

Genska raznolikost porodice Acipenseridae u Hrvatskoj

Facko, Valentin

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:475615>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Valentin Facko

**Genska raznolikost porodice Acipenseridae
u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Valentin Facko

**Genetic diversity of the family
Acipenseridae in Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta 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 magistar struke znanosti o okolišu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genska raznolikost porodice Acipenseridae u Hrvatskoj

Valentin Facko

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Acipenseridae su uz porodicu Polyodontidae jedini živi predstavnici reda Acipenseriformes. One su među najprimitivnijim ribama koštunjačama te ujedno i zadnji preživjeli predstavnici gotovo potpuno izumrlog nadreda zrakoperki - Chondrostei, tzv. štitonoša. Razni antropogeni pritisci, ali i njihova relativna ekološka osjetljivost, doveli su Acipenseridae u prirodi u vrlo nepovoljan položaj te ih brojne zemlje počinju štiti. Na području Hrvatske, kroz prošlost je zabilježeno 8 vrsta iz porodice Acipenseridae te 1 vrsta iz porodice Polyodontidae, od kojih samo 2 vrste trenutno opstaju u prirodi te su obje klasificirane u ugrožene kategorije prema IUCN-u. Biologija porodice Acipenseridae na našim prostorima nije dovoljno istražena, što predstavlja značajan problem u zaštiti ovih vrsta. Uvid u taksonomsku i gensku raznolikost ovih vrsta kao i njihovu rasprostranjenost prvi je korak prema razvoju daljnjih istraživanja koja će omogućiti njihovu zadovoljavajuću zaštitu. U ovom istraživanju korištene su metode molekularne analize genskog markera citokrom *b* na uzorcima jedinki jesetre i kečige iz divljine i uzgajališta. Napravljene su rekonstrukcije filogenetskog stabla metodama najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti, rekonstrukcija filogenetske mreže metodom susjednog povezivanja, kao i rekonstrukcija stabla evolucijske prošlosti bayesovom metodom. Također su izračunate mjere genske raznolikosti. Rezultati potvrđuju pripadnost uzorkovanih jedinki vrstama *Acipenser ruthenus* i *A. baerii* te ukazuju na zamjetnu razliku u stupnju genske raznolikosti između populacija iz prirode i onih iz uzgajališta.

(45 stranica, 8 slika, 6 tablica, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: jesetra, filogenija, taksonomija, evolucijska prošlost, PCR, citokrom *b*, zaštita

Voditelj: doc. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Ivan Čanjevac
izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
doc. dr. sc. Kristina Pikelj

Rad prihvaćen: 23. veljače 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Genetic diversity of the family Acipenseridae in Croatia

Valentin Facko

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

With the family Polyodontidae, Acipenseridae are the only living members of the order Acipenseriformes. They are amongst the most primitive bony fish and are also the last surviving members of the almost extinct superorder of Actinopterygii - Chondrostei. Different anthropogenic pressures, in combination with their relatively high ecological vulnerability, have led Acipenseridae to a quite unfavorable position, so most countries have started implementing measures for their protection. Historically, there have been 8 recorded species from the family Acipenseridae and 1 from the family Polyodontidae in Croatia, of which only 2 still exist in the wild, both being classified in endangered IUCN categories. The biology of Acipenseridae in Croatia isn't researched enough, which poses a problem in conservation efforts. Gaining insights into their taxonomic and genetic diversity and geographic distribution is the first step for conducting research which will lead to adequate protection of these endangered species. This research uses methods of molecular analysis of the gene marker cytochrome *b* on species of sterlet and sturgeon captured in the wild and from a fishery. Reconstructions of phylogenetic trees using maximum parsimony and maximum likelihood methods, as well as a reconstruction of their phylogenetic network using mutual joining method and a reconstruction of their evolutionary history using Bayesian methods were made. Measures of their genetic diversity were also calculated. The results confirm that the sampled individuals belong to *Acipenser ruthenus* and *A. baerii* species and indicate a much higher degree of genetic diversity of wild populations in comparison to populations bred in fisheries.

(45 pages, 8 figures, 6 tables, 38 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: sturgeon, phylogeny, taxonomy, evolutionary history, PCR, cytochrome *b*, conservation

Supervisor: doc. dr. sc. Ivana Buj

Reviewers: doc. dr. sc. Ivan Čanjevac
izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
doc. dr. sc. Kristina Pikelj

Thesis accepted: February 23rd, 2022

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Općenito o porodici Acipenseridae	1
1.1.1. Taksonomski položaj porodice Acipenseridae.....	1
1.1.2. Biološke značajke predstavnika porodice Acipenseridae	3
1.1.3. Razlozi ugroženosti	4
1.2. Uvod u molekularne metode istraživanja.....	6
2. Ciljevi istraživanja.....	9
3. Područje istraživanja	10
3.1. Terensko istraživanje rijeka dunavskog slijeva.....	10
3.1.1. Istraživanje zimovališta.....	10
3.1.2. Istraživanje hranilišta	11
3.2. Uzgajalište riba „Ribnjaci Kupa“	12
4. Materijali i metode	14
4.1 Uzorkovanje	14
4.1.1. Projekt „Measures“	14
4.1.2. Uzgajalište riba „Ribnjaci Kupa“	14
4.2. Izolacija DNA	15
4.3. Umnažanje DNA fragmenata PCR metodom	16
4.4. Provjera PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu	17
4.5. Sekvenciranje i obrada sekvenci	18
4.6. Rekonstrukcija filogenetskog stabla.....	18
4.7. Rekonstrukcija filogenetske mreže	19
4.8. Rekonstrukcija evolucijske prošlosti.....	19
4.9. Određivanje stupnja populacijske raznolikosti	21
5. Rezultati	22

5.1. Populacijska raznolikost.....	22
5.2. Rekonstrukcija filogenetskog stabla.....	23
5.3. Rekonstrukcija filogenetske mreže	26
5.4. Rekonstrukcija evolucijske prošlosti porodice Acipenseridae	27
6. Rasprava	29
7. Zaključak	32
8. Literatura	33
9. Životopis.....	37

Kratice

IUCN – Međunarodna udruga za zaštitu prirode

CITES – Konvencija o međunarodnoj trgovini ugroženim vrstama flore i faune

PCR – Lančana reakcija polimerazom

mtDNA – mitohondrijska DNA

Cyt *b* – gen za citokrom *b*

MP – Metoda najveće parsimonije

ML – Metoda najveće vjerojatnosti

MJ – Metoda susjednog povezivanja

TBR – Razdvajanje i ponovno povezivanje grana (eng. *Tree Bisection and Re-connection*)

BS – Samopodržavanje (eng. *Bootstrap*)

MCMC – Markov Chain Monte Carlo (algoritam)

1. Uvod

1.1 Općenito o porodici Acipenseridae

1.1.1. Taksonomski položaj porodice Acipenseridae

Carstvo: Animalia (životinje)

Koljeno: Chordata (svitkovci)

Podkoljeno: Vertebrata (kralješnjaci)

Međukoljeno: Gnathostomata (čeljustousnice)

Superrazred: Osteichthyes (koštunjače)

Nadrazred: Actinopterygii (zrakoperke)

Razred: Actinopteri

Podrazred: Chondrostei (štitonoše)

Red: Acipenseriformes (jesetrovke)

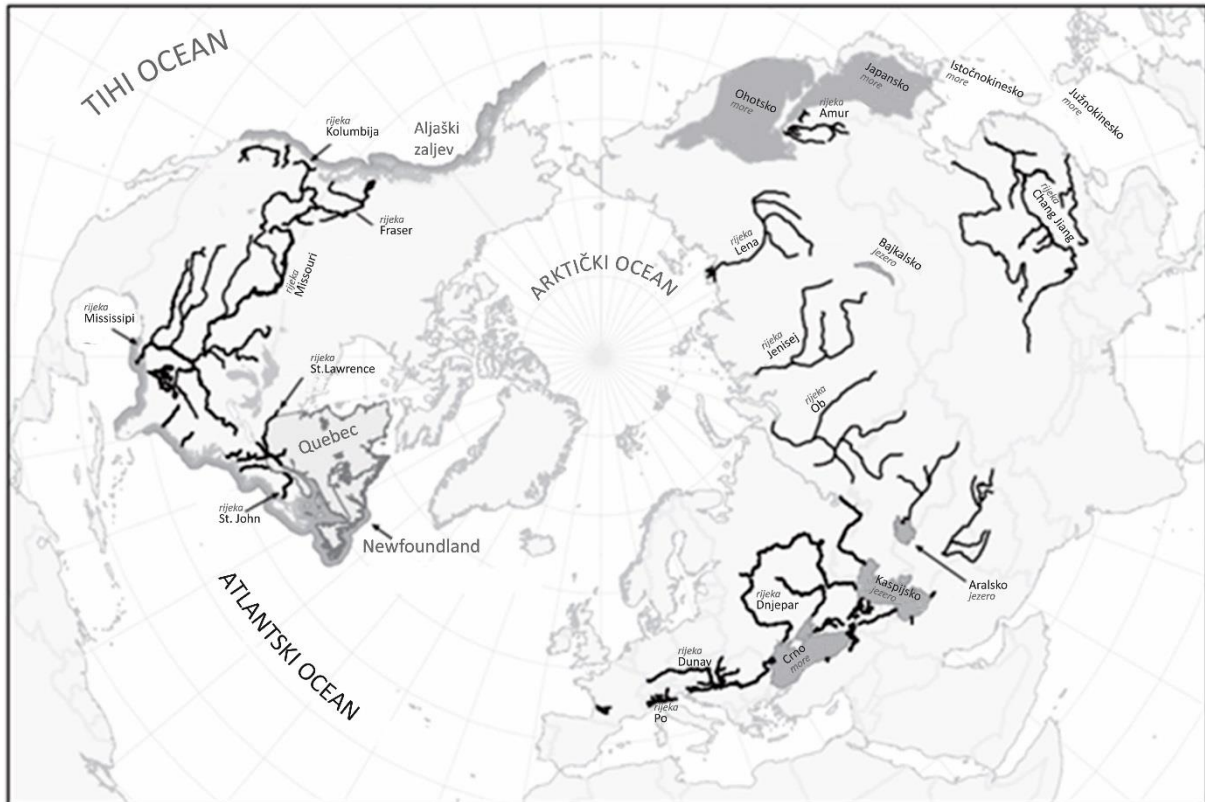
Porodica: Acipenseridae (jesetre)

Nadrazred Actinopterygii (lat. actino – nešto što ima bodlje, grč. πτέρυξ – peraja) je monofiletski takson unutar polifiletske skupine riba koštunjača. Ime su dobile prema svojim karakterističnim perajama, koje su zajedničke svim pripadnicima ove skupine te koje se sastoje od kože podržane sustavom zrakastih, tankih, bodljama-sličnim kostiju. Prvi put se pojavljuju za vrijeme evolucijske radijacije koštunjača u devonu, prije otprilike 400 milijuna godina. Tada su skupine s najvećim brojem vodenih vrsta bili Placodermi i Acanthodii, dok je od novonastalih skupina koštunjača najbrojnija bila Sarcopterygii, međutim krajem devona dogodilo se veliko izumiranje u kojemu je nestao velik broj morskih i kopnenih vrsta te nakon kojega su Actinopterygii postali dominantna skupina vodenih kralješnjaka (Pough i sur., 2013). Prema procjenama, ovaj nadrazred danas sadrži preko 32 000 vrsta, što je raznolikost jednaka ili veća od ukupne raznolikosti svih vrsta vodozemaca, gmazova, ptica i sisavaca (Faircloth i sur., 2013). Takva raznolikost najvećim je dijelom posljedica mehanizma geografske i ekološke specijacije. Dok geografska specijacija podrazumijeva postojanje fizičke barijere između populacija koja bi spriječila protok gena između njih, ona ne može u potpunosti objasniti tako snažnu diverzifikaciju u otvorenom morskom okolišu. S druge strane mehanizam ekološke specijacije omogućuje nastajanje novih vrsta u uvjetima kada je moguć protok gena između

populacija. Naime pri tom mehanizmu, ključnu ulogu preuzima selektivno parenje između jedinki koje su posebno dobro prilagođene lokalnim uvjetima. Takva hipoteza pretpostavlja da sekundarne spolne karakteristike, poput tjelesnih ornamenata, različitih obojenosti i prisustva morfoloških struktura uvjetuje veću vjerojatnost parenja između sličnih organizama i stvaranja potomstva sa sličnim karakteristikama i većom stopom preživljavanja uvjetovanom tim karakteristikama (Pough i sur., 2013). Danas ribe iz skupine Actinopterygii nalazimo u gotovo svim tipovima vodenih staništa te one imaju ključnu ulogu u većini vodenih ekosustava.

