley – Blackwell, New Jersey.

Internetski izvori:

- Plan upravljanja vodnim područjima – Dodatak I. Analiza značajki Vodnog područja rijeke Dunav, tab. 3.2, <https://www.voda.hr/sites/default/files/dokumenti/dodatak1.pdf>, 26.08.2021.
- The IUCN Red List of Threatened Species, (2021). <http://www.iucnredlist.org/>, 16.08.2021.
- Treer, T. (1992). Genetika riba, Croatian journal of fisheries: Ribarstvo, 47:1-2. <https://hrcak.srce.hr/77086>, 15.08.2021.

7. Životopis

Rođena sam u Zagrebu 26. listopada, 1994. godine.

Završila sam Osnovnu školu Pantovčak (2001. – 2009.), Osnovnu glazbenu školu Vatroslava Lisinskog (2001. – 2007.) te srednju Klasičnu gimnaziju (2009. – 2013.) u Zagrebu.

Upisala sam prirodoslovno – matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije 2014. godine.

Tijekom studiranja sam od 2018. – 2019. godine radila kao vodič u Botaničkom vrtu Prirodoslovno – matematičkog fakulteta.

Od stranih jezika posjedujem znanje engleskog jezika (C1 razina), te španjolskog jezika (B2 razina).