

Usporedba građe mrežnice oka nadzemne i podzemne populacije kapelske svjetlice (*Telestes karsticus*)

Ilijić, Lucia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:217:060837>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucia Ilijić

**Usporedba građe mrežnice oka nadzemne i
podzemne populacije kapelske svjetlice (*Telestes
karsticus*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lucia Ilijić

**Comparative histology of eye retina in surface
and subterranean populations of karst dace
(*Telestes karsticus*)**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za histologiju na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom doc. dr. sc. Zorana Marčića, te komentorstvom dr. sc. Helene Bilandžije. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre ekologije i zaštite prirode.

Zahvala

Od srca zahvaljujem mentorima doc. dr. sc. Zoranu Marčiću i dr. sc. Heleni Bilandžiji na prilici, pomoći i strpljenju tijekom pisanja ovog rada. Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Romani Gračan i drugim zaposlenicima Laboratorija za histologiju na ustupljenom prostoru i savjetima.

Posebno hvala Mateu Čupiću na društvu, pomoći i podršci u svakom trenutku.

Ogromno hvala mojoj obitelji i prijateljima na beskrajnoj količini povjerenja, strpljenja i ljubavi kojom me svakodnevno potiču da dajem sve od sebe. Veliko hvala i psu Divni što na sve dobre i loše dane maše repom i vuče naprijed.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Usporedba građe mrežnice oka nadzemne i podzemne populacije kapelske svijetlice (*Telestes karsticus*)

Lucia Ilijć

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kapelska svijetlica (*Telestes karsticus* Marčić & Mrakovčić, 2011) stenoendemska je vrsta dunavskog slijeva sa stalnom nadzemnom i podzemnom populacijom u potoku i ponoru Sušik, što ju čini potencijalno važnim modelnim organizmom za proučavanje početnih adaptivnih procesa koji se događaju tijekom kolonizacije podzemnih staništa. Podzemne jedinke ne pokazuju očite troglomorfne karakteristike i pretpostavlja se da je ova vrsta tek nedavno kolonizirala podzemlje. Prethodnim istraživanjem utvrđeno je da se mrežnica oka podzemnih jedinki morfološki razlikuje od mrežnice nadzemnih jedinki. Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti kako se prvi odgovor kapelske svijetlice na izmještanje sa svjetla u mrak, ili obratno, manifestira u građi mrežnice oka. Jedinke porijeklom iz nadzemne i podzemne populacije podijeljene su u 4 skupine te izložene različitim eksperimentalnim svjetlosnim uvjetima u laboratoriju, u trajanju od 22 mjeseca. Po završetku eksperimenta provedena je analiza i usporedba građe mrežnice između ispitivanih skupina. Kod jedinki nadzemne populacije izloženih konstantnoj tami i jedinki podzemne populacije izloženih izmjeni svjetla i mraka postoji tendencija povećanja ukupne širine i širine pojedinih slojeva mrežnice oka.

Ključne riječi: kolonizacija špilja, modelni organizam, plastičnost
(50 stranica, 25 slika, 5 tablica, 53 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: doc. dr. sc. Zoran Marčić
Komentor: dr. sc. Helena Bilandžija

Ocjenitelji:
Doc. dr. sc. Zoran Marčić
Doc. dr. sc. Tvrtko Dražina
Doc. dr. sc. Sandra Hudina

Rad prihvaćen: 13. veljače 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Comparative histology of eye retina in surface and subterranean populations of karst dace (*Telestes karsticus*)

Lucia Ilijić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The karst dace (*Telestes karsticus* Marčić & Mrakovčić, 2011) is a stenoendemic species of the Danube basin forming two permanent populations – a surface population in the Sušik Creek and a subterranean one in the Sušik Cave, which makes this species a potentially important model organism for studying the initial adaptive processes that occur during cave colonization. The species appears to have only recently colonized the cave, showing no obvious troglomorphic traits. A previous study has established a morphological difference in the eye retina of surface and subterranean specimens. The aim of this thesis was to investigate how the first response of karst dace to displacement from light to dark conditions, and vice versa, is manifested in the retina. Individuals originating from the surface and subterranean population were divided into 4 groups and exposed to different experimental lighting conditions for 22 months, after which we performed an analysis and comparison of the retinal structure between the groups. In individuals from the surface population exposed to constant darkness, as well as in individuals from the subterranean population exposed to a light-dark regime, there is a tendency of increase in the total width of the retina and the width of its individual layers.

Keywords: cave colonization, model organism, plasticity
(50 pages, 25 figures, 5 tables, 53 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Asst. Prof. Zoran Marčić, PhD
Co-mentor: Helena Bilandžija, PhD

Reviewers:

Asst. Prof. Zoran Marčić, PhD
Asst. Prof. Tvrtko Dražina, PhD
Asst. Prof. Sandra Hudina, PhD

Thesis accepted: February 13th 2023

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Opće karakteristike kapelske svjetlice	3
1.1.1. Sistematika vrste.....	3
1.1.2. Obilježja roda <i>Telestes</i>	4
1.1.3. Morfologija vrste <i>T. karsticus</i>	5
1.1.4. Rasprostranjenost i stanište kapelske svjetlice	6
1.1.5. Populacija kapelske svjetlice u potoku Sušik.....	7
1.1.6. Biologija i ekologija kapelske svjetlice.....	9
1.1.7. Podzemna populacija kapelske svjetlice	12
1.2. Anatomija ribljeg oka.....	13
1.3. Podzemna staništa	16
1.4. Ribe u podzemnim staništima	18
1.4.1. Uloga fenotipske plastičnosti u adaptaciji meksičke tetre na podzemlje	19
1.4.2. Oči riba u podzemnim staništima	20
1.4.3. Utjecaj konstantne tame i fenotipska plastičnost u očiju riba	23
2. Cilj istraživanja	25
3. Materijali i metode	26
3.1. Uzorkovanje i uzgoj jedinki u laboratoriju.....	26
3.2. Izrada histoloških preparata.....	29
3.3. Mikroskopiranje uzoraka.....	33
3.4. Mjerenje parametara.....	34
3.5. Statistička obrada podataka	35
4. Rezultati	37
4.1. Usporedba širine mrežnice oka između skupina	37
4.2. Usporedba širine pojedinih slojeva mrežnice između skupina.....	38
4.3. Kvalitativne razlike u mrežnici oka između skupina.....	39
5. Rasprava	41
6. Zaključak	44
7. Literatura	45
8. Životopis	50

1. Uvod

Ribe su ujedno najbrojnija, najraznolikija i najmanje istražena skupina kralješnjaka na našem planetu. Slaba istraženost, ali i ugroženost ove skupine u najvećoj je mjeri uvjetovana njihovom vezanošću uz vodeni ekosustav. Trenutni broj opisanih ribljih vrsta na svijetu prelazi 36000, od čega više od 40% čine slatkovodne vrste (Fricke i sur., 2022). Slatkovodne se ribe zbog velikog antropogenog pritiska na slatkovodne ekosustave smatraju najugroženijom skupinom kralješnjaka, a možda i životinja općenito (Mrakovčić i sur., 2006). U slatkim vodama Hrvatske živi 137 ribljih svojti, od kojih 49 ima status endemske vrste (Ćaleta i sur., 2019). Bogatstvo vrsta hrvatske slatkovodne ihtiofaune posljedica je geološke povijesti, zadnjih oledbi i zemljopisnog položaja koji obuhvaća dva riječna sustava: jadranski i dunavski (crnomorski), a s obzirom na stupanj raznolikosti Hrvatska se svrstava među ihtiološki najzanimljivija područja Europe (Ćaleta i sur., 2019).

Neprocjenjivo vrijedan dio raznolikosti hrvatske slatkovodne ihtiofaune čine upravo endemske vrste, čije je područje rasprostranjenosti ograničeno, a ponekad se nalaze samo u jednoj rijeci, jezeru ili potoku. Slatkovodne endemske vrste na prostorima današnje Hrvatske obitavaju još od davnina, čak od prije glacijalnih razdoblja, gdje su na razne načine prevladale sve geomorfološke i klimatske izazove kroz povijest i zadržale svoj kontinuitet (Ćaleta i sur., 2015). Iako su vrlo dobro prilagođene na uvjete specijaliziranih staništa u kojima žive, ove vrste izrazito su osjetljive na nagle promjene okolišnih uvjeta uzrokovane ljudskim djelovanjem. Promjene staništa endemskih riba uslijed antropogenog pritiska sve su veće te je za njihov opstanak nužno provesti brojne mjere zaštite.