Podrazred Chondrostei (grč. χόνδρος – hrskavica, grč. ὀστέον – kost) je parafiletička skupina riba koje karakterizira kostur koji je većinski od hrskavice. Na površini tijela imaju osificirane koštane ploče. Kroz povijest je njihova taksonomija bila podložna promjenama; do sredine 19. stoljeća ih se zbog morfoloških karakteristika poput heterocerkalne repne peraje i hrskavičnog kostura često povezivalo s morskim psima, no kasnije se utvrdilo da su njihovi preci ustvari koštunjače s potpuno osificiranim kosturom te da je ovakva pojava hrskavičnog kostura apomorfno svojstvo. Prvi konkretni fosilni ostaci datiraju iz vremena ranog trijasa, prije otprilike 250 milijuna godina, no zbog nepouzdanog fosiliziranja njihovih hrskavičnih ostataka moguće je da su se razvile i ranije (www.paleos.com). Jedini danas živeći predstavnici ove jedinstvene skupine riba su pripadnici reda Acipenseriformes koji obuhvaća dvije recentne porodice: Polyodontidae i Acipenseridae (Nelson i sur., 2016).

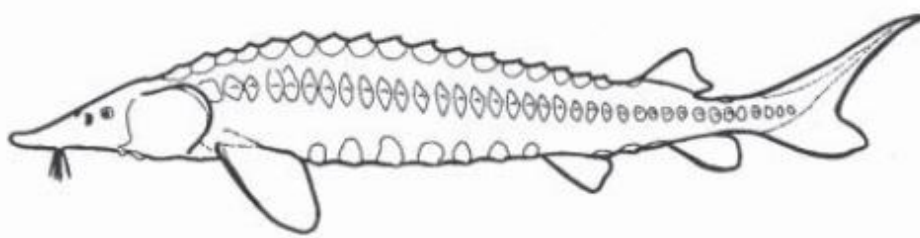
Porodica Acipenseridae (lat. *acipenser* – jesetra) je relativno malobrojna i rijetka skupina riba koja obuhvaća 2 potporodice te svega 4 danas živeća roda. Rodovi *Acipenser* i *Huso* spadaju u potporodicu Acipenserinae, dok rodovi *Scaphirhynchus* i *Pseudoscaphirhynchus* spadaju u potporodicu Scaphirhynchinae (Birstein i sur., 2002; Gesner, 1997). Porodice Acipenseridae i Polyodontidae su se evolucijski razdvojile u razdoblju netom prije kasne krede, otprilike prije malo više od 100 milijuna godina (Birstein i sur., 1997). Vrste iz ove porodice mogu živjeti u različitim morskim, slatkovodnim ili bočatim staništima te su dokumentirane isključivo na Zemljinoj sjevernoj polutci, na područjima Europe, Azije i Sjeverne Amerike (Slika 1) (Pikitch i sur., 2005). Od 25 trenutno živućih vrsta u svijetu, smatra se da na području Hrvatske u divljini trenutno žive stabilne populacije samo 2 vrste: *Acipenser nudiiventris* Lovetsky, 1828 i *Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758 (Ćaleta i sur., 2019). Druge vrste iz ove porodice koje se spominju u ovom istraživanju su: *Huso huso* (Linnaeus, 1758), *Huso dauricus* (Georgi, 1775), *Acipenseri baerii* Brandt, 1869, *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzenburg, 1833, *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836, *Acipenser stellatus* Pallas, 1771 i *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758.



Slika 1 Prostorni raspored vrsta reda Acipenseriformes prilagođeno prema Pikitch i sur., 2005; riječna i morska staništa na kojima su zabilježene su na karti označena crnom, i tamnijom sivom bojom.

1.1.2. Biološke značajke predstavnika porodice Acipenseridae

Karakteristična morfološka svojstva ove porodice su 5 redova koštanih pločica raspoređenih na leđnoj, trbušnoj i bočnim stranama tijela, heterocerkalna repna peraja te prepoznatljiva izdužena glava s 4 taktilna nastavka koji se nalaze anteriorno od protraktilnih usta na ventralnoj strani glave. Ostale morfološke karakteristike specifične za ovu porodicu su prsne peraje sa sraštenim prednjim šipčicama, izostanak zubi kod odraslih jedinki i veliki plivaći mjehur. Dvije vrste iz ove porodice, *Huso huso* i *H. dauricus*, spadaju u najveće slatkovodne ribe te mogu narasti preko 4,2 m. Na slici 2 vidi se skica općenite građe tijela vrsta iz ove porodice (Nelson i sur., 2016).



Slika 2 Skica građe tijela vrsta iz porodice Acipenseridae (Nelson i sur., 2016)

Hrane se u bentičkom dijelu vodenog stupca te su ovisne o kvantiteti i kvaliteti raspoloživog plijena. Plijen hvataju na način da ga plivajući iznad dna napipaju taktilnim nastavcima na glavi te ga potom vrlo uspješno usišu i progutaju zahvaljujući protraktilnim ustima. Manjim vrstama se prehrana sastoji od račića i ličinki kukaca, dok se veće vrste osim sitnijim plijenom mogu hraniti i bentičkim i pelagičkim ribama. Neke vrste koriste svoj tanki izduženi rostrum za kopanje po supstratu u potrazi za hranom. Oči su im relativno male u usporedbi s veličinom tijela te se smatra da ne vrše veliku ulogu u pronalasku hrane (Billard i Lecointre, 2000; Pough i sur., 2013).

Svih 25 vrsta se mrijesti u slatkovodnim staništima, dok 16 vrsta ulazi u estuarije, mora ili oceane kasnije tijekom životnog ciklusa. Mrijeste se jednom u periodu od 2 – 5 godina. Mrjestilišta im karakterizira čvrsta podloga od šljunka, oblutaka ili krupnijih stijena te širok raspon dubina i brzina strujanja vode. Zabilježene dubine mrjestilišta sežu od svega nekoliko metara do preko 20 metara, dok se brzine strujanja vode kreću od 0,5 m/s do preko 2,2 m/s (Pikitch i sur., 2005).

Zanimljivo je da ova porodica ima jedan od najvećih stupnjeva poliploidije kod životinja, u rangu od $4n$ do $16n$, gdje je n haploidni set kromosoma (u pravilu somatske stanice životinjskih organizama imaju diploidni, $2n$ set kromosoma) te da različite vrste mogu imati od 120 do 500 kromosoma (Pikitch i sur., 2005).

1.1.3. Razlozi ugroženosti

Acipenseridae su općenito dugoživuće ribe koje karakterizira kasno spolno sazrijevanje, spor rast i nefrekventno razmnožavanje. Neke vrste mogu doživjeti preko 100 godina starosti, s tim da spolno zrele postaju između 20. i 25. godine, dok kod ženki spolna zrelost može nastupiti čak i kasnije. Ovakve ih karakteristike povezuju s niskim maksimalnim stopama rasta populacija i slabim kapacitetom oporavka populacija te su zbog toga posebno osjetljive na populacijske padove uzrokovane eksploatacijom i antropogenim modifikacijama staništa (Nelson i sur., 2013).

Izgradnja brana i nasipa, stabilizacija obala i kanalizacija rijeka je posebno štetna za populacije jer može smanjiti broj ili u potpunosti eliminirati staništa za mrijest i rast mladi. Također može doći do promjena signalnih hidroloških karakteristika koje imaju ulogu u njihovom životnom ciklusu. Ostali značajniji negativni utjecaji uključuju hibridizaciju, zagađenje okoliša, uvođenje stranih vrsta u okoliš, smanjenje koncentracije hranjivih tvari u okolišu, preusmjeravanja toka

vode te intruzije slane vode u mrjestilišta uzrokovane antropogenim ili prirodnim procesima (Nelson i sur., 2013).

Ekonomski značaj ove vrste kao izvor crnog kavijara (neoplođenih jajašaca) pretvorio je populacije jesetri u Crnom moru i Kaspijskom jezeru u mete brojnih legalnih i ilegalnih ribolovnih operacija, što je dovelo do kolapsa brojnih stabilnih populacija ove porodice na tim prostorima (Nelson i sur., 2013). Ribolovne aktivnosti usmjerene prema ovoj porodici postoje od 5. st. pr. Kr., što je zabilježeno u tekstovima iz starogrčke, rimske i kineske književnosti. Od tada do danas, napredovanjem ribolovne tehnologije i globalnim povećanjem tržišne potražnje, pritisci na ovu porodicu eksponencijalno rastu te u kombinaciji sa sve većom degradacijom staništa rezultiraju iscrpljenim, pretjerano izlovljenim populacijama u cijelom svijetu (Pikitch i sur., 2005).

Prema IUCN Crvenoj listi ugroženih vrsta, od 25 trenutno živućih vrsta iz porodice Acipenseridae u svijetu, samo 2 vrste spadaju u kategoriju najmanje zabrinjavajućih (LC), dok sve ostale vrste spadaju u neku od kategorija ugroženosti. Detaljniji pregled statusa ugroženosti vrsta zabilježenih u Hrvatskoj (prema Čaleta i sur., 2019), trenutnih trendova promjene brojnosti populacija u svijetu, kao i trenutnog stanja njihovih populacija u Hrvatskoj je u Tablici 1.

Sve vrste porodice Acipenseridae, kao i njihovih proizvoda uključene su u dodatak II CITES konvencije od 1. travnja 1998. Njihovo dodavanje u konvenciju je popratila i odluka kojom se pozvalo države članice da podrže znanstvena istraživanja koja bi trebala poboljšati održivost ribarstva jesetri u Euroazijskoj regiji, kao i ograničiti ilegalne i krivolovne aktivnosti usmjerene prema njima. Tom odlukom se također ograničila i količina kavijara koju osoba može nositi preko granice za osobnu uporabu na 250 g (www.cites.org).

Tablica 1 Informacije o populacijama vrsta porodice Acipenseridae na području Hrvatske (IUCN 2021, Čaleta i sur., 2019)

Vrsta	Status ugroženosti	Populacijski trend	Populacije u HR
<i>Acipenser baerii</i>	Ugrožene (EN)	Smanjuju se	Neuspješno uvedene
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Kritično ugrožene (CR)	Smanjuju se	Izumrle
<i>Acipenser naccarii</i>	Kritično ugrožene (CR)	Smanjuju se	Izumrle
<i>Acipenser nudiventris</i>	Kritično ugrožene (CR)	Smanjuju se	Postojeće
<i>Acipenser ruthenus</i>	Osjetljive (VU)	Smanjuju se	Postojeće
<i>Acipenser stellatus</i>	Kritično ugrožene (CR)	Smanjuju se	Izumrle
<i>Acipenser sturio</i>	Kritično ugrožene (CR)	Smanjuju se	Izumrle
<i>Huso Huso</i>	Kritično ugrožene (CR)	Smanjuju se	Izumrle

1.2. Uvod u molekularne metode istraživanja

U posljednjih nekoliko desetljeća, osim proučavanja morfologije, u filogenetskim istraživanjima se sve više koriste molekularne metode i analize, koje pomoću genskih informacija dobivaju detaljnije podatke o srodstvenim odnosima vrsta.

Prema teoriji evolucije, svi organizmi su se od pojave života razvili iz jednog zajedničkog pretka pod utjecajem različitih genetičkih mehanizama kao izvora diverzifikacije. Ti mehanizmi uključuju mutacije, duplikacije gena, reorganizacije genoma i genetičke razmjene poput rekombinacije i horizontalnog prijenosa gena. Tijekom vremena, evolucijskim razdvajanjem taksonomskih kategorija i u konačnici vrsta, sličnost njihovih genskih sekvenci se smanjuje. Međutim, vrste koje imaju relativno nedavnog zajedničkog pretka smatraju se srodnima te se njihove homologne sekvence mogu usporediti i analizirati molekularnim metodama filogenetske analize. Za utvrđivanje odnosa između različitih gena, najvrjedniji izvor informacija su mutacije. Filogenetske analize uspostavljaju odnos između fragmenata gena određivanjem njihove zajedničke prošlosti te im je konačni cilj izrada različitih tipova filogenetskih stabala. Filogenetska stabla su grafički prikazi srodstvenih odnosa između organizama, odnosno njihovih promatranih gena. Ovisno o korištenoj metodi analize i području pojedinog istraživanja, stabla osim svoje topologije nude informacije i o podržanosti grananja i vremenu divergencije (Vandamme, 2009).

Metode koje procjenjuju podržanost stabala koriste kriterij optimalnosti kako bi razmotrile različite topologije stabla dok se ne pronađe ona koja najbolje zadovoljava taj kriterij. Najčešće su korištene metoda najveće parsimonije, metoda najveće vjerojatnosti, metoda susjednog

povezivanja i Bayesove metode. Svaka metoda ima svoje prednosti i mane u vidu preciznosti konačnog rezultata i računskog opterećenja te se prilikom provedbe istraživanja uzima u obzir količina i vrsta podataka za obradu (Vandamme, 2009).

Kod metode najveće parsimonije, optimalno će stablo biti ono koje sadrži najmanje koraka pri prelasku iz jednog stanja u drugo te ono koje minimalizira homoplazije u stablu. U svrhu razumijevanja vjerodostojnosti dobivenog stabla, razvijeni su parametri opisne statistike. Ti parametri su: duljina stabla, indeks konzistencije, indeks homoplazije, indeks retencije te reskalirani retencijski indeks. Duljina stabla nam govori o ukupnom broju koraka (promjenama stanja) koji je potreban da podrži odnose prikazane na stablu, s time da su „kraća“ stabla podržanija od duljih. Indeks konzistencije je mjera koja opisuje koliko se pojedina značajka uklapa u stablo te daje informaciju o relativnoj količini homoplazije. Dobiva se na način da se najmanji mogući broj koraka podijeli s uočenim te je kod potpuno kompatibilnih značajki jednak 1, dok je kod značajki koje pokazuju homoplaziju manji. Indeks konzistencije cijelog stabla jednak je prosječnoj vrijednosti indeksa svih značajki. Indeks homoplazije daje recipročnu informaciju od indeksa konzistencije, te se dobiva na način da se indeks konzistencije oduzme od 1. Osim homoplazije, na stabla mogu utjecati i sinapomorfije, odnosno svojstva koja se pojavljuju kod nekih terminalnih skupina te su naslijeđena od zajedničkog pretka kod kojega su novonastala (autapomorfna). Dio sinapomorfije koja se očekuje na stablu izražava se indeksom retencije. Indeks retencije se dobiva izrazom $(A-B)/(A-C)$, gdje je A - najmanji broj varijabli značajke, B - uočeni broj koraka i C - najmanji mogući broj koraka. Reskalirani retencijski indeks umnožak je indeksa retencije i indeksa konzistencije.

Prilikom provedbe istraživanja bitno je odabrati prigodan fragment DNA za analizu. Poželjno je da stopa mutacije promatranog fragmenta bude dovoljno niska da minimizira varijabilnost unutar iste vrste, ali dovoljno visoka da naglasi varijabilnost između različitih blisko srodnih vrsta. Također je bitno da je dostupna u obilnim količinama i da se može lako prikupiti te da nije podložna insercijama i delecijama kako bi se homologne sekvence što lakše sravnile. Uzevši sve navedeno u obzir, u genetskim istraživanjima na životinjama mitohondrijska DNA (mtDNA) pruža višestruke prednosti nad nuklearnom DNA. Stopa mutacija DNA inverzno je proporcionalna veličini genoma, stoga nuklearna DNA puno sporije mutira u usporedbi s manjim genomom mitohondrija te bi zahtijevala uspoređivanje puno dužih sekvenci nego što je slučaj s mtDNA. Kod životinja mtDNA se pojavljuje kao jedna kružna molekula s dvostrukom zavojnicom te sadrži svega 13 kodirajućih gena za proteine, 2 ribosomalna gena i nekodirajuću kontrolnu regiju. Svaki mitohondrij sadrži nekoliko takvih kružnih molekula,

odnosno nekoliko potpunih setova mitohondrijskih gena (u usporedbi s jednim setom gena u staničnoj jezgri). Budući da svaka stanica ima nekoliko mitohondrija, mtDNA predstavlja obilan izvor genetičkog materijala, čak i kad je količina tkiva uzorka vrlo ograničena. Nadalje, kodirajuća regija za podjedinice transmembranskog mitohondrijskog proteina, citokrom c oksidaze (COI/II), visoko je konzervirana sekvenca koja se pojavljuje u mtDNA svih vrsta koje koriste mehanizam oksidativne fosforilacije za proizvodnju energije, odnosno kod svih eukariota te je jedan od najčešće korištenih genetskih markera za analize (Waugh, 2007).

U filogenetskim analizama koje koriste mtDNA, osim spomenutog markera COI/II drugi najčešće korišteni markeri su: 12S – mitohondrijska 12S rRna, Cyt *b* – citokrom *b*, i CR – kontrolna regija za replikaciju mtDNA (Patwardhan i sur., 2014).

2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su:

- Utvrđivanje taksonomske pripadnosti i srodstvenih odnosa populacija porodice Acipenseridae u Hrvatskoj
- Određivanje genske strukture i raznolikosti vrsta jesetri Hrvatske
- Usporedba genske raznolikosti jesetri iz divljine s onima iz uzgajališta

3. Područje istraživanja

Prikupljeni uzorci dolaze iz dva različita izvora, odnosno područja.

Prvi set uzoraka prikupljen je terenskim istraživanjem u sklopu projekta koji su provodili djelatnici Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu u svrhu upravljanja i obnove vodenih ekoloških koridora za migratorne vrste riba u dunavskom slijevu (Ćaleta i sur., 2021).

Drugi set uzoraka nabavljen je iz uzgajališta „Ribnjaci Kupa“ kod mjesta Draganići.

3.1. Terensko istraživanje rijeka dunavskog slijeva

Slijedeće istraživanje su u potpunosti provodili djelatnici PMF-a te u njemu nisam osobno sudjelovao. Svi navedeni podaci u ovom poglavlju prilagođeni su prema završnom izvješću „Measures – upravljanje i obnova vodenih ekoloških koridora za migratorne vrste riba u dunavskom slijevu“ (Ćaleta i sur., 2021).

Tijekom projekta na unaprijed definiranim područjima rijeke Mure, Save (do Slavenskog broda) i Drave (do Donjeg Miholjca) istraživana su 4 karakteristična (ključna) tipa staništa koja koriste migratorne vrste riba tijekom različitih perioda godine, odnosno različitih životnih stadija. Istraživana staništa uključuju: zimovališta, mrjestilišta, odrastališta i hranilišta.

3.1.1. Istraživanje zimovališta

Prije samog početka terenskih istraživanja analizom dostupnih batimetrijskih podataka, satelitskih snimaka i ortofoto karata definirana su ključna staništa za migratorne vrste. Na temelju navedenih izvora podataka uočene su i prepoznate osnovne hidromorfološke značajke rijeka odnosno odsječaka poput šljunčanih i pješčanih prudova, dubokih meandara i užih dijelova s bržim protokom, koji mogu predstavljati potencijalno odgovarajuća staništa za migratorne vrste. Nakon pregleda i analize kartografskog materijala odabrana su potencijalna ključna mjesta i staništa, za koja su u sljedećem koraku sakupljene detaljnije informacije o izgledu korita, brzini toka, tipu supstrata, izgledu obala i riparijskoj vegetaciji. Osim toga, korišteni su i dostupni batimetrijski podaci kako bi se bolje prepoznala potencijalna zimovališta.

Temeljem navedenih analiza odabrane su lokacije na pojedinim odsječcima rijeka, od kojih je za ovaj diplomski rad relevantna jedino: Sava (nizvodno od Zagreba) – od Rugvice do Lijevoig Dubrovčaka (Slika 3).



Slika 3 Karta lokacija uzorkovanja na rijeci Savi nizvodno od Zagreba (Čaleta i sur., 2021)

Istraživanja potencijalnih zimovališta na rijeci Savi nizvodno od Zagreba vršena su na tri lokacije (Slika 3). Na više mjesta dubina je bila veća od 7 metara, ali najveće zabilježene dubine su bile veće od 15 metara i radilo se o većim udubljenima i rupama u dnu. Mreže su postavljane u veljači 2020. godine. Na svakoj od tri lokacije su postavljene po tri mreže tijekom dana. Tijekom istraživanja ulovljene su mrena (*Barbus barbus* (Linnaeus, 1758)) i kečiga (*Acipenser ruthenus*).

3.1.2. Istraživanje hranilišta

Uzorkovano je na 2 potencijalna staništa za prehranu. Obale su građene od pijeska, sitnog šljunka i krupnog šljunka. U nizvodnom smjeru povećava se udio pijeska i pojavljuje se mali udio mulja. Obale su mjestimično pjeskovite i zemljano - stjenovite (rip-rap). Priobalnu vegetaciju čine drveće, grmlje i trava. Supstrat dna sastoji se od pijeska, šljunka i malih količina detritusa. Udjeli pojedinih komponenata ovise o brzini protoka i morfologiji korita.

Hidromorfološka ocjena za promatrani odsječak rijeke Save nizvodno od Zagreba pokazuje umjereno izmijenjeno stanje. Hidrološko stanje je također umjereno izmijenjeno, a uzdužna

povezanost neprekinuta. Morfološko stanje je također umjereno izmijenjeno. Obale rijeke su umjereno izmijenjene, odsječak je lokalno utvrđen kamenom s umjereno izmijenjenom obalnom vegetacijom. Procesi sedimentacije odražavaju umjereno odstupanje od prirodnog stanja. Lateralna povezanost rijeke s poplavnim područjem je ograničena ili ne postoji.

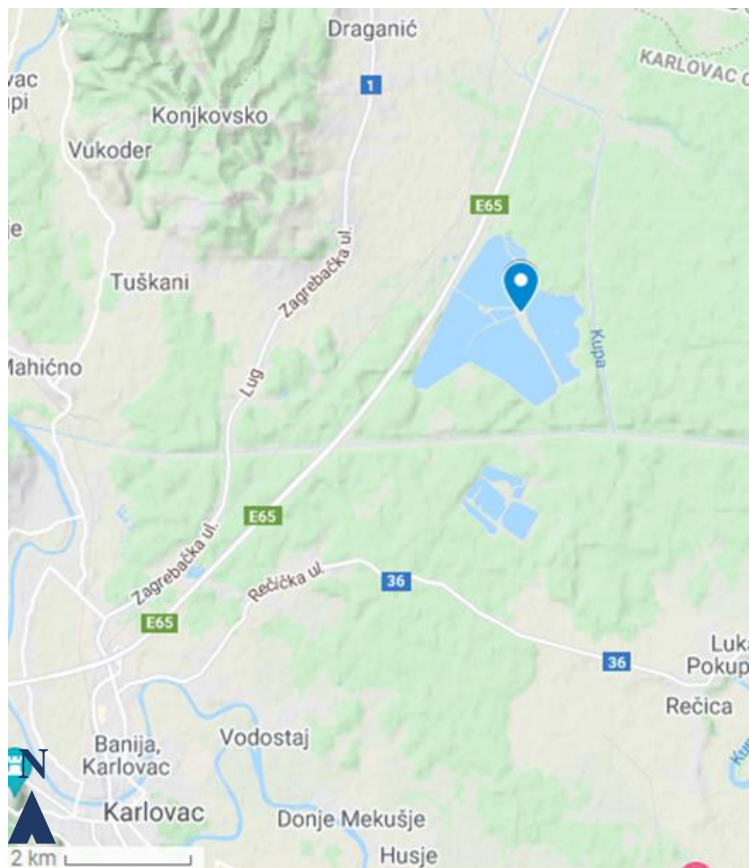
Prosječni godišnji protok na dijelu rijeke Save nizvodno od Zagreba iznosi oko 320 m³/s, dok je prosječna godišnja brzina toka oko 0,8 m/s.

U uzorcima makroskopskih beskralješnjaka nije zabilježena tako velika raznolikost svojiti, a zabilježene su ove skupine: školjkaši (Bivalvia), tvrdokrilci (Coleoptera), rakovi (Crustacea), dvokrilci (Diptera), vodencvjetovi (Ephemeroptera), puževi (Gastropoda), vretenca (Odonata), maločetinaši (Oligochaeta). Najdominantnije svojte/vrste unutar zajednice bile su: *Lithoglyphus naticoides*, *Chironomini* Gen. sp., *Corbicula fluminea*.

Na lokaciji Rugvica mrežama barakudama zabilježene su dvije vrste, mrena (*Barbus barbus*) i kečiga (*Acipenser ruthenus*).