Gotovo pola površine Hrvatske čini krško područje, pa su i endemi hrvatske slatkovodne ihtiofaune velikim dijelom vezani upravo za kompleksna krška i podzemna staništa (Gottstein, 2010; Ćaleta i sur., 2015). Gorski kotar i Lika područja su bogata stenoendemima koji žive u krškim, dijelom podzemnim vodotocima. Za nekoliko vrsta iz rodova *Delminichtys* Freyhof, Lieckfeldt, Bogutskaya, Pitra & Ludwig 2006, *Phoxinellus* Heckel 1843 i *Telestes* Bonaparte 1837 poznato je da borave u špiljama dinarskog krša, prvenstveno u sušnim razdobljima kada se povlače u podzemne tokove i tamo provode dulje vremenske periode (Mrakovčić i sur., 2006; Marčić, 2013; Reier i sur., 2022). Ove su vrste suočene sa ubrzanim nestajanjem staništa u kojima žive zbog

onečišćenja i isušivanja krških vodotoka. Uz to, populacije ovih vrsta često su male i nije puno poznato o tome na koji način koriste podzemna staništa. Takav je slučaj i s kapelskom svijetlicom (*Telestes karsticus* Marčić & Mrakovčić 2011) koja se istražuje u ovom radu. S obzirom na to da je zbog izrazito ograničenog areala posebno osjetljiva na antropogeni utjecaj, daljnje istraživanje vezanosti ove vrste uz podzemlje nužno je kako bi se mogla provesti učinkovita zaštita njezinog staništa.

Uz neupitnu važnost boljeg razumijevanja ekologije potrebnog za očuvanje endemskih slatkovodnih riba vezanih uz podzemlje, ove nam vrste ujedno pružaju i jedinstvenu priliku za istraživanje prilagodbi na podzemna staništa. Boravak u podzemlju, koliko god bio vremenski kratak, za jedinku podrazumijeva mogućnost orijentacije i kretanja u potpunom mraku. U slučaju da je boravak nešto duži, on podrazumijeva i sposobnost pronalaska hrane u okolišu gdje je ona teško dostupna. Za preživljavanje u podzemlju nužne su prilagodbe organizma na ekološke uvjete koji se znatno razlikuju od onih u nadzemnim staništima. Ukoliko su organizmi sposobni prilagoditi se podzemnom okolišu razvitkom složenih adaptivnih karakteristika, može doći do kolonizacije podzemnog staništa i uspostave podzemnih populacija.

Proučavanje mehanizama i vremena potrebnog za razvoj prilagodbi organizama na izmijenjene ekološke uvjete i kolonizaciju novih staništa predstavlja veliki problem u modernoj biologiji. Razvojni put adaptivnih promjena organizama često je teško razlučiv u sredinama koje se sporo mijenjaju. Takve je procese potencijalno lakše raspoznati i ustanoviti istražujući prijelaz organizma iz nadzemnih u drastično drugačije podzemne ekološke uvjete. Kapelska svijetlica i druge slatkovodne endemske ribe vezane uz podzemna staništa u tom pogledu predstavljaju izvrstan model za proučavanje ovih promjena. Suočene sa naglim promjenama nadzemnih staništa i prisiljene prilagođavati svoju biologiju i način života kako bi preživjele, mogu nam pružiti izvrstan uvid u procese adaptacije organizma nužne za opstanak vrste.

1.1. Opće karakteristike kapelske svijetlice

1.1.1. Sistematika vrste

Carstvo: Animalia (životinje)

Koljeno: Chordata (svitkovci)

Potkoljeno: Vertebrata (kralješnjaci)

Nadrazred: Gnatostomatha (čeljustousti)

Razred: Actinopteri (zrakoperke)

Nadred: Teleostei (prave koštunjače)

Red: Cypriniformes (šaranke)

Porodica: Leuciscidae

Rod: *Telestes* Bonaparte, 1837

Vrsta: *Telestes karsticus* Marčić & Mrakovčić 2011 (kapelska svijetlica)

Donedavno se porodica Cyprinidae smatrala najvećom porodicom šaranke i općenito najvećom porodicom slatkovodnih riba na svijetu (uz rijetke izuzetke koji naseljavaju i bočatu vodu) (Nelson i sur., 2016). S obzirom na veličinu i raznolikost ove porodice i na temelju sugestija brojnih filogenetskih istraživanja, u novije vrijeme porodica Cyprinidae razdvojena je na više porodica. Prijašnja potporodica Leuciscinae podignuta je na razinu porodice Leuciscidae (Schönhuth i sur., 2018), a trenutno broji 683 vrste u 92 roda (Eschmeyer i sur., 2022). Pripadnici porodice Leuciscidae široko su rasprostranjeni cijelom sjevernom Euroazijom, Sjevernom Amerikom i sjevernom Afrikom, a u europskoj ihtiofauni predstavljaju najveću porodicu šaranke (u Kottelat i Freyhof (2007) navedene kao potporodica Leuciscinae).

Rod *Telestes* trenutno broji 14 vrsta isključivo slatkovodnih riba. Iako je ime roda uz tipsku vrstu *Telestes muticellus* iz Sjeverne Italije opisao Bonaparte još 1837. godine, dugo vremena se rod *Telestes* smatrao podrodom roda *Leuciscus* Cuvier 1816. Pojedine vrste svrstavale su se i u rod *Phoxinellus*, s kojim vrste roda *Telestes* dijele određene morfološke karakteristike i prilagodbe na život u krškim vodotocima (Freyhof i sur., 2006, Reier i sur., 2022). U novije vrijeme

molekularnim i morfološkim analizama ustanovljeno da se radi o zasebnom rodu (Ketmaier i sur., 1998; Freyhof i sur., 2006).

1.1.2. Obilježja roda *Telestes*

Vrste roda *Telestes* srednje su veličine tijela sa standardnom dužinom tijela koja rijetko prelazi 150 mm (Ketmaier i sur., 1998). Najupadljivije morfološke karakteristike pripadnika roda su crna linija koja se proteže duž bočne pruge i crna linija koja se proteže bočnom stranom tijela od vrha njuške do repnog drška. Crna linija duž boka tijela izraženija je u vrijeme mrijesta kod odraslih jedinki pa stoga nije uvijek uočljiva kod živih primjeraka, ali je uvijek jasno vidljiva kod konzerviranih (Kottelat i Freyhof, 2007). Vrste ovog roda se od ostalih rodova porodice razlikuju i sljedećim karakteristikama: ispred analnog otvora nemaju greben bez ljusaka koji prolazi sredinom trbušne strane, imaju cjelovitu bočnu prugu, završna ili poluzavršna usta, varijabilne ždrijelne zube (mali, kukasti i nazubljeni) poredane u jedan ili dva reda, početak leđne peraje smješten malo iza početka trbušnih peraja, u podrepnoj peraji imaju 7-10^{1/2} razgranatih šipčica, a u leđnoj peraji imaju 7-8^{1/2} razgranatih šipčica (Ketmaier i sur., 1998; Kottelat i Freyhof, 2007).

Rod *Telestes* endemski je rod za Euromeditransku podregiju (Ketmaier i sur., 1998). Ribe ovog roda prilagođene su na hladnovodne uvjete i obligatni su stanovnici umjereno hladnih voda riječnih ekosustava. Nastanjuju staništa od brdskih potoka i planinskih jezera do nizinskih rijeka, a pretežno žive u gornjim tokovima rijeka i u manjim potocima (Ketmaier i sur., 1998; Ketmaier i sur., 2004; Kottelat i Freyhof, 2007). Nedavna istraživanja evolucijske povijesti ovog roda otkrile su da je nastao u južnoj Europi, gdje su još uvijek prisutne najstarije vrste roda (Buj i sur., 2022). Većina vrsta nalazi se u rijekama koje se slijevaju u istočno Jadransko more. Unutar roda postoje široko rasprostranjene vrste, ali i pojedine koje imaju izuzetno ograničen areal i nestale su sa određenih lokaliteta tijekom posljednjih desetljeća (Kottelat i Freyhof, 2007, Reier i sur., 2022).