3.2. Uzgajalište riba „Ribnjaci Kupa“

Uzgajalište riba nalazi se sjeveroistočno od Karlovca, u blizini mjesta Draganić (Slika 4). Ribnjaci su sukcesivno građeni na močvarnom području, koje je formirano krčenjem šume, uz lateralne kanale Blatnicu i Bukovac. Površina ribnjaka je 424 ha, od čega je 375 ha vodena površina, dok preostalih 49 ha uključuje odvodne kanale, nasipe, prilazne ceste, hidrotehničke objekte i ekonomsko dvorište. Uzgajalište se sastoji od 7 ribnjaka za uzgoj, jednog rastilišta, jednog ribnjaka za prezimljavanje (zimnjaka) i 4 sportska ribnjaka. Nalazi se na povoljnoj lokaciji koja omogućuje konstantno napajanje optimalnom količinom vode, čak i u sušnim periodima. Uz ostale ribe, od kojih su najzastupljeniji šarani, uzgajaju se i jesetre i kečige te je godišnji uzgojni kapacitet ribnjaka oko 500 tona ribe (www.ribnjaci-kupa.hr).



Slika 4 Karta lokacije oko uzgajališta; "Ribnjaci Kupa" označeni plavim markerom

4. Materijali i metode

4.1 Uzorkovanje

4.1.1. Projekt „Measures“

Vršila su se uzorkovanja na područjima prepoznatim kao potencijalna zimovališta i hranilišta. Uzorkovanja riba na potencijalnim zimovalištim vršena su pomoću 25-30 metara dugih i 1,2-2 metra visokih mreža tzv. barakuda, čija je veličina otvora oka unutrašnjeg sloja bila 40-60 mm, dok je veličina otvora oka vanjskog sloja bila 200 mm. Na Savi nizvodno od Zagreba mreže su postavljane u jutarnjim satima i podizane nakon 4-5 sati kako bi se izbjeglo ugibanje migratornih vrsta (posebno kečige) i krađa mreža od strane krivolovaca.

Za uzorkovanje riba na potencijalnim hranilištima korišteni su pridneni parangali dugi 10 metara. Svaki je parangal imao deset udica na kojima su se kao mamac koristili sitna riba, komadići ribljeg fileta ili tzv. kalifornijski crvi (maločetinaši iz roda *Eisenia*). Na svakom potencijalnom mjestu postavljena su 2 parangala, jedan s većim (# 1/0) i jedan s manjim (# 8) udicama. Postavljeni su popodne i podignuti slijedećeg jutra. Na odsječku Sava nizvodno o Zagreba, kao dopunska metoda uzorkovanja korišten je i elektroribolov iz čamca kako bi se utvrdila prisutnost migratornih vrsta riba na hranidbenim staništima (Ćaleta i sur., 2021).

Svim uhvaćenim ribama odrezan je komadić prsne peraje, koji je potom pohranjen u označene epruvetice. Pregled uzoraka prikupljenih tokom ovog projekta vidljiv je u Tablici 2.

4.1.2. Uzgajalište riba „Ribnjaci Kupa“

Iz uzgajališta je naručeno nekoliko jesetri i kečiga. Nakon što su zamrznute ribe dopremljene u laboratorij, svakoj sam odrezao komadić prsne peraje i pohranio ga u označenu epruveticu. Prilikom uzorkovanja, radi dosljednosti i kvalitete uzoraka, nastojao sam svakoj ribi napraviti rez na istom mjestu prilikom čega sam izbjegavao oštećena tkiva. Nakon uzimanja uzoraka, ribe su pospremljene u zamrzivač na fakultetu za daljnja istraživanja. Pregled uzoraka nabavljenih iz uzgajališta vidljiv je u Tablici 2.

Tablica 2 Pregled podataka o uzorcima korištenim u istraživanju

Vrsta	Porijeklo	Porječje	Lokalitet	Broj uzoraka	Haplotipovi
<i>A. ruthenus</i>	Divlja populacija	Sava	Dubrovčak	10	SAV 1-6, SAV 10
	Divlja populacija	Sava	Jasenovac	3	SAV 1
	Divlja populacija	Sava	Prevlaka	5	SAV 7, SAV 8
	Divlja populacija	Sava	Rugvica	2	SAV 9
	Uzgoj	Kupa	Uzgajalište Kupa	10	KUP 1
<i>A. baerii</i>	Uzgoj	Kupa	Uzgajalište Kupa	10	KUP 2

4.2. Izolacija DNA

Pripremio sam prazne epruvetice označivši ih poklopce kodovima prema laboratorijskom protokolu na način da mogu pratiti uzorke. Dijelove uzoraka peraje, koje sam rezanjem dimenzionirao na površinu otprilike 0,5 cm², rasporedio sam u epruvetice i pritom bilježio koji uzorak stavljam u koju epruveticu. Između rezanja svakog uzorka očistio sam škare i pincetu etanolom kako bih izbjegao međusobnu kontaminaciju uzoraka.

U daljnjim postupcima koristio sam DNeasy Blood & Tissue Kit tvrtke QIAGEN te sam sve korake radio prema propisanom protokolu. U epruvetice s uzorcima dodao sam 180 µL pufera ATL koji ima ulogu razaranja tkiva uzorka. Potom sam dodao 20 µL proteinaze K koja služi za razaranje stanične strukture i membrana. Epruvetice sam zatim stavio na aparat za miješanje uzoraka te sam ih na njemu držao 20ak sekundi kako bi se kemikalije i tkivo optimalno izmiješali. Pri tome sam pazio da nakon miješanja komadići tkiva ne ostanu zalijepljeni na stjenku epruvetice. Nakon miješanja, epruvetice sam stavio na stalak od stiropora i uronio ih u vodenu kupelj temperature 56 °C, gdje će ostati 24 sata.

Idući dan sam izvadio uzorke iz kupelji i vizualno prekontrolirao da je u epruveticama ostala samo tekućina, bez komadića tkiva. Sve uzorke sam ponovno stavio na aparat za miješanje uzoraka 10ak sekundi da se promiješaju. U uzorke sam zatim dodao 200 µL pufera AL, stavio ih na aparat za miješanje uzoraka 10ak sekundi te potom dodao 200 µL etanola i ponovo izmiješao pomoću aparata 10ak sekundi.

Pripremio sam set epruvetica s membranom te ih označio istim brojevima kao i epruvetice s uzorcima. Epruvetice s membranom sastoje se od dva dijela koja se međusobno mogu odvojiti

– gornji dio koji u dnu ima membranu i donji dio koji služi za prikupljanje membranom filtrirane tekućine. Gornji dijelovi epruvetice s membranom kompatibilni su, odnosno mogu sjesti u donje dijelove drugih epruvetice, kao i u druge epruvetice za skupljanje uzorka. Pomoću automatske pipete uzeo sam 650 μL tekućine iz svake epruvetice s uzorkom u epruveticu s membranom, pri tome mijenjajući nastavak pipete između svakog pipetiranja kako bih spriječio međusobnu kontaminaciju uzoraka. Epruvetice s membranom stavio sam u uređaj za centrifugu na 8000 rotacija u minuti (rpm) na 1 minutu. Nakon centrifugiranja, donji dio epruvetice s tekućinom sam odlio i bacio, dok sam gornji dio s membranom prebacio u novi donji dio. Potom sam u epruvetice dodao 500 μL pufera AW1 i ponovno stavio u uređaj za centrifugu na 8000 rpm na 1 minutu. Ponovo sam odlio i bacio donji dio, dok sam gornji dio prebacio u novi donji dio. U epruvetice sam zatim dodao 500 μL pufera AW2 i stavio ih u uređaj za centrifugu na 14000 rpm na 3 minute. Ponovio sam postupak s izlivanjem i bacanjem donjeg dijela, a gornje dijelove sam ovaj put prebacio u novi set prethodno označenih epruvetice za skupljanje uzorka. Dodao sam 150 μL pufera AE i ostavio ih na sobnoj temperaturi nekoliko minuta, potom sam ih stavio u uređaj za centrifugu na 8000 rpm na 1 minutu. Ovaj put nakon centrifugiranja bacio sam gornje dijelove s membranom, čime su mi ostale epruvetice za skupljanje uzorka s izolatom DNA.

4.3. Umnažanje DNA fragmenata PCR metodom

Označio sam set malih PCR epruvetice prema laboratorijskom protokolu kako bih mogao pratiti uzorke. U svaku epruveticu dodao sam 4 μL DNA izolata koristeći automatsku pipetu, pri čemu sam mijenjao nastavke kako bih izbjegao međusobnu kontaminaciju uzoraka.

Kako bih izolat DNA pripremio za PCR reakciju, u svaku epruveticu dodao sam još dvije mješavine kemikalija – 12,5 μL glavne mješavine (eng. *master mix*) i 8,5 μL mješavine s početnicama (eng. *primer mix*), što je u kombinaciji s DNA izolatom dalo konačni volumen mješavine od 25 μL u svakoj epruvetici. Glavna mješavina sadrži optimalne koncentracije reagensa potrebnih za provođenje PCR-a poput DNA-polimeraze, slobodnih nukleotida i puferskog medija te ju nije potrebno posebno pripremati. Mješavina s početnicama sastoji se od početnica (eng. *primers*) koje određuju koji dio DNA želimo umnožiti i transkripcijskog pojačivača ili vode te ga je potrebno posebno pripremiti ovisno o potrebama pojedinog PCR-a. Početnice koje sam koristio za umnažanje *cyt b* bile su L-cyp i H-cyp te su obje bile prisutne u jednakom omjeru (Tablica 3).

Nakon što sam pripremio uzorke za PCR, stavio sam ih u PCR uređaj na program predviđen za optimalno umnažanje *cyt b* gena. Detaljniji pregled sadržaja PCR epruvetice i programa PCR mašine je u Tablici 3.

Tablica 3 Pregled korištenih materijala i metoda u PCR-u

Sadržaj PCR epruvetica	V (DNA) = 4 μ L V (glavna mješavina) = 12,5 μ L V (mješavina s početnicama) = 8,5 μ L V (ukupno) = 25 μ L
Primer mix	V (L-cyp) = 2 μ L V (H-cyp) = 2 μ L V (voda) = 4,5 μ L
Početnice	L-cyp: GAYTTGAARAACCAAYCGTTG H-cyp: CCTAGCTTTGGGAGYTAGG
PCR program	1X (10 min, 95°C) 35X $\left\{ \begin{array}{l} 45 \text{ s, } 92^\circ\text{C} \\ 90 \text{ s, } 48^\circ\text{C} \\ 105 \text{ s, } 72^\circ\text{C} \end{array} \right.$ 1X (7 min, 72°C)

4.4. Provjera PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu

Nakon završetka PCR-a, uspješnost umnažanja sam provjerio metodom elektroforeze na agaroznom gelu. U Erlenmayerovu tikvicu stavio sam 1 g agaroze i 100 mL 1 % TAE pufera. Sastav pufera TAE je tris(hidroksimetil)aminometanska baza, octena kiselina i EDTA, odnosno etilendiamintetraoctena kiselina. Sadržaj tikvice sam pomiješao čistim staklenim štapićem i ostavio 5 minuta na sobnoj temperaturi, potom sam tikvicu grijao u mikrovalnoj pećnici 2 minute. Nakon što se gel nekoliko minuta hladio, ulio sam ga u kalup i umetnuo češljice kako bi u gelu ostale jažice u koje ću kasnije dodati PCR produkte. Nakon što sam provjerio da u gelu nema mjehurića i ostalih nečistoća, ostavio sam ga 25 minuta da se potpuno ohladi i stisne. Nakon što se gel ohladio, izvadio sam češljice i u jažice automatskom mikropipetom stavio 4 μ L PCR produkata, mijenjajući nastavke između svakog uzorka kako bih spriječio međusobnu kontaminaciju. U posljednju jažicu u redu stavio sam 4 μ L ogleadne mješavine DNA fragmenata (eng. *Gene Ruler*). Nakon što sam završio s dodavanjem produkata u gel, preselio sam ga u posudu za elektroforezu i priključio elektrode pazeći na smjer kretanja elektrona. Na aparatu

sam namjestio parametre za elektroforezu na 120 V, 400 mA i 30 minuta. Gel sam potom fotografirao pod UV svjetlosti i vizualno prekontrolirao položaj i strukturu vidljivih bandova.

4.5. Sekvenciranje i obrada sekvenci

Uspješni PCR produkti pročišćeni su i sekvencirani u servisu *Macrogen Europe*. Dobivene sekvence obradio sam u programu BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999). Pri obradi, fragmente sekvenci sravnio sam uz pomoć ogledne sekvence vrste *Acipenser ruthenus* za *cyt b* preuzete iz Banke gena. Pri sravnjivanju uzimao sam u obzir kromatograme sekvenci kako bih u postupku minimalizirao mogućnost greške. Sravnjene sekvence koristio sam u svim daljnjim postupcima.

4.6. Rekonstrukcija filogenetskog stabla

Za rekonstrukciju filogenetskog stabla promatranih jedinki jesetri koristio sam metodu najveće parsimonije (MP, prema eng. maximum parsimony) i metodu najveće vjerojatnosti (ML, prema eng. *maximum likelihood*). Za provedbu analize koristio sam programe MEGA v.10.2.6 (Tamura i sur., 2007) i PAUP v.4.0a169. (Swofford, 2002). MP i ML analize provedene su pod heurističkim modelom uz nasumičan redoslijed unošenja taksi te preklapanje grana TBR pristupom. TBR je skraćenica od engleskog pojma Tree Bisection and Re-connection te taj pristup podrazumijeva aproksimaciju rješavanja problema grananja „rezanjem“ stabla što bliže polovici te „nacjepljivanjem“ na svaku od preostalih grana dok se ne pronade najizglednije stablo za najveći broj taksa (www.mun.ca).

Sva mjesta kodona i sve nukleotidne supstitucije su prilikom analize imali jednaku težinu. Podržanost grananja je utvrđena analizom samopodržavanja, odnosno BS (eng. *Bootstrap analysis*). Za MP analizu postavio sam 1000 BS ponavljanja, dok sam za ML analizu postavio 100 BS ponavljanja te je prilikom obje analize rađeno 10 replika dodatnih sekvenci.

Osim haplotipova dobivenih analizom sekvenci mojih uzoraka, u filogenetsku rekonstrukciju su uključene i sekvence drugih vrsta porodice Acipenseridae preuzete s internetskog servisa Banke gena GenBank (Tablica 4). Za ukorjenjivanje stabala korištena je sekvenca vrste *Salmo* sp.

4.7. Rekonstrukcija filogenetske mreže

Za rekonstrukciju filogenetske mreže koristio sam metodu zajedničkog povezivanja (MJ). Prednost ove metode je što daje rezultat koji je pogodniji za vizualizaciju blisko srodnih jedinki, pogotovo kad postoji mogućnost horizontalnog prijenosa gena. Analizu sam proveo pomoću programa Network v.10.2.0.0 (Fluxus technology ltd.). U rekonstrukciji sam osim haplotipova svojih uzoraka koristio i već spomenute sekvence preuzete iz Banke gena (Tablica 4).

4.8. Rekonstrukcija evolucijske prošlosti

Evolucijsku prošlost sam rekonstruirao Bayesovom metodom pomoću programa iz paketa BEAST (Drummond i sur., 2012). Kao i u prethodnim analizama, osim haplotipova dobivenih analizom sekvenci svojih uzoraka, koristio sam i sekvence preuzete iz Banke gena (Tablica 4), dok je za ukorjenjivanje stabla korištena sekvenca vrste *Salmo* sp. Za rekonstrukciju evolucijske prošlosti, program koristi Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritam te omogućuje korištenje različitih supstitucijskih modela i tipova molekularnih satova sa specifičnom stopom mutacije. Supstitucijski model predviđa stopu zamjene (supstitucije) nukleotida na određenom mjestu, kao i raspored tih zamjena na promatranom dijelu DNA. Korišteni model, Hasegana – Kishono – Yano (HKY) model supstitucije predviđa frekvencije pojave nukleotida različite od očekivanih 25 %, te različite stope pojave tranzicija i transverzija, odnosno različite modele heterogenosti nukleotidnih mjesta. Modeli molekularnog sata omogućuju primjenu stope mutacija pri rekonstrukciji filogenetskog stabla, pri čemu opušteni model sata omogućuje blage devijacije od postavljene stope pri rekonstrukciji pojedinih grana stabla. Zbog nedostatka preciznijih literaturnih navoda o stopi mutacije mitohondrijske DNA za porodicu Acipenseridae, koristio sam stopu mutacije za porodicu Salmonidae (Crête-Lafrenière i sur., 2012). Koristeći program BEAUti (eng. Bayesian Evolutionary Analysis Utility) v.1.10.4 podesio sam sljedeće parametre analize: HKY model supstitucije s očekivanom frekvencijom baza i gamma modelom heterogenosti nukleotidnih mjesta, opušteni molekularni sat i stopu mutacije 0,31 %, te 10 000 000 ponavljanja MCMC algoritma, s uzorkovanjem svakih 1000 generacija. Karakteristika MCMC algoritma je smanjena preciznost početnih rezultata pa je prvih 1000 stabala odbačeno iz analize (eng. *burn in*). Sama analiza se prema podešenim parametrima odvijala u programu BEAST v.1.10.4. Po završetku analize, dobivene podatke o konzensusnom filogenetskom stablu sam grafički prikazao i uredio pomoću programa TreeAnnotator v1.10.4 i FigTree v.1.4.4.

Tablica 4 Popis korištenih sekvenci preuzetih iz Banke gena

Vrsta	Pristupni kod	Lokalitet	Duljina sekvence	Referenca
<i>Acipenser ruthenus</i> 1	MG648475.1	Srednji tok Dunava - Slovačka	1100	(Pekarik i sur., 2017) (neobjavljeno)
<i>A. ruthenus</i> 2	MG648474.1	Srednji tok Dunava - Slovačka	1100	(Pekarik i sur., 2017) (neobjavljeno)
<i>A. ruthenus</i> 3	MG648473.1	Srednji tok Dunava - Slovačka	1100	(Pekarik i sur., 2017) (neobjavljeno)
<i>A. ruthenus</i> 4	MG648472.1	Srednji tok Dunava - Slovačka	1100	(Pekarik i sur., 2017) (neobjavljeno)
<i>A. gueldenstaedtii</i> 1	AJ277594.1	Volga	1141	(Jenneckens i sur., 2001)
<i>A. gueldenstaedtii</i> 2	AJ277595.1	Volga	1141	(Jenneckens i sur., 2001)
<i>A. gueldenstaedtii</i> 3	KC130093.1	Giresun, Crno more, Turska	1141	(Ciftci i sur., 2012) (neobjavljeno)
<i>A. gueldenstaedtii</i> 4	AJ563386.1	Kaspijsko more, Turska	1141	(Birstein i sur., 2003) (neobjavljeno)
<i>A. stellatus</i>	KC130109.1	Samsun, Crno more, Turska	1141	(Ciftci i sur., 2012) (neobjavljeno)
<i>A. sturio</i> 1	AJ245839.1	Gironde, Francuska	1170	(Ludwig i sur., 2000)
<i>A. sturio</i> 2	FJ974043.1	Turska	1048	(Keskin, 2009) (neobjavljeno)
<i>A. nudiventris</i> 1	FJ974041.1	Turska	1048	(Keskin, 2009) (neobjavljeno)
<i>A. nudiventris</i> 2	AJ245832.1	Jug Kaspijskog mora	1171	(Ludwig i sur., 2000)
<i>A. baerii</i>	FJ010862.1	Lena	917	(Skurikhina i sur., 2010)
<i>Huso huso</i> 1	AJ245840.1	Kaspijsko more	1170	(Ludwig i sur., 2000)
<i>H. huso</i> 2	KC130116.1	Giresun, Crno more, Turska	1141	(Ciftci i sur., 2012) (neobjavljeno)

4.9. Određivanje stupnja populacijske raznolikosti

Pomoću programa DnaSP v.6.12.03, koristeći sekvence svojih uzoraka, izračunao sam mjere genske raznolikosti unutar svake populacije, kao i mjere ukupne genske raznolikosti između svih populacija. Izračunate su sljedeće mjere: broj sekvenci (n), broj polimorfnih mjesta (S), ukupan broj mutacija (η), broj haplotipova (h), raznolikost haplotipova (H_d), nukleotidna raznolikost (π) i prosječan broj razlika nukleotida (K).

Broj sekvenci odnosi se na količinu sekvenci zastupljenih u svakoj populaciji. Broj polimorfnih mjesta se odnosi na broj nukleotida koji su u različitim sekvencama na istom mjestu različiti. Ukupan broj mutacija se odnosi na sve promjene u sekvencama, koje ne moraju nužno biti polimorfna mjesta te mogu uključivati insercije, delecije i sl. Broj haplotipova je količina jedinstvenih sekvenci unutar pojedine populacije. Raznolikost haplotipova je mjera koja govori koliko je jedinstven svaki haplotip unutar populacije te se može definirati kao vjerojatnost da su dva nasumično odabrana haplotipa unutar populacije različita. Nukleotidna raznolikost je prosječan broj nukleotidnih razlika svih parova nukleotida između sekvenci te se može definirati kao vjerojatnost da su dva nukleotida na istom mjestu u različitim sekvencama različita. Prosječan broj razlika nukleotida je aritmetiča sredina broja različitih nukleotida između svake dvije sekvence u populaciji.

Ove mjere su korisne pri procjeni stupnja populacijske raznolikosti te omogućuju formiranje pretpostavki o sposobnosti populacija za prilagodbu i odgovor na promjene u okolišu, kao i o posljedicama mogućeg miješanja populacija.

5. Rezultati

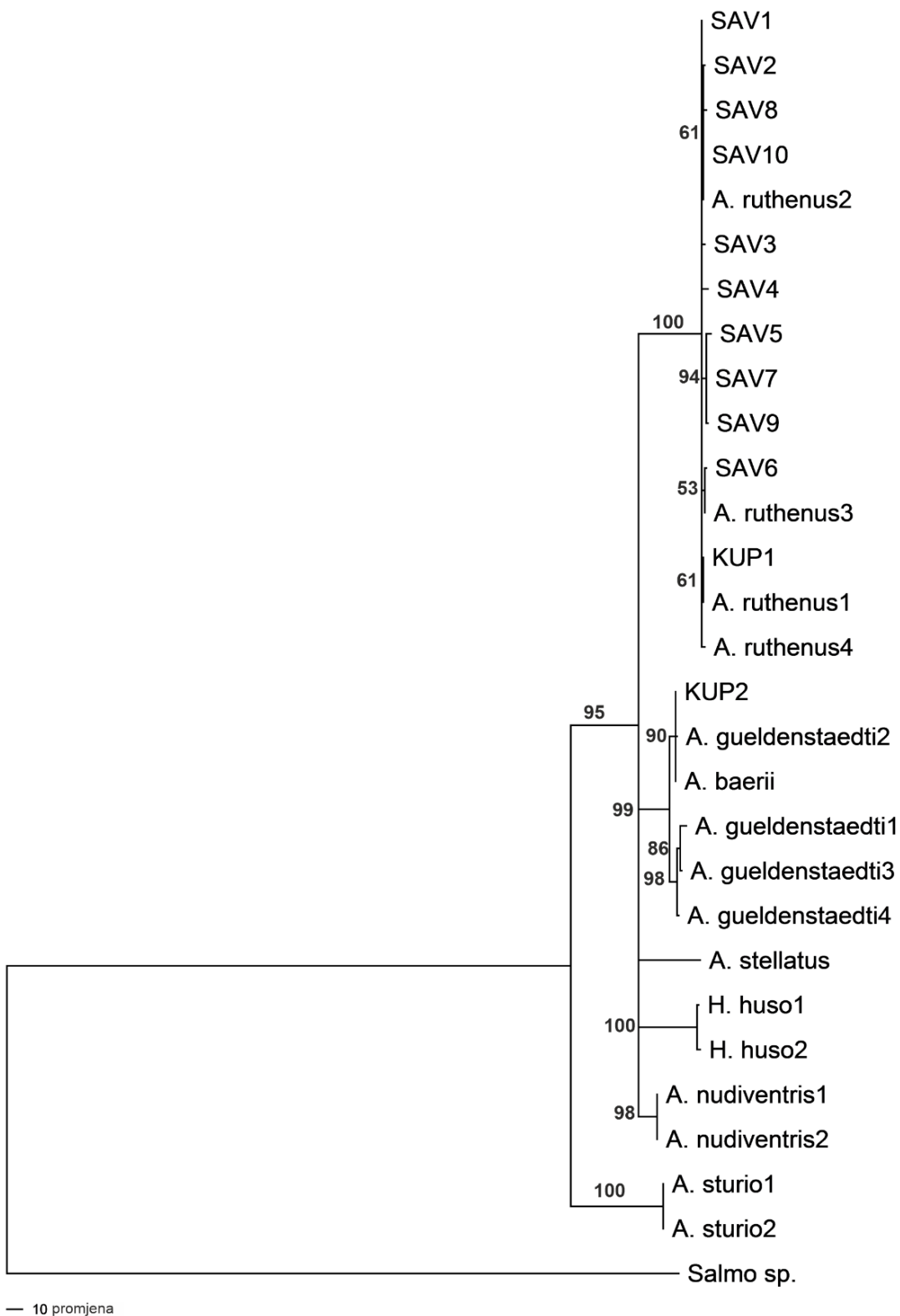
5.1. Populacijska raznolikost

Tablica 5 Dobivene mjere genskog polimorfizma (**n** - broj sekvenci, **s** - broj polimorfnih mjesta, **η** - broj mutacija, **h** - broj haplotipova, **Hd** - raznolikost haplotipova, **π** - nukleotidna raznolikost, **k** - prosječan broj razlika nukleotida)

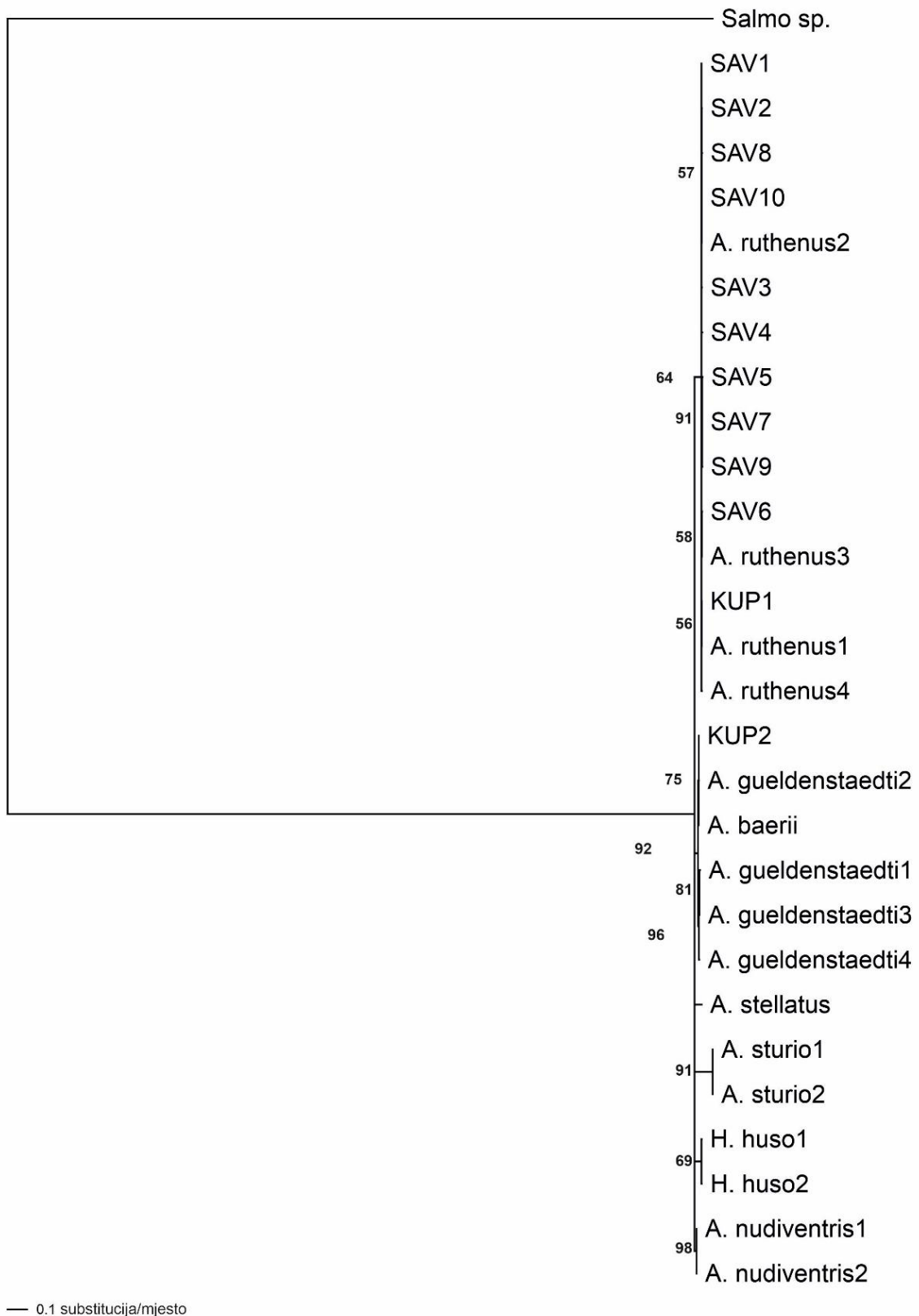
Populacija	N	s	η	h	Hd	π	k
<i>Acipenser ruthenus</i> (Sava)	12	19	19	10	0,955	0,00374	4,273
<i>Acipenser baerii</i> (uzgajalište Kupa)	7	0	0	1	0	0	0
<i>Acipenser ruthenus</i> (uzgajalište Kupa)	9	0	0	1	0	0	0
Ukupno	28	76	77	12	0,841	0,02208	25,198

Iz dobivenih podataka je vidljivo da jedinke iz uzgajališta imaju izrazito malu populacijsku raznolikost. Budući da je u svakoj populaciji iz uzgajališta prisutan samo jedan haplotip, sve ostale mjere raznolikosti iznose 0. S druge strane kod jedinki uhvaćenih u divljini, na 12 analiziranih sekvenci je utvrđena prisutnost 10 različitih haplotipova s prosjekom od 4,273 razlika u nukleotidima.

5.2. Rekonstrukcija filogenetskog stabla



Slika 5 Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju mitohondrijskog gena *cyt b*. Podržanost grananja napisana je u postocima. Haplotipovi uzoraka korištenih u ovom istraživanju su SAV 1-10 i KUP 1 i 2, dok su ostali haplotipovi preuzeti iz Banke gena (Tablica 4).



Slika 6 Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju mitohondrijskog gena *cyt b*. Podržanost grananja napisana je u postotcima. Haplotipovi uzoraka korištenih u ovom istraživanju su SAV 1-10 i KUP 1 i 2, dok su ostali preuzet iz Banke gena (Tablica 4)

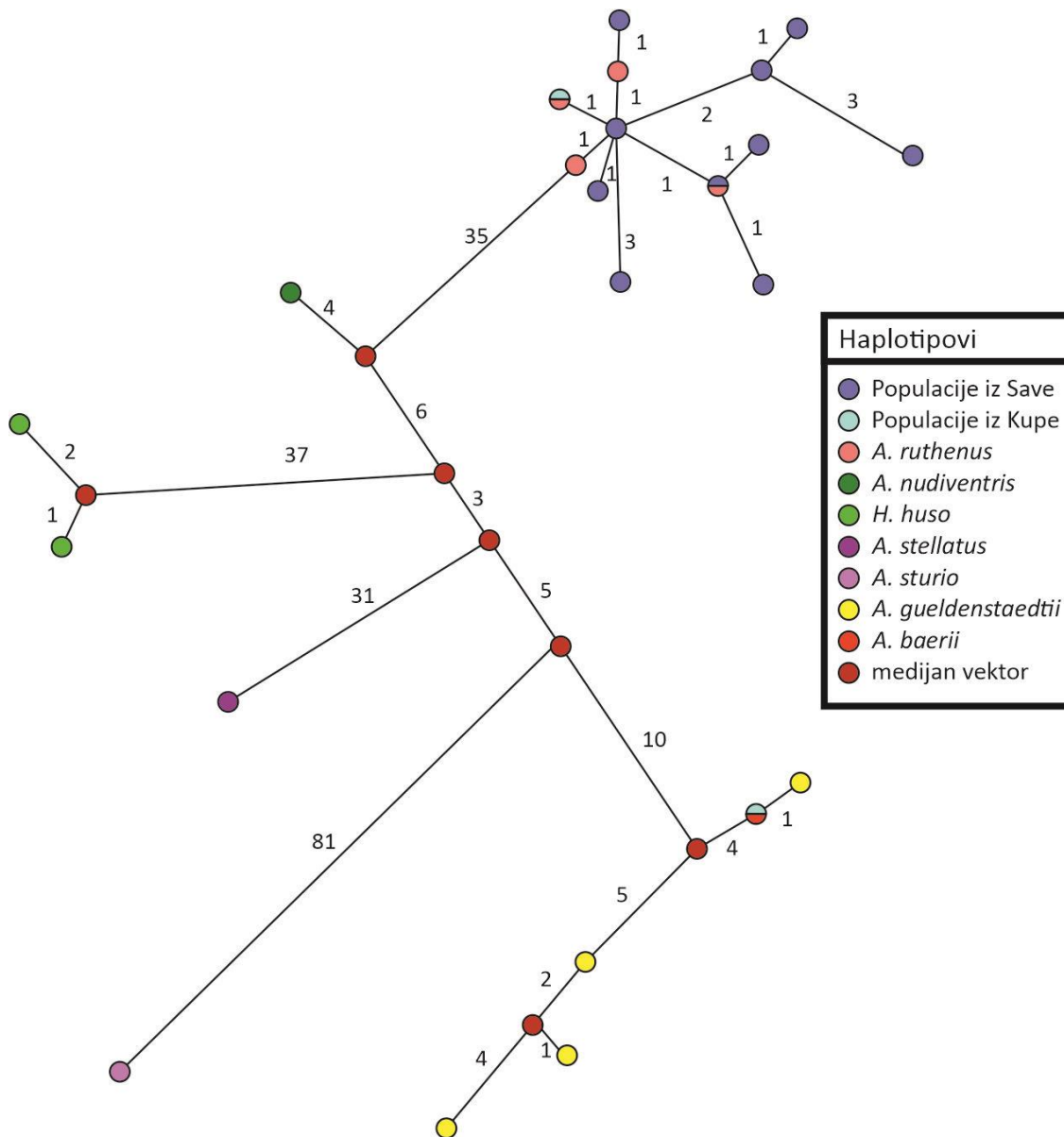
Na slikama 5 i 6 su filogenetska stabla dobivena metodama MP i MJ. Analizirano je 1141 parova baza svakog haplotipa, od kojih su 262 konstantne, 717 varijabile i parsimonijski neinformativne, dok su 162 parsimonijski informativna mjesta. Parametri stabla dobivenog metodom MP navedeni su u Tablici 6.

Tablica 6 Parametri MP stabla

Dužina stabla	1101
Indeks konzistencije	0,8983
Indeks homoplazije	0,1017
Indeks konzistencije bez neinformativnih mjesta	0,6898
Indeks homoplazije bez neinformativnih mjesta	0,3102
Retencijski indeks	0,8530
Reskalirani retencijski indeks	0,7662

Iz stabala je vidljivo da su svi haplotipovi divljih populacija uhvaćenih u rijeci Savi (SAV 1-10), kao i jedan od haplotipova iz uzgajališta (KUP 1), najbliže srodni s haplotipovima vrste *Acipenser ruthenus*. Drugi haplotip iz uzgajališta (KUP 2) najbliži je haplotipovima vrsta *Acipenser gueldenstaedtii* i *Acipenser baerii*. Prema MP stablu oba grananja većih grupa s haplotipovima iz istraživanja imaju visok postotak podržanosti, odnosno 100 % za *A. ruthenus* granu i 99 % za *A. gueldenstaedtii* / *A. baerii* granu. S druge strane, ML stablo daje niži postotak podržanosti za *A. ruthenus* granu od 64 %, dok *A. gueldenstaedtii* / *A. baerii* granu karakterizira viša, 96 % podržanost.

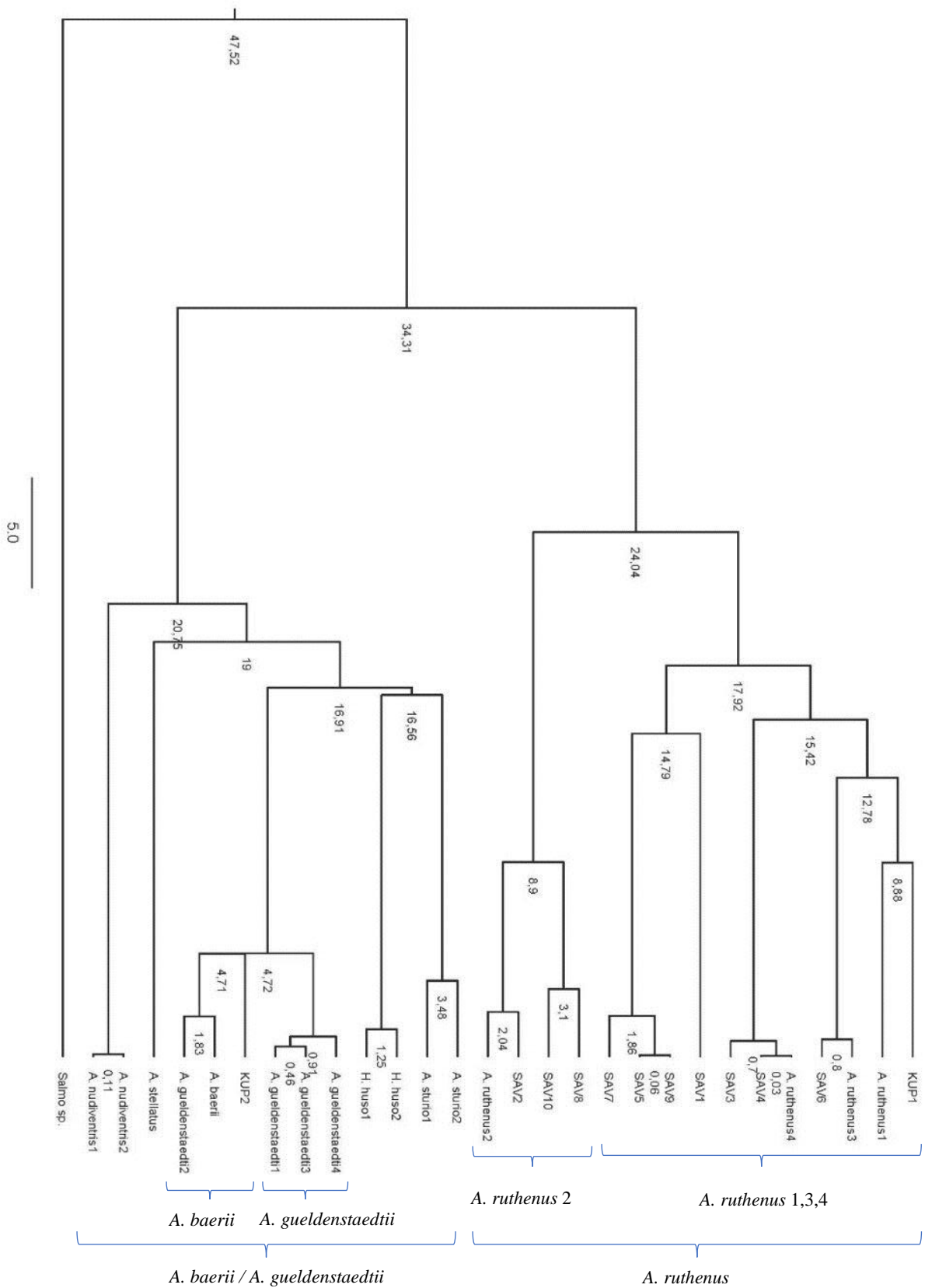
5.3. Rekonstrukcija filogenetske mreže



Slika 7 Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ). Brojevi iznad grana označavaju broj mutacija. Tamno crveni čvorovi predstavljaju medijan vektore, odnosno neuzorkovane pretpostavljene haplotipove.

Filogenetska mreža izrađena MJ metodom podržava i daje sličan raspored haplotipova kao filogenetska stabla. Na njoj se primjećuju dvije grupe s haplotipovima iz istraživanja, međusobno odvojene s 5 pretpostavljenih neuzorkovanih haplotipa. U prvoj grupi svi haplotipovi iz rijeke Save i jedan od haplotipova iz uzgajališta pripadaju vrsti *A. ruthenus* te su blisko povezani s haplotipovima vrste *A. ruthenus* iz Banke gena. U drugoj grupi se vidi povezanost drugog haplotipa iz rijeke Kupe s vrstom *A. baerii* i *A. gueldenstaedtii*. Zanimljivo je da je ovdje, kao i na filogenetskim stablima, jedan od haplotipova preuzetih iz Banke gena vrste *A. gueldenstaedtii* srodniji haplotipu vrste *A. baerii* nego drugim haplotipovima vrste *A. gueldenstaedtii*.

5.4. Rekonstrukcija evolucijske prošlosti porodice Acipenseridae



Slika 8 Rekonstrukcija stabla evolucijske prošlosti dobivena Bayesovom metodom. Haplotipovi uzoraka korištenih u ovom istraživanju su SAV 1-10 i KUP 1 i 2, dok su ostali preuzeti iz Banke gena (Tablica 4). Brojevi na mjestima grananja označavaju srednje vrijednosti odvajanja u milijunima godina. Vitičastim zagradama označene su grupe i podgrupe koje se spominju u daljnjem tekstu.

Budući da je za potrebe analize evolucijske prošlosti korištena stopa mutacije karakteristična za porodicu Salmonidae, vremena divergencije treba uzeti s rezervom. Prema rezultatima analize, red Acipenseriformes se odvojio od reda Salmoniformes prije 47,52 milijuna godina. Dvije glavne grupe (grupa koja obuhvaća vrstu *A. ruthenus* i grupa *A. baerii* / *A. gueldenstaedtii*) međusobno su se razdvojile prije otprilike 34,31 milijuna godina. Unutar grupe *A. ruthenus*, međusobno su najudaljeniji haplotipovi iz podgrupe *A. ruthenus* 2 i podgrupe *A. ruthenus* 1,3,4, koji su se razdvojili prije otprilike 24,04 milijuna godina. Unutar grupe *A. baerii* / *A. gueldenstaedtii*, srodne vrste *A. gueldenstaedtii* i *A. baerii* su se razdvojile prije otprilike 4,72 milijuna godina. Najkasnije divergencije se prema rezultatima događaju u periodu od najranije 14,79 milijuna godina do najkasnije prije 60.000 godina.

6. Rasprava

Prema rezultatima ovog istraživanja, utvrđeno je da na području Republike Hrvatske porodica Acipenseridae u divljini i dalje obuhvaća minimalno jednu vrstu, dok se u uzgajalištima uspješno uzgajaju barem dvije vrste. Ako se ovakav rezultat istraživanja usporedi s Pregledom recentne hrvatske slatkovodne ihtiofaune (Ćaleta i sur., 2019) može se reći da je on očekivan. Unatoč tome što se u literaturi (Ćaleta i sur., 2019) spominju postojeće populacije dviju vrsta iz porodice Acipenseridae u prirodi (Tablica 1), njihova ugroženost i nepredvidiv prostorni raspored mogu opravdati i objasniti izostanak jedne vrste pri uzorkovanju. Ovakvi rezultati ne mogu dati informacije o prisustvu i stanju drugih vrsta iz ove porodice, ali mogu potvrditi dosadašnje podatke o njihovoj ugroženosti na našim prostorima.

Rekonstrukcije filogenetskih stabala i filogenetske mreže pružaju detaljniji uvid u genski sastav i strukturu populacija, kao i u njihovu međusobnu srodnost. Prema rezultatima, svi haplotipovi jedinki uhvaćenih u divljini, kao i jedan od haplotipova iz uzgajališta blisko su srodni s haplotipovima vrste *Acipenser ruthenus* iz Banke gena, dok drugi haplotip iz uzgajališta pripada vrsti *Acipenser baerii*. Budući da na stablima nije vidljiva značajnija strukturiranost na intraspecijskoj razini, može se s velikom sigurnošću pretpostaviti da haplotipovi iz istraživanja i pripadaju upravo tim vrstama. Zanimljivo je da je jedan od haplotipova iz banke gena vrste *Acipenser gueldenstaedtii* prema rezultatima srodniji vrsti *Acipenser baerii* nego drugim pripadnicima svoje vrste. Takav rezultat vrlo je vjerojatno posljedica hibridizacije, ili pogrešne determinacije od strane autora. Filogenetska mreža daje bolji uvid u međusobni filogenetski položaj divljih haplotipova iz Save, koji su se zvjezdasto grupirali oko jednog centralnog haplotipa. Iz takvog rasporeda može se naslutiti da je došlo do nedavne i brze divergencije, pri čemu je haplotip jedinke iz središnje pozicije ancestralan, dok su haplotipovi jedinki koje ju okružuju, izvedeni. Ovakvu bi se pretpostavku ipak trebalo uzeti s rezervom, budući da je analiziran mali broj jedinki te budući da se razlike između haplotipova kreću od svega 1 do maksimalno 5 mutacija. Na mreži se također može primijetiti da su oba haplotipa iz uzgajališta na Kupi dovoljno slična s haplotipovima vrsti iz Banke gena da zauzimaju isti čvor na mreži, što dodatno potvrđuje njihovu pripadnost tim vrstama.

Za potrebe rekonstrukcije evolucijske prošlosti, zbog manjka preciznijih literaturnih navoda, korištena je stopa mutacija karakteristična za porodicu Salmonidae. Budući da je prema rezultatima istraživanja Krieger i Fuerst (2002) dokazana znatno sporija relativna stopa mutacija kod reda Acipenseriformes u usporedbi s ribama podreda Teleostei, kod rezultata treba

očekivati godine divergencija mlađe od realnog stanja. Prema rezultatima rekonstrukcije evolucijske prošlosti, promatrani recentni pripadnici reda Acipenseriformes su se prvi put izdvojili od reda Salmoniformes prije otprilike 47,5 milijuna godina, što odgovara vremenu ranog eocena u paleogenu. Najraniji pripadnik recentnog roda *Acipenser* pronađen u fosilnom zapisu datira iz vremena kasne krede, prije otprilike 65 milijuna godina, dok najstariji pripadnik reda Acipenseriformes, izumrla vrsta *Asiacipenser kotelnikovi* Nessov, Fiodorov i Udovichenko, 1990, datira iz vremena srednje jure prije otprilike 175 milijuna godina. Zamjetna razlika između dobivenih rezultata i literaturnih podataka može se objasniti ako uzmemo u obzir korištenu stopu mutacija, koja je brža od realne (Krieger i Fuerst, 2002) i relativno mali broj analiziranih sekvenci vrsta. Fosilni nalazi su zabilježeni na području Sjeverne Amerike i Euroazije na prostoru tadašnjih priobalnih sljevova s estuarijskim uvjetima koji su se izlivali u epikontinentalno more Tetis (Choundhury i Dick, 1998). Neki autori smatraju porodicu Acipenseridae živim fosilima zbog njihove rasprostranjenosti, staništa i morfoloških karakteristika koje su ostale praktički nepromijenjene od vremena njihovog nastanka (Choundhury i Dick, 1998; Shen i sur., 2020).

Dvije velike grupe na dobivenom stablu, jedna koja obuhvaća sve haplotipove vrste *Acipenser ruthenus* i druga, koja obuhvaća sve ostale haplotipove iz istraživanja su se prema rezultatima međusobno razdvojile prije otprilike 34,3 milijuna godina. Ukoliko bi pretpostavili da je realno vrijeme divergencije bilo 15ak milijuna godina ranije, ona bi se mogla povezati sa zatvaranjem mora Tetis i njegovom pretvorbom u današnje Sredozemno, Crno, Kaspijsko i Aralsko more prije 50ak milijuna godina (www.britannica.com). Taj događaj je stvorio geografsku barijeru između populacija te se smatra da je glavni evolucijski mehanizam koji je doveo do diverzifikacije i pojave novih zasebnih vrsta unutar porodice Acipenseridae (Shen i sur., 2020).

Rezultati analize populacijske raznolikosti imaju očekivan ishod, odnosno iz njih se vidi da se populacije jesetri u divljini međusobno genski puno više razlikuju od populacija iz uzgajališta. Takvo se stanje može objasniti za populacije oba podrijetla (iz uzgajališta i iz divljine). S jedne strane, jedinke u divljini slobodne su i kod njih dolazi do slobodnog protoka gena između različitih populacija, također su izložene i različitim okolišnim pritiscima koji uvode dodatnu raznolikost u genetski bazen. Takvi učinci djeluju vrlo pozitivno na gensku raznolikost populacija, pa se tako prema rezultatima analize unutar 12 sekvenci divljih populacija pojavljuje čak 10 različitih haplotipova, što daje vrlo visoku raznolikost haplotipova od 0,955. Slikovitije predstavljeno, ukoliko pretpostavimo da se situacija iz ovog istraživanja odražava na realno stanje u prirodi, pri ulovu dvije nasumične jedinke vrste *A. ruthenus*, šansa da imaju

isti haplotip bila bi manja od 5 %. Budući da svi haplotipovi ipak pripadaju istoj vrsti te da je područje uzorkovanja ograničeno, ne možemo govoriti o visokoj nukleotidnoj raznolikosti između haplotipa te s prosječnom razlikom od 4,273 nukleotida od 1141 u sekvenci, ona iznosi 0,00374, odnosno 0,374 %.

S druge strane populacije u uzgajalištu život provode u zatvorenom sustavu bez mogućnosti razmjene genetičkog materijala s drugim, potencijalno različitim populacijama. Osim toga, životni uvjeti u uzgajalištu regulirani su na način da osiguraju što veću stopu preživljavanja jedinki u svim stadijima života u svrhu što obilnijeg izlova. Veliku ulogu u gubitku genske varijabilnosti populacija iz uzgajališta ima i efekt osnivača, koji se javlja kod populacija koje su nastale kontroliranim razmnožavanjem manjeg početnog broja jedinki, u ovom slučaju s poželjnim karakteristikama za uzgoj.

Osim gubitka genetske raznolikosti, prema rezultatima istraživanja Araki i sur. iz 2007., ribe iz uzgajališta koje su puštene u divljinu pate i od pada adaptivne vrijednosti, odnosno fitnesa (eng. fitness). Fitnes je kategorija koja opisuje sposobnost razmnožavanja i preživljavanja jedinki, odnosno prosječan doprinos jedinke genetskom fondu iduće generacije. Istraživanje je provedeno na vrstama *Oncorhynchus* spp., iz porodice Salmonidae, te na 3 generacije dokazuje oštar pad fitnesa od čak 37,5 % po uzgajanoj generaciji. Uzevši ovakav rezultat u obzir, moguće je pretpostaviti da uzgajanje riba iz porodice Acipenseridae ima sličan negativan utjecaj na njihov fitnes, što bi moglo imati izrazito negativan učinak na buduće generacije divljih jesetri ukoliko dođe do njihovog puštanja u okoliš. Ovakvu pretpostavku dodatno podržava i članak s pregledom učinaka nenadziranog masovnog uvođenja biljnih i životinjskih organizama u okoliš Laikre i sur. iz 2010. Budući da je utvrđeno da su divlje populacije jesetri na našim prostorima malobrojne i rijetke, kada bi došlo do slučajnog ili planiranog puštanja većeg dijela ribljeg fonda iz uzgajališta, ono bi se moglo smatrati masovnim uvođenjem. Takvo masovno uvođenje konspecifičnih populacija (populacija iste vrste s različitim genetskim sastavom) dovodi do gubitka genetske varijabilnosti, gubitka adaptacija, promjena u genetskoj kompoziciji divljih populacija i raspada strukture populacija, odnosno gubitka razlika u genetskoj kompoziciji različitih populacija. Čak i u slučaju kad ne bi došlo do protoka gena između divljih i puštenih populacija, može doći do ugroze i smanjivanja divljih populacija mehanizmima kao što su kompeticija ili prijenos bolesti.

7. Zaključak

1. Sve jedinke uhvaćene u prirodi, na području rijeke Save pripadaju vrsti *Acipenser ruthenus*, jedinke iz uzgajališta pripadaju vrstama *Acipenser ruthenus* i *Acipenser baerii*.
2. Genska raznolikost populacija u divljini značajno je viša od raznolikosti populacija iz uzgajališta.
3. Potrebno je primijeniti oprez pri upravljanju populacijama u uzgajalištu kako ne bi došlo do njihove masovne introdukcije u prirodu i kolapsa genske strukture populacija u divljini.

8. Literatura

- Araki, H., Cooper, B., i Blouin, M. S. (2007). Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science*, 318(5847), 100–103.
<https://doi.org/10.1126/science.1145621>
- Billard, R., i Lecointre, G. (2000). Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(4), 355–392.
<https://doi.org/10.1023/A:1012231526151>
- Birstein, V. J., Doukakis, P., i DeSalle, R. (2002). Molecular phylogeny of Acipenseridae: Nonmonophyly of Scaphirhynchinae. *Copeia*, 2002(2), 287–301.
[https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2002\)002\[0287:MPOANS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2002)002[0287:MPOANS]2.0.CO;2)
- Birstein, V. J., Hanner, R., i DeSalle, R. (1997). Phylogeny of the Acipenseriformes: Cytogenetic and molecular approaches. *Environmental Biology of Fishes*, 48(1–4), 127–155. <https://doi.org/10.1023/a:1007366100353>
- Čaleta, M., Marčić, Z., Buj, I., Zanella, D., Mustafić, P., Duplić, A., i Horvatić, S. (2019). A review of extant Croatian freshwater fish and lampreys: Annotated list and distribution. *Ribarstvo, Croatian Journal of Fisheries*, 77(3), 137–234. <https://doi.org/10.2478/cjf-2019-0016>
- Čaleta, M., Zanella, D., Marčić, Z., Buj, I., Mustafić, P., Horvatić, S., Ivić, L., Raguž, L., i Karlović, R. (2021). Završno izvješće - Measures - Upravljanje i obnova vodenih ekoloških koridora za migratorne vrste riba u dunavskom slijevu. *Hrvatsko Ihtiološko Društvo*.
- Choudhury, A., i Dick, T. A. (1998). *The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, palaeontology and palaeogeography*. *Journal of Biogeography* (25), 623–618.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1998.2540623.x>
- Crête-Lafrenière, A., Weir, L. K., i Bernatchez, L. (2012). Framing the Salmonidae Family Phylogenetic Portrait: A More Complete Picture from Increased Taxon Sampling. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046662>
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., i Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969–1973.

<https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>

Faircloth, B. C., Sorenson, L., Santini, F., i Alfaro, M. E. (2013). A Phylogenomic Perspective on the Radiation of Ray-Finned Fishes Based upon Targeted Sequencing of Ultraconserved Elements (UCEs). *PLoS ONE*, 8(6).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065923>

Gesner, C. (1997). An overview of Acipenseriformes. *Environmental Biology of Fishes*, 1558.

Hall, T. (1999). BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.

<https://ci.nii.ac.jp/naid/10030689140>

Jenneckens, I., Meyer, J. N., Debus, L., Pitra, C., i Ludwig, A. (2001). Evidence of mitochondrial DNA clones of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*, within Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*, caught in the River Volga. *Ecology Letters*, 3, 503–508.

Krieger, J., i Fuerst, P. A. (2002). Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the order Acipenseriformes. *Molecular Biology and Evolution*, 19(6), 891–897.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004146>

Laikre, L., Schwartz, M. K., Waples, R. S., i Ryman, N. (2010). Compromising genetic diversity in the wild: Unmonitored large-scale release of plants and animals. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(9), 520–529. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.06.013>

Ludwig, A., May, B., Debus, L., i Jenneckens, I. (2000). Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics*, 4(154), 1933–1947.

Nelson, J. S., Grande, T. C., i Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the World*.

Nelson, T. C., Doukakis, P., Lindley, S. T., Schreier, A. D., Hightower, J. E., Hildebrand, L. R., Whitlock, R. E., i Webb, M. A. H. (2013). Research Tools to Investigate Movements, Migrations, and Life History of Sturgeons (*Acipenseridae*), with an Emphasis on Marine-Oriented Populations. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071552>

Patwardhan, A., Ray, S., i Roy, A. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics i Evolutionary Biology*, 02(02).

<https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>

- Pikitch, E. K., Doukakis, P., Lauck, L., Chakrabarty, P., i Erickson, D. L. (2005). Status, trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. *Fish and Fisheries*, 6(3), 233–265. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2005.00190.x>
- Pough, F. H., Janis, C. M., i Heiser, J. B. (2013). *Vertebrate life*.
- Shen, Y., Yang, N., Liu, Z., Chen, Q., i Li, Y. (2020). Phylogenetic perspective on the relationships and evolutionary history of the Acipenseriformes. *Genomics*, 112(5), 3511–3517. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.02.017>
- Skurikhina, L. A., Kukhlevskiy, A. D., Oleinik, A. G., i Kovpak, N. E. (2010). Phylogenetic Analysis of Smelts (Osmeridae) Based on the Variation of Cytochrome b Gene. *Russian Journal of Genetics*, 1(46), 69–80.
- Swofford, D. L. (2002). Phylogenetic Analysis Using Parsimony. *Options*, 42(2), 294–307. <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02198856>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., i Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Vandamme, A. M. (2009). The Phylogenetic Handbook. *The Phylogenetic Handbook*, 3–29. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511819049>
- Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: Progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29(2), 188–197. <https://doi.org/10.1002/bies.20529>

Neobjavljeni članci referencirani u Banci gena:

- Birstein, V. J., Ruban, G., Ludwig, A., i DeSalle, R. (2003). *The enigmatic Caspian Sea Russian sturgeon: How many cryptic forms does it contain?*
- Ciftci, Y., Eroglu, O., i Firidin, S. (2012). *Genetic Characterization of Three Sturgeon Species (A. stellatus Pallas, 1771, A. gueldenstaedtii Brandt, 1833, H. huso Linnaeus 1758) by mtDNA Sequence Analysis from Black Sea Coasts of Turkey.*
- Keskin, E. (2009). *Phylogenetic relationships among sturgeon species in Turkish ichthyofauna*
- Pekarik, L., Ciamporova-Zatovicova, Z., Siposova, D., i Ciampor, F. (2017). *Genetic*

structure of the wild, broodstock and stocked sterlets reveal negative trends in their genetic diversity in the Middle Danube.

Internetski izvori:

IUCN Crvena lista ugroženih vrsta. Verzija 2021-2:

<https://www.iucnredlist.org> (5.11.2021.)

Web stranica projekta „Palaeos“:

<https://web.archive.org/web/20101225152809/http://www.palaeos.com/Vertebrates/Units/090Teleostomi/090.300.html> (7.11.2021.)

Web stranica CITES konvencije:

<https://cites.org/eng/prog/sturgeon/history.shtml> (7.11.2021.)

Web stranica Ribnjaci Kupa:

<https://www.ribnjaci-kupa.hr/hr/?where=production> (14.11.2021.)

Web stranica Memorijalnog sveučilišta Newfoundlanda i Labradora:

https://www.mun.ca/biology/scarr/Tree_Pruning_methods.html (17.11.2021.)

Tang, C. Marie (2021, October 21). *Tethys Sea*. *Encyclopedia Britannica*:

<https://www.britannica.com/place/Tethys-Sea> (18.12.2021.)

9. Životopis

Rođen sam u Zagrebu 4. veljače 1997. U Zagrebu sam pohađao Osnovnu školu Gustava Krkleca i Osnovnu školu Otok od 2003. do 2011. te Klasičnu gimnaziju u Zagrebu od 2011. do 2015.

Oduvijek sam težio prirodoslovnim znanostima pa sam tako 2015. upisao preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Taj studij podrazumijeva interdisciplinarni pristup svim znanostima PMF-a te sam se na njemu upoznao sa širokim nizom bioloških, geoloških i geografskih disciplina, ali i s osnovnim kolegijima s matematičkog, fizičkog, kemijskog i geofizičkog odsjeka. Kao brucoš, 2015. godine, kandidirao sam se i sudjelovao u S3++ Ljetnoj školi znanosti u organizaciji Društva za edukaciju izvan okvira (*Society For Out-Of-Frame Education*). Pod vodstvom francuskog doktoranda računalne znanosti Remy Léonea sudjelovao sam u izradi projekta „Life of a web request, how the Internet works?“, koji se sastojao od izrade web stranice i softwera koji očitava temperaturu procesora računala Raspbery Pi te je u realnom vremenu upisuje na web stranicu. Ljetna škola znanosti se u cijelosti odvijala na engleskom jeziku, uz sudjelovanje učenika/studenata, znanstvenih novaka kao voditelja projekata te iskusnih znanstvenika - predavača iz cijelog svijeta. Sudjelovanjem sam stekao vrijedna znanja, iskustva i kontakte. Preddiplomski studij sam završio 2019. godine završnim radom „Masovna izumiranja i bioraznolikost“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Damjana Franjevića, čime sam stekao titulu sveučilišnog prvostupnika znanosti o okolišu.

2019. godine upisao sam diplomski studij Znanosti o okolišu, koji se temelji na dopuni znanja preddiplomskog studija specijaliziranim kolegijima kojima je zadatak detaljniji uvid u prethodno savladane discipline, kao i njihova praktična primjena. Tijekom studija, osim usvajanja mnogih teorijskih znanja, prošao sam i kroz brojne praktikume koji su mi utvrdili prethodna iskustva o ponašanju i radu u biološkim, geološkim i kemijskim laboratorijima. Na terenskoj nastavi u trajanju od tjedan dana, koja je obuhvaćala biološki, geološki i geografski aspekt imao sam priliku primijeniti teorijska znanja u provedbi istraživanja u terenskim uvjetima. Jedan od boljih primjera interdisciplinarnog pristupa bila je izrada elaborata u sklopu jednog kolegija prilikom čega sam usvojio metodologiju geokološkog vrednovanja prostora. Diplomski studij završavam 2022. ovim diplomskim radom, te ću nakon obrane steći titulu magistar struke znanosti o okolišu.