U Hrvatskoj je od ukupno opisanih 14 vrsta roda *Telestes* prisutno čak osam vrsta. Iznimno velika bioraznolikost u slatkovodnim sustavima na području jadranskog slijeva Hrvatske te Bosne i Hercegovine rezultat je više zasebnih kolonizacijskih događaja genetički različitim linijama roda *Telestes* i u različita vremena, kao i njihovog prelaska između starih rijeka i vodenih bazena (Buj i sur., 2022). Izolacija rijeka i jezera u krškom reljefu naših prostora spriječila je protok gena i

omogućila alopatrijsku specijaciju, što je dovelo do velikog broja vrsta roda *Telestes* te velikog udjela endemskih vrsta. Sve vrste roda *Telestes* koje obitavaju u Hrvatskoj, osim *T. souffia* Riso 1827 su stenoendemi (Ćaleta i sur., 2015). Većina endemskih vrsta roda *Telestes* ima izrazito mala područja rasprostranjenosti i male efektivne veličine populacija te se smatraju se ugroženima. Često nastanjuju jednu rijeku ili nekoliko vodnih tijela u jednom krškom polju, što ih čini iznimno osjetljivima na antropogeni utjecaj (Buj i sur., 2017). Uz onečišćenje i regulaciju vodotoka, ove vrste posebno su ugrožene i unošenjem stranih vrsta riba, osobito salmonidnih (Ćaleta i sur., 2015).

1.1.3. Morfologija vrste *T. karsticus*

Kapelska svijetlica (Slika 1) je riba male veličine tijela, sa maksimalnom izmjerenom totalnom duljinom tijela od 153 mm. Tijelo joj je izduženo i bočno spljošteno. Prekriveno je sitnim tankim zaobljenim ljuskama koje se preklapaju, osim u području između donjeg dijela glave i prsnih peraja te između trbušnih peraja. Bočna pruga je kontinuirana i duž nje se proteže tanka, crna izražena linija (Marčić i sur., 2011).



Slika 1. Kapelska svijetlica (*Telestes karsticus* Marčić & Mrakovčić 2011) (autor: P. Mustafić)

Broj ljustaka duž bočne pruge je 45-65, najčešće 49-62. Leđa su joj tamnosive boje, a trbuh srebrno-bijel, ali obojenost može varirati ovisno o podlozi na kojoj živi. Duž boka tijela, od oka do kraja repnog drška proteže se tamna linija koja nije uvijek uočljiva kod živih primjeraka, ali uvijek jasno vidljiva kod konzerviranih. Duljina glave stane oko 4 puta u standardnu duljinu tijela. Oči su smještene bliže vrhu glave i prilično velike. Promjer oka je 3,5 – 4 puta manji od duljine glave. Usta su podzavršna (subterminalna) i bez brkova, a gubica je zaobljena i proteže se malo preko gornje usne. Ždrijelni zubi organizirani su u dva reda. Broj škržnih nastavaka na prvom škržnom luku je 9 – 11. Leđna peraja smještena je iza polovice duljine tijela. Stražnji rub leđne, prsnih i trbušnih peraja je konveksnog oblika, dok je stražnji rub podrepne peraje ravan. Perajne šipčice svih peraja s iznimkom podrepne i trbušne su pigmentirane, a ponekad je pigmentacija prisutna i na koži između njih. Šipčice podrepne peraje su razgranate. Na bazi prsnih peraja nalaze se narančaste mrlje, a na bazama podrepne i trbušnih peraja prisutni su samo tragovi narančastog obojenja (Marčić i sur., 2011). Stražnji rub podrepne peraje je ravan, čime ju se može razlikovati od izrazito morfološki slične vrste *Telestes polylepis* Steindachner 1866 koja ima konkavni stražnji rub podrepne peraje (Marčić i sur., 2011).

1.1.4. Rasprostranjenost i stanište kapelske svijetlice

Kapelska svijetlica je stenoendemska vrsta dunavskog slijeva i endem Hrvatske sa vrlo ograničenim arealom. Iako je tek nedavno opisana, starost ove vrste procijenjena je na 5,3 milijuna godina kada se odvojila od zajedničkog pretka kojeg dijeli sa vrstom *T. polylepis* (Buj i sur., 2017). S obzirom na veličinu areala svrstava se među slatkovodne ribe sa najmanjom rasprostranjenošću, a time i najugroženije, na razini čitave Europe (Marčić i sur., 2021a). Njezina je prisutnost do sada zabilježena na samo 4 lokaliteta na sjeverozapadnoj strani planinskog lanca Velike i Male Kapele: izvor Holjevačko vrilo u Stajničkom polju, potok Sušik u polju Lug, izvor u Drežničkom polju te potok Jasenak u Jasenačkom polju (Marčić i sur., 2021b; Marčić i sur., 2013). Tako maleni raspon distribucije neuobičajen je za ribe koje žive u dunavskom slijevu, gdje su rijeke velike i uglavnom međusobno povezane. Distribucija kapelske svijetlice posljedica je krškog krajolika predjela u kojem živi, gdje nedostaju površinske veze s drugim rijekama pa voda otječe u Dunav podzemnim vezama. Ova je vrsta vrlo dobro prilagođena na krške i hladnovodne uvjete u kojima živi, ali ju mala distribucija čini izrazito osjetljivom. Sve, i najmanje promjene njezinog staništa mogle bi

imati nepovratni utjecaj na strukturu i održivost njezinih populacija. Prema najnovijoj procjeni Crvenog popisa ugroženih vrsta Hrvatske, kapelska svijetlica je ugrožena vrsta (EN) suočena s vrlo visokim rizikom od izumiranja (Marčić i sur., neobjavljeni podaci). Potencijalnu veliku prijetnju predstavlja joj unos piscivornih salmonidnih vrsta u potoke u kojima živi. Također ju ugrožava antropogeni utjecaj u vidu onečišćenja i regulacije vodotoka, kao i klimatske promjene. U budućnosti bi intenzivnije suše u kritičnom periodu mrijesta mogle dovesti do gubitka čitavih generacija (Marčić i sur., 2021a). Raspon distribucije ove vrste u prošlosti bio je nešto veći, ali je u međuvremenu nestala iz pojedinih vodotoka i brojnost joj se znatno smanjila na preostalim lokalitetima. U Stajničkom polju kapelska svijetlica zadnji je put zabilježena 2007. godine sa 12 jedinki, u trenutku kada mali izvor u kojem se nalazila nije imao spoj sa Stajničkom jarugom gdje je potvrđena prisutnost salmonidnih vrsta. Populacija u Drežničkom polju također se sastoji od samo nekoliko jedinki (Marčić i sur., 2021b).

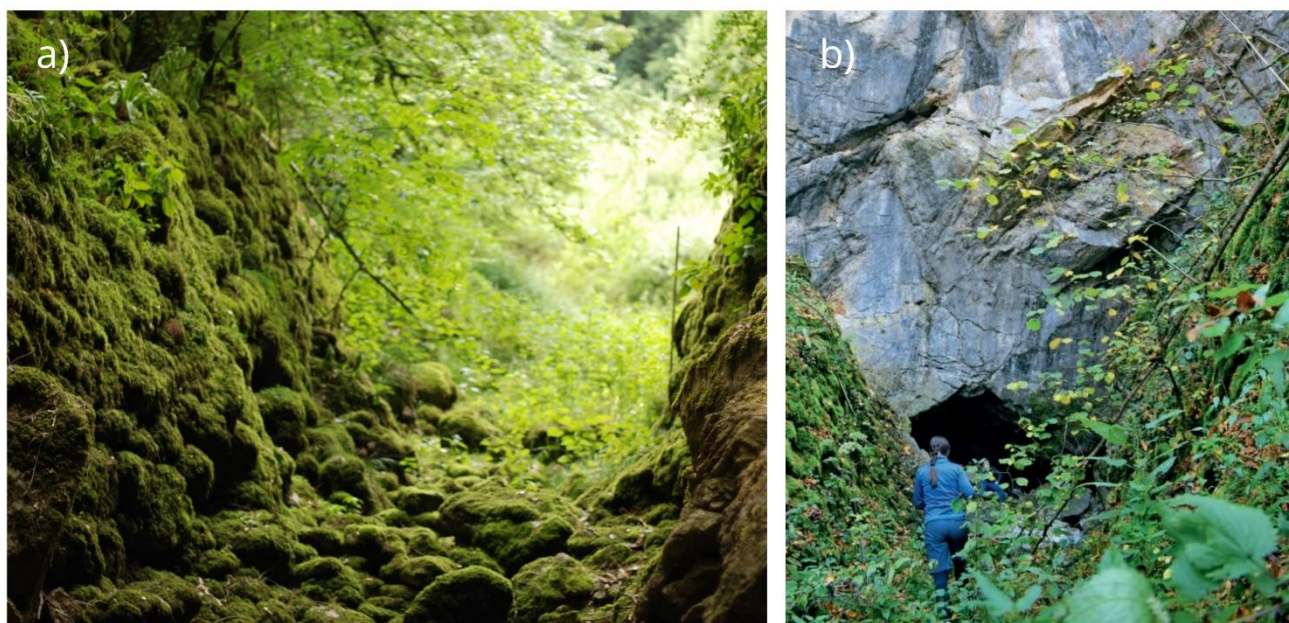
1.1.5. Populacija kapelske svijetlice u potoku Sušik

Najbrojnija populacija *T. karsticus* zabilježena je u potoku Sušik u polju Lug, gdje je ova vrsta ujedno i jedina zabilježena vrsta ribe. Potok Sušik (Slika 3) prihranjuje se vodama s Velike Kapele koje se slijevaju Jasenačkim poljem i poniru u Drežničkom polju, odnosno u njegovom zapadnom dijelu, polju Lug. Duljina toka iznosi oko 5 km, a širina potoka varira od 2 do 10 m.



Slika 3. Potok Sušik u polju Lug za vrijeme visokog vodostaja (autor: A. Milković)

Vodostaj potoka mijenja se ovisno o godišnjim dobima i količini oborina. Nakon obilnih kiša i otapanja snijega dubina potoka je na pojedinim dijelovima veća od 2 m, dok je ljeti dubina manja od 20 cm te potok mjestimično presušuje (Slika 4). U hladnijem dijelu godine, od listopada do travnja, potok ima protok vode od 8 m³/s i više, a u srpnju gotovo i ne teče. Dno potoka prekriva kamenje, pijesak i mulj te mjestimično vodena vegetacija, a riparijsku vegetaciju čine drveće i grmoliko više bilje (Marčić, 2013). Kretanje temperature vode potoka pokazuje sezonski karakter. Na oko 1,5 km sjeverno od naselja Drežnica potok Sušik ponire u istoimeni ponor i špilju. Špilja Sušik (Slika 4) je horizontalan, razgranat objekt sa hidrološki aktivnim glavnim kanalom. U vlažnom dijelu godine ponor je vrlo hidrološki aktivan i dio kanala unutar špilje potpuno potopljen. Površinski dio toka kojim potok teče do ulaza u ponor obzidan je kamenim blokovima kako bi se olakšao protok vode i ocjeđivanje polja. Glavni kanal špilje dugačak je 430 m i cijelom njegovom dužinom prisutan je vodeni tok koji završava sifonom. U iznimnim slučajevima dugotrajnih suša vodeni tok nije prisutan (Butorac i sur., 2019).



Slika 4. a) obzidani dio površinskog toka kojim potok dotječe u ponor – ljeti nema protoka vode (autor: L. Ilijić); b) ulaz u ponor Sušik (autor: T. Medenica)

Nad populacijom se unazad nekoliko godina provodi redovni monitoring. U lipnju 2021. godine je u transektu dugom 200 m zabilježeno 800 odraslih jedinki kapelske svijetlice, što procjenjuje brojnost trenutne populacije na barem 20000 jedinki (Marčić, neobjavljeni podaci).

1.1.6. Biologija i ekologija kapelske svijetlice

Populacija kapelske svijetlice u potoku Sušik procijenjena je kao jedina populacija dovoljno stabilna i velika da joj se učestalim uzorkovanjem ne ugrozi opstanak. Od srpnja 2007. godine do srpnja 2008. godine uzorkovano je uzastopno 12 mjeseci, tijekom kojih je sakupljeno ukupno 630 jedinki za istraživanja biologije i ekologije vrste (Marčić, 2013).

Starost jedinki u potočnoj populaciji kreće se od 0⁺ do 5⁺ godina. Najstarija zabilježena jedinka je ženka u dobi od 5⁺ godina, dok je najstariji mužjak bio u dobi od 4⁺ godina. Generalno najbrojnija dobna skupina u uzorku bila je 1⁺. Ženke kapelske svijetlice imaju veću maksimalnu standardnu dužinu tijela od mužjaka. Najbrojnija dužinska kategorija oba spola je 41-50 mm. Analize mase i dužine tijela ovisno o dobi jedinki pokazale su razliku između spolova. Mužjaci kapelske svijetlice rastu brže od ženki i dosežu maksimum rasta u dobnoj skupini od 3⁺ godine, nakon čega stagniraju i većina jedinki umire. Kod ženki rezultati su pokazali stagnaciju u rastu između dobnih kategorija 1⁺ i 2⁺, nakon čega je vidljiv ponovni rast, vezan uz razvoj gonada koje povećavaju masu jedinke. Omjer spolova u populaciji je ravnomjeran i stabilan (Marčić i sur., 2021b).

Reproduktivni ciklus kapelske svijetlice u najvećoj mjeri određen je uvjetima na staništu – temperaturom i dubinom vode te dužinom dana. Do mrijesta dolazi kada vode ima u izobilju, temperatura je povoljna i ima dovoljno sunčeve svijetlosti potrebne za uspješno razmnožavanje. Spolno zrele jedinke kapelske svijetlice razmnožavaju se jednom godišnje. Period mrijesta je u razdoblju od kraja ožujka do početka svibnja, sa vrhuncem u travnju, kada potok nikada ne presušuje. Temperatura povoljna za mrijest kapelske svijetlice je između 8 i 12°C. Razdoblje mrijesta potvrđeno je vrijednostima gonadosomatskog indeksa mužjaka i mjerenjem promjera jajašaca. Gonadosomatski indeks mužjaka pokazuje jedan godišnji maksimum, dok vrijednost indeksa kod ženki ima više maksimuma kroz godinu, ali se najviša vrijednost kod ženki vremenski podudara sa maksimumom kod mužjaka. Osim vrijednosti gonadosomatskog indeksa, vremenski se podudaraju i mjerenja maksimalne standardne dužine tijela kod mužjaka i ženki, što sve upućuje

na sinkronizaciju procesa sazrijevanja gonada nužnu za uspješan mrijest. Promjer jajašaca kontinuirano se povećava od lipnja do travnja kada su jaja najveća. Jedinke oba spola dosežu spolnu zrelost u ranoj dobi - mužjaci sa totalnim dužinama duljim od 41 mm, a ženke sa totalnim dužinama duljim od 51 mm, što odgovara prvoj godini života (Marčić i sur., 2017a).

Kapelska svijetlica je litofilna vrsta – mrijesti se na otvorenom supstratu, odnosno kamenju, i ne čuva mrijest. Pri mrijestu nema razvijenih ritualna snubljenja, već više mužjaka prati jednu ženku i oplođuju jajašca kada ih ženka izbaci. Jajašca kapelske svijetlice su adhezivna i lijepe se na površinu na koju padnu (Slika 5). Spolni dimorfizam ispoljava se samo u periodu mrijesta, kada se kod ženki može uočiti zadebljanje abdomena, a mužjaci razvijaju mrijesne kvržice po glavi i ljuskama. U vrijeme mrijesta ženke kapelske svijetlice okupljaju se u manja jata. Van sezone mrijesta, veće jedinke kapelske svijetlice žive samostalno. Manje jedinke uvijek se drže zajedno i obično pronalaze zaklon u vegetaciji (Marčić i sur., 2017a).



Slika 5. Oplođena ikr kapelske svijetlice u potoku Sušik 27. travnja 2008. godine (Marčić, 2013)

Rani razvoj kapelske svijetlice popraćen je u laboratorijskim uvjetima na jajašcima sakupljenim iz potoka (Marčić i sur., 2021a). Razvoj ličinka promatran je kroz 55 dana uz morfometrijska i meristička mjerenja (Slika 6). Prosječna ukupna duljina ličinki u trenutku izlijevanja bila je 6,45 mm. Žumanjčana vreća kod svih ličinki bila je potpuno apsorbirana do 9. dana nakon izlijevanja, kada je uočeno i samostalno hranjenje i rad crijeva. Zakrivljavanje urostila dovršeno je između 12. i 16. dana nakon izlijevanja. Repna peraja postaje potpuno račvasta 23. dan nakon izlijevanja. Između 35. i 55. dana nakon izlijevanja šipčice leđne, trbušne i podrepne peraje postaju potpuno

segmentirane. Ličinke dalje rastu u duljinu, koža im je gotovo neprozirna sa brojnim melanoforama i vrlo razvijenim perajama. Metamorfoza je završena i ličinke su sasvim razvijene u juvenilne jedinke (Marčić i sur., 2021a).



Slika 6. *Telestes karsticus*: a) pri izlijevanju; b) 2 dana poslije izlijevanja (p.i.); c) 3 dana p.i.; d) 4 dana p.i.; e) 5 dana p.i.; f) 6 dana p.i.; g) 9 dana p.i.; h) 12 dana p.i.; i) 15 dana p.i.; j) 20 dana p.i.; k) 27 dana p.i.; l) 30 dana p.i.; m) 34 dana p.i. (Marčić i sur., 2021a)

Analizom sadržaja crijeva utvrđeno je da je *T. karsticus* omnivorna vrsta. Udio praznih probavila kroz sva godišnja doba bio je malen, dakle, vrsta se hrani kroz cijelu godinu. U probavilima kapelske svijetlice pronađeni su uglavnom bentički vodeni beskralješnjaci, ali i kopneni beskralješnjaci, biljni materijal, riblji ostaci i alge. S obzirom na to da je kapelska svijetlica jedina vrsta ribe u potoku Sušik, može se zaključiti da je ova vrsta kanibal. *T. karsticus* hrani se oportunistički, konzumirajući vrstu plijena koja joj je najdostupnija u određenom trenutku, pa se može klasificirati kao eurifagni omnivor. Sezonska dinamika prehrane uvjetovana je dostupnom hranom i ekološkim uvjetima u potoku (Marčić i sur., 2017b).

1.1.7. Podzemna populacija kapelske svijetlice

Iako se donedavno pretpostavljalo da kapelska svijetlica sušne ljetne periode, kao i nepovoljne periode u hladnijem dijelu godine, preživljava povlačenjem u podzemlje (Marčić, 2013), kroz brojna terenska istraživanja unazad nekoliko godina ustanovljeno je da ova vrsta u špilji Sušik boravi kroz cijelu godinu. Veličina uspostavljene podzemne populacije procijenjena je na nekoliko stotina jedinki (Bilandžija i sur., 2022). Na području Drežničkog polja nekoliko puta godišnje javljaju se kratkotrajne, nagle i brze poplave, pa je moguće da jedinke uslijed bujanja vode bivaju odnesene u podzemlje. U špilji su također zabilježene i druge vrste vodene faune poput *Austropotamobius torrentium* Schrank 1803, *Ancylus* sp. O. F. Müller 1773, *Synurella* sp. Wrześniowski 1877 i *Asellus aquaticus* Linnaeus 1758 koje prirodno obitavaju u nadzemnom dijelu potoka Sušik. U svibnju 2022. godine u ponoru su pronađena jajašca u razvoju i izlegnuti embriji, što ukazuje na to se jedinke podzemne populacije mogu razmnožavati i dovršiti svoj životni ciklus unutar špilje (Čupić i sur., rad u recenziji). Usporedbom veličine tijela i brzine rasta jedinki iz nadzemne i podzemne populacije utvrđeno je da nadzemne jedinke kapelske svijetlice brže rastu, ali podzemne dostižu veće duljine tijela (Popović, 2021). Čupić i sur. ispitivali su genetsku strukturu, kao i različite morfološke i fiziološke karakteristike jedinki nadzemne i podzemne populacije. Genetska analiza pokazala je da između nadzemne i podzemne populacije nema genetičke različitosti, ali je znatan broj gena različito eksprimiran. Jedinke podzemne populacije pokazale su i brojne fenotipske promjene u usporedbi s nadzemnom populacijom (Slika 7), koje uključuju izmijenjenu morfologiju tijela, smanjenje pigmentacije i promjene u metaboličkim procesima (Čupić i sur., rad u recenziji).

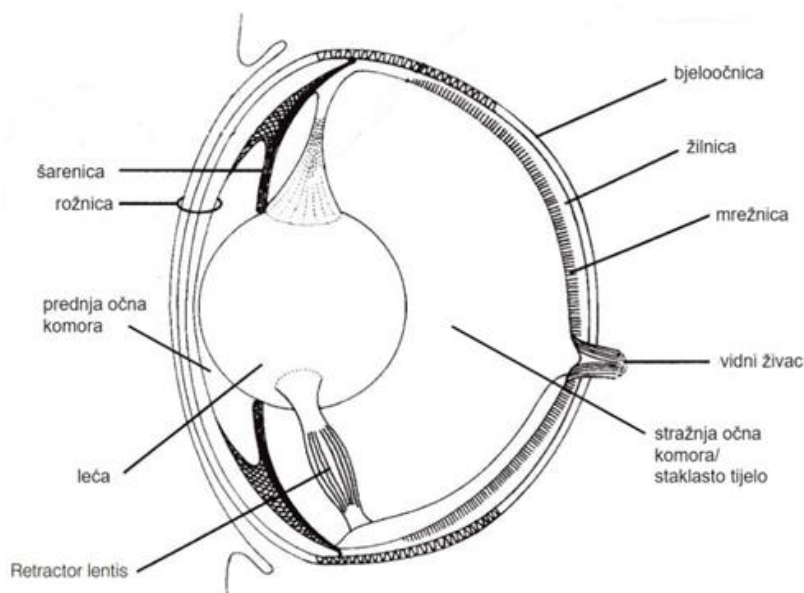


Slika 7. Kapelska svijetlica u ponoru Sušik (autor: B. Jalžić)

Kao vrsta sa stalnom podzemnom populacijom, uz prisutnost nadzemne populacije iste vrste, ova vrsta predstavlja potencijalno važan modelni organizam za proučavanje početnih adaptivnih procesa koji se događaju tijekom kolonizacije podzemnih staništa. Uz to, razjašnjavanje načina na koji ova ugrožena vrsta koristi podzemlje i stupnja njezine prilagođenosti na špiljske uvjete neophodno je za razumijevanje njezine ekologije i provedbu adekvatne zaštite.

1.2. Anatomija ribljeg oka

Organizacija ribljeg oka ima istu opću strukturu koju nalazimo kod većine kopnenih kralješnjaka. Oči su velike i okrugle sa izravnom površinom rožnice i bez kapaka (uz izuzetak morskih pasa). Veličina oka pojedinih vrsta ovisna je o količini svjetlosti dostupnoj u pojedinom staništu (Genten i sur., 2009). Riblje oko se sastoji od 3 koncentrična sloja: vanjskog sloja kojeg sačinjavaju rožnica i bjeloočnica, srednjeg uvealnog sloja i unutarnjeg sloja živčanog tkiva, mrežnice (Slika 8).

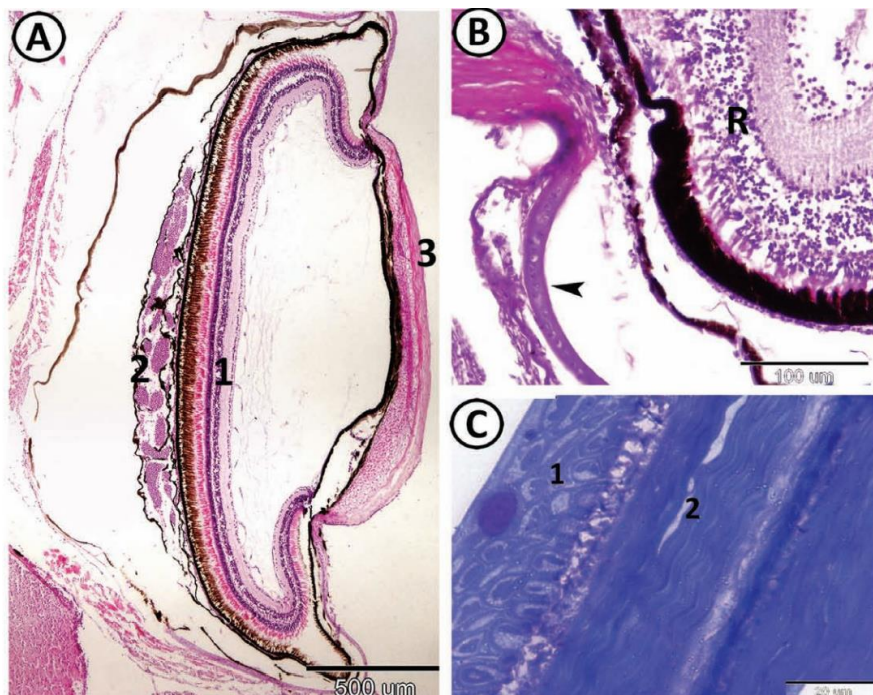


Slika 8. Poprečni presjek ribljeg oka (prilagođeno iz Helfman i sur., 2009)

Dodatne strukture očne jabučice su prednja očna komora, očna vodica, stražnja očna komora ili staklasto tijelo i leća, koje se opisuju kao refraktilni medij oka (Genten i sur., 2009). Očne komore su prostori između leće i rožnice te između leće i mrežnice. Očna vodica je prozirna, želatinozna tekućina slična plazmi koja ispunjava očnu komoru (Mokhtar, 2022). Razvoj očiju kod riba sličan

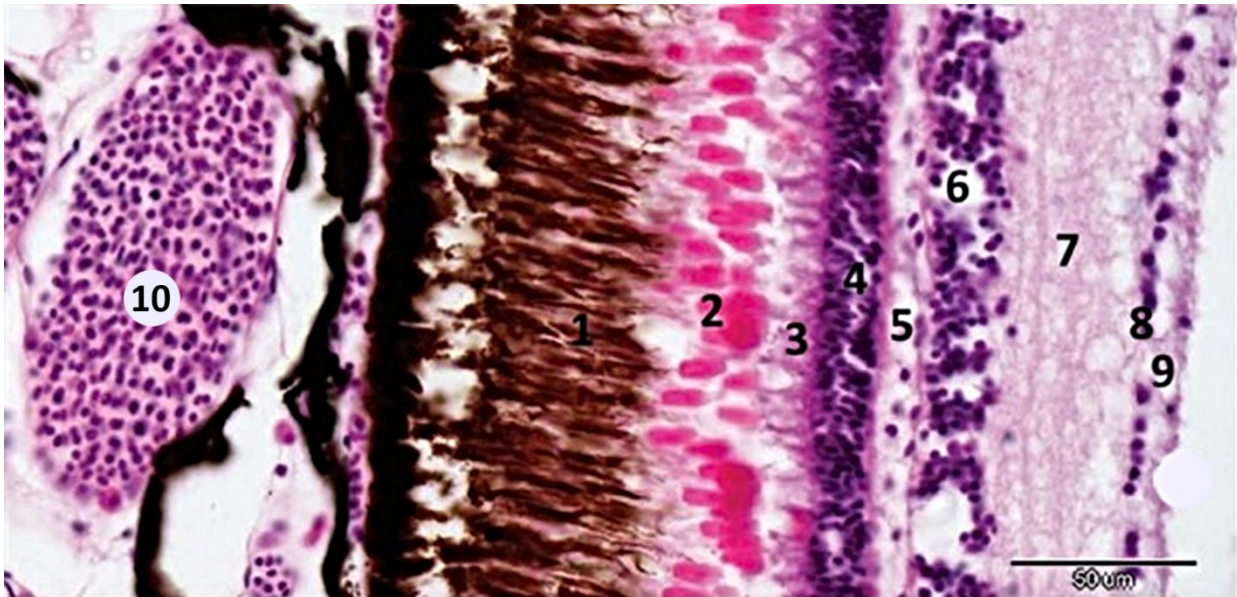
je razvoju oka kod većine kralješnjaka, uz jednu iznimku – oči riba kontinuirano rastu kroz životni vijek. Koštunjače imaju prozirnu, sferičnu leću koja prodire u prednju očnu komoru gotovo do rožnice, pružajući široko vidno polje. Leća se sastoji od ekstracelularnog matriksa (kapsule) kojeg izlučuju stanice sadržane unutar leće. Glavna funkcija leće, uz rožnicu, je prijenos i fokusiranje nadolazeće svjetlosti na mrežnicu. Kopneni kralješnjaci fokus prilagođavaju promjenom oblika leće. Kod riba je leća kruta, pa fokus prilagođavaju pomicanjem leće bliže ili dalje od mrežnice oka. Pokretanjem leće unutar očne jabučice upravlja glatki mišić *retractor lentis* (Helfman i sur., 2009).

Krajnji vanjski sloj oka čine rožnica sa vanjske strane i bjeloočnica sa unutrašnje strane. Rožnica (Slika 9) oka je prozirna, a sastoji se od nepigmentiranog pločastog epitela, membranske strome i tankog endotelija. Epitel rožnice je višeslojan i spaja se sa integumentom glave. Stijenka stražnjeg dijela oka sastoji se od debele bjeloočnice koja se nadovezuje na stromu rožnice. Bjeloočnica je nerefraktilna i kod većine riba ima vanjski omotač od hijalinske hrskavice. Središnji, uvealni sloj oka sastoji se od žilnice i šarenice. Žilnica (Slika 9) je građena od tri sloja: vezivnog sloja uz bjeloočnicu, središnjeg sloja sastavljenog od većih krvnih žila i sloja uz mrežnicu sastavljenog od manjih krvnih žila. Mrežnica (Slika 9) oka ima iznimno veliku potrebu za kisikom, a kod većine riba visoke razine kisika u mrežnici održava koroidna žlijezda, struktura koja okružuje vidni živac na mjestu gdje izlazi iz oka (Helfman i sur., 2009). Na žilnicu nastavlja se šarenica, koja se proteže u tankom sloju preko prednje površine leće, odvajajući prednju i stražnju očnu komoru (Genten i sur., 2009).



Slika 9. Tkivo oka slatkovodne vrste *Epalzeorhynchos bicolor* (Smith, 1931). (A) Poprečni presjek oka sa vidljivom mrežnicom (1), žilnicom (2) i rožnicom (3). (B) stražnji dio oka sa dijelom mrežnice (R); bjeloočnica ojačana vanjskim omotačem od hijalinske hrskavice (vrh strelice). (C) Presjek kroz rožnicu. (1) nepigmentirani, prozirni epitel; (2) stroma rožnice građena od čvrsto povezanih kolagenskih vlakana (Preuzeto iz: Mokhtar, 2022).

Mrežnica oka sastoji se od 7 slojeva i 2 membrane (Slika 10). Krenuvši od vanjskog prema unutarnjem, to su: 1. pigmentni epitel mrežnice, usko prslonjen uz žilnicu (eng. RPE – retinal pigment epithelium); 2. sloj fotoreceptora (štapići/čunjići) (eng. PCL – photoreceptor cell layer); 3. vanjska granična membrana koja razdvaja vanjske dijelove fotoreceptora od njihovih staničnih jezgara; 4. vanjski zrnati sloj koji sadrži jezgre fotoreceptora (eng. ONL – outer nuclear layer); 5. vanjski mrežasti sloj (eng. OPL – outer plexiform layer); 6. unutrašnji zrnati sloj– sadrži stanice koje prenose impuls od fotoreceptora u smjeru vidnog živca (eng. INL – inner nuclear layer); 7. unutrašnji mrežasti sloj – područje formiranja sinapsi (eng. IPL – inner plexiform layer); 8. sloj ganglijskih stanica – sadrži jezgre ganglijskih stanica i mjesto je izlaženja vlakana vidnog živca (eng. ganglion cell layer); 9. unutrašnja granična membrana.



Slika 10. *Epalzeorhynchos bicolor* – čitavi poprečni presjek uvealnog sloja (lijevo) i mrežnice (desno). Slojevi mrežnice: pigmentni epitel (1); sloj fotoreceptora (2); vanjska granična membrana (3); vanjski zrnati sloj (4); vanjski mrežasti sloj (5); unutrašnji zrnati sloj (6); unutrašnji mrežasti sloj (7); sloj ganglijskih stanica (8); unutrašnja granična membrana (9). Uvealni sloj sa zamršenom strukturom arteriola i kapilara (10) (prilagođeno iz Mokhtar, 2022).

Štapići i čunjići su fotoreceptorske stanice koje vidljivu svjetlost pretvaraju u električne signale, koji se zatim putem vidnog živca prenose do mozga. Čunjići se uglavnom nalaze u središnjem dijelu mrežnice, osjetljivi su na boju i omogućuju oštru i detaljnu sliku pri jačem svjetlu. Štapića ima znatno više, nalaze se perifernije u mrežnici i nisu osjetljivi na boju, a služe za raspoznavanje predmeta pri slabom svjetlu i orijentaciju u prostoru. Većina vrsta riba u mrežnici ima oba tipa fotoreceptorskih stanica, a njihov omjer varira ovisno o tipu staništa u kojem žive (Genten i sur., 2009).

1.3. Podzemna staništa

Ispod površine Zemlje prisutne su brojne šupljine i prostori različitih veličina, ispunjeni zrakom i vodom. Biološka klasifikacija i kategorizacija pojedinih tipova podzemnih staništa temelji se na više kriterija koji uključuju geološke karakteristike, strukturu i morfologiju staništa te ključne ekološke čimbenike (Gottstein, 2010). Podzemna staništa variraju od izrazito malih intersticijskih prostora ispod površinskih voda do velikih šupljina poput špilja.

Sva podzemna staništa dijele nekoliko glavnih karakteristika. Prvo, najvažnije objedinjujuće svojstvo svih podzemnih staništa je potpuna odsutnost sunčeve svjetlosti, uz iznimku ulaznih dijelova koji se nalaze blizu zemljine površine. Osim tame, u podzemnim staništima vlada i smanjena varijabilnost drugih ekoloških čimbenika, poput temperature, vlage, i kemije vode, u odnosu na površinska staništa, kao i ograničenost i izoliranost prostora. Također, podzemna staništa su uglavnom izrazito energetske ograničena. U gotovo svakom drugom ekosustavu, fotosintetska proizvodnja biljaka je ključni izvor energije koji pokreće sve druge organizme. U podzemnim okolišima zbog nedostatka sunčeve svjetlosti nema fotosinteze i primarne proizvodnje. Rijetku iznimku predstavljaju špilje i duboka vodena podzemna staništa gdje je prisutna kemoautotrofija, no većina podzemnih staništa oslanja se isključivo na alohtone izvore hrane vanjskog porijekla. Hranjive tvari sa površine Zemlje dospijevaju u podzemni okoliš abiotičkim ili biotičkim putem. Tri glavna izvora organskog materijala za podzemne zajednice organizama u špiljama su voda koja se procjeđuje sa površine, ponirući vodeni tokovi te aktivnost organizama koji ulaze i izlaze iz špilja (Culver i Pipan, 2019). Treba napomenuti i da iako se podzemna staništa, a posebice špilje, općenito smatraju izrazito oligotrofnim sredinama, to nije uvijek slučaj. Razlika u količini hranjivih tvari između nadzemnog i podzemnog staništa nekada nije jako izražena. Primjerice, količine organskog ugljika u špiljskim vodotocima često su u rasponu onih zabilježenih u površinskom toku vode (Culver i Pipan, 2019).

Unatoč specifičnim karakteristikama podzemnog okoliša koje predstavljaju izrazito izazovne uvjete za život, ovakva staništa nipošto nisu oskudna u vidu bioraznolikosti i biomase. U mnoge špilje i druga podzemna staništa postoji konstantan priljev organizama koji tamo obitavaju privremeno ili trajno, iz različitih razloga i potreba. Ponekad nadzemna vodena fauna uslijed bujanja vodotoka biva odnesena u podzemlje. U drugim slučajevima, organizmi migriraju u podzemlje izbjegavajući predatore, ili pak u potrazi za novim prostorom, izvorom hrane ili stabilnijim ekološkim uvjetima od onih koji vladaju u nadzemnom staništu. Mnoge vrste uspješno su razvile brojne prilagodbe koje im omogućavaju rast, razvoj i opstanak u podzemnoj okolini. Dva velika faktora koja svojim sudjelovanjem utječu na razvoj prilagodbi su nedostatak svjetlosti i nedostatak hrane. Obligatne podzemne vrste pokazuju raznovrsne morfološke, fiziološke, bihevioralne i druge specijalne karakteristike kojima se razlikuju od svojih površinskih srodnika i koje se često nazivaju troglomorfim karakteristikama (Tablica 1). Svojom raznolikošću oblika i

ekoloških uvjeta, podzemna staništa udomljuju izrazito raznoliku i brojnu podzemnu faunu (Gottstein, 2010).

Tablica 1. Troglomorfne karakteristike podzemne faune (Culver i Pipan, 2013)

Morfološke	Ekološke i fiziološke	Bihevioralne
reducirane oči, pigmentacija i krila	smanjena stopa metabolizma	smanjen odgovor na alarmne znakove
specijalizirani nevizualni osjetilni organi	otpornost na gladovanje	povećana osjetljivost na vibracije
stanjivanje kutikule	reduciran cirkadijalni ritam	smanjeno intraspecifično agresivno ponašanje
modifikacija hranidbenih struktura	smanjen broj i povećan volumen jajašaca	
smanjen broj ljuski (ribe)	dulji životni vijek	
izduljene tjelesnih produžetaka		

1.4. Ribe u podzemnim staništima

Danas je poznato više od 350 vrsta riba koje obitavaju u špiljama i drugim podzemnim staništima, od kojih najmanje 199 čine vrste koje su obligatni stanovnici podzemnih voda (Proudlove, 2010; Niemiller i Soares, 2015). Prisutne su na svakom kontinentu osim Antarktike, a najveća taksonomska raznolikost zabilježena je u krškim podzemnim staništima Azije, posebice jugoistočne Azije. Najviše poznatih vrsta pripada redovima Cypriniformes i Siluriformes, koji zajedno čine 80% cjelokupne raznolikosti podzemnih riba (Niemiller i sur., 2019). Većina živi u slatkoj vodi, ali poznato je i nekoliko vrsta iz anhidralnih i morskih podzemnih voda (Romero, 2009). Pojedine vrste poznate su iz samo jednog primjerka, dok su druge predstavljene s jednom ili više populacija. Gustoća populacija podzemnih riba obično je mala, uključujući stotine ili najviše tisuće jedinki (Helfman i sur., 2009). U nekim slučajevima jedinke ili populacije slobodno ulaze i izlaze iz podzemnog staništa; u drugima su izolirane od površinske vode. Kao i većina obligatnih podzemnih organizama, ove vrste pokazuju niz specifičnih karakteristika povezanih sa životom u neprekidnom mraku. Najznačajnije morfološke prilagodbe uključuju degeneraciju očiju, smanjenje pigmentacije, pojačani razvitak mehanosenzornih i kemosenzornih sposobnosti te često razvoj izduženijih peraja i većeg, vitkijeg oblika tijela (Niemiller i Soares, 2015). Kod mnogih vrsta zabilježena je smanjena stopa rasta i metabolizma, duži životni vijek te kasnije dostizanje spolne zrelosti usporedbi sa površinskim srodnicima. Također, mnoge vrste talože povećane količine lipida u tijelu kako bi se nosile sa razdobljima ograničenosti izvora hrane (Niemiller i sur.,

2019). Navedene prilagodbe razvile su se kod brojnih svojiti riba diljem svijeta kao rezultat sličnih selektivnih pritisaka vezanih uz podzemna staništa. Međutim, točni mehanizmi razvoja ovih prilagodbi nisu u potpunosti razjašnjeni.

1.4.1. Uloga fenotipske plastičnosti u adaptaciji meksičke tetre na podzemlje

Istraživanje razvoja ovih prilagodbi od velikog je interesa za područje evolucijske biologije. Podzemne riblje vrste predstavljaju izvrstan model za proučavanje adaptivne evolucije, posebice u slučajevima prisutnosti površinskih srodnika. Široko prihvaćeni model evolucije podzemnih životinja pretpostavlja genetsku varijaciju unutar populacije površinskih predaka, koja rezultira novim mutacijama te postupno, djelovanjem prirodne selekcije, razvitkom organizama prilagođenih na podzemni okoliš. Takav se proces odvija kroz brojne generacije i izrazito je dugotrajan. Međutim, brzina razvoja prilagodbi kod nekih vrsta sugerira mehanizme koji djeluju u puno kraćim vremenskim okvirima (Bilandžija i sur. 2020).

Slatkovodna vrsta meksička tetra (*Astyanax mexicanus* De Filippi 1853) predstavlja izvanredan evolucijski i razvojni modelni organizam za proučavanje razvoja prilagodbi na podzemna staništa. Ova vrsta ima površinsku, pigmentiranu formu sa očima i sposobnošću vida te više špiljskih formi reduciranih očiju i pigmentacije, sa razvijenim prilagodbama ponašanja i metabolizma na život u podzemlju (Bilandžija i sur., 2020). Pretpostavlja se da se kolonizacija špilja te razvoj špiljskih formi dogodio u relativno kratkom razdoblju, tijekom zadnjih 20 (Fumey i sur., 2018) do 200 (Herman i sur., 2018) tisuća godina. Također, špiljske forme *A. mexicanus* zadržavaju se unatoč protoku gena između površinskih i podzemnih populacija ove vrste (Bilandžija i sur., 2020). Površinske i špiljske forme uspješno se uzgajaju i razmnožavaju u laboratoriju, uključujući i hibridizaciju, pa su na njima provedena brojna genetska istraživanja (Bilandžija i sur., 2020), no u genotipu špiljskih formi nisu utvrđene značajne mutacije, čak ni u genima povezanim s degeneracijom očiju (Hinaux i sur., 2013; Ma i sur., 2014).

Bilandžija i sur. (2020) proveli su istraživanje u kojem su površinske forme *A. mexicanus* uzgajane u potpunom mraku u trajanju od 2 godine, nakon čega je uspoređena ekspresija gena i fenotipskih karakteristika sa jedinkama površinske forme uzgajanim u uvjetima izmjene sv

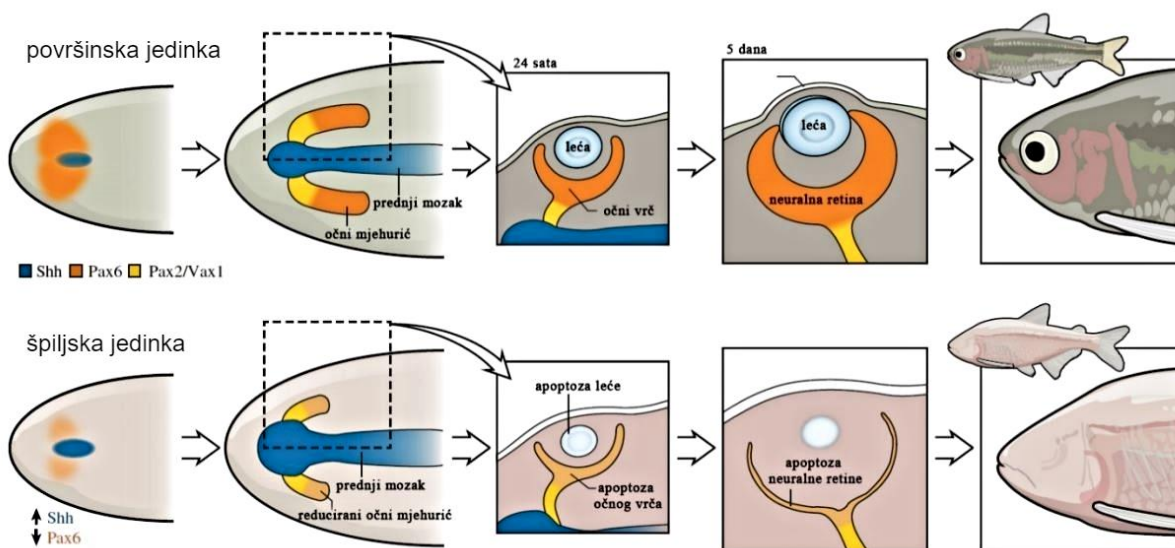
jetla i mraka. Izlaganje površinskih jedinki mraku izazvalo je niz metaboličkih, neuroloških, morfoloških i molekularnih promjena koje odgovaraju promjenama prisutnim kod špiljskih formi. Ribe uzgajane u mraku pokazale su promjene u ekspresiji brojnih gena vezanih uz metabolizam lipida, pigmentaciju, cirkadijalni ritam i vizualnu percepciju, jaču otpornost na izgladnjivanje, višu razinu masti, hormona stresa i hormona rasta, kao i morfološke promjene u debljini slojeva mrežnice oka u usporedbi sa jedinkama uzgajanim u uvjetima izmjene svjetla i mraka. Navedene promjene razvile su se unutar jedne generacije kao početni plastični odgovor fenotipa na izlaganje tami. Plastični odgovor organizma na izmijenjene uvjete okoline može biti adaptivan ili neadaptivan. Naknadno, selekcija djeluje u korist adaptivnih plastičnih odgovora i protiv neadaptivnih. Genetska asimilacija plastičnih odgovora mogla bi biti temeljni mehanizam brze adaptivne evolucije špiljskih formi *A. mexicanus*. Genetska asimilacija je proces kojim se svojstvo koje je bilo izazvano izravnim utjecajem okoliša izgubi „okolišnu osjetljivost” tj. plastičnost i postane fiksirano, konzistentno prisutno u populaciji bez obzira na okolišne uvjete (Ehrenreich i Pfennig, 2016). Rezultati ovog istraživanja snažno impliciraju fenotipsku plastičnost kao važan mehanizam koji omogućuje brzu evoluciju svojstava nužnih za uspješnu kolonizaciju podzemnih staništa (Bilandžija i sur., 2020).

1.4.2. Oči riba u podzemnim staništima

Degeneracija ili gubitak očiju evoluirao je u mnogim svojstama podzemnih riba diljem svijeta, a stupanj razvoja ove regresivne karakteristike ovisno o vrsti varira od blažih promjena u veličini oka i nekih njegovih struktura do potpunog gubitka očiju i sposobnosti vida. U mnogim slučajevima različiti stupnjevi degeneracije očiju uočeni su i unutar iste vrste. Razvoj i održavanje osjetila koje u mraku nema nikakvu korist predstavlja energetski trošak koji smanjuje fitness organizma, pa posljedično pojedinci sa manjim ili degeneriranim očima imaju selektivnu prednost (Romero, 2009).

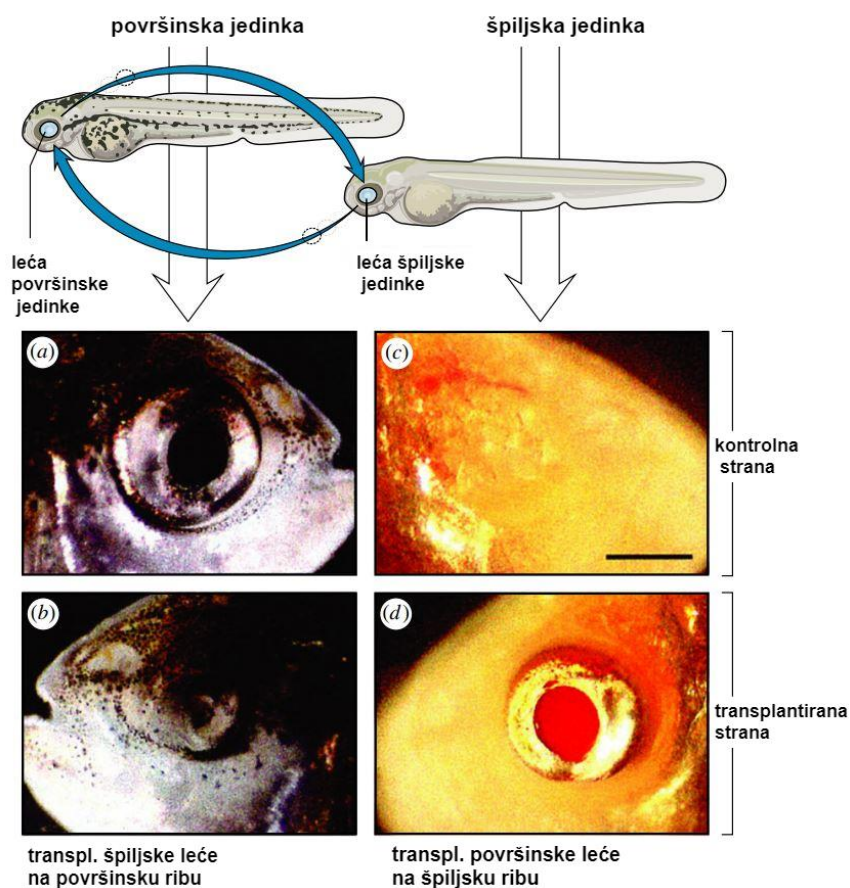
Molekularni i stanični mehanizmi degeneracije oka najopsežnije su proučavani kod meksičke tetre. Površinske forme ove vrste slijede normalan obrazac razvoja koji vodi do potpuno razvijenih i funkcionalnih očiju, dok špiljske forme u odrasloj dobi imaju male, nefunkcionalne ili čak potpuno odsutne oči (Jeffery i sur., 2003). Istraživanje koje su proveli Yamamoto i sur. (2004) sugerira da

važnu ulogu u degeneraciji oka kod riba ima gen *Shh*. Pri normalnom razvoju oka, signalizacija gena *Shh* iz prednjeg dijela neuralne ploče diktira razinu ekspresije gena *Pax6*, *Pax2* i *Vax2*, koje su ključne za određivanje razmaka između očiju i veličine očnog vrča iz kojeg se kasnije razvija mrežnica. Kod špiljskih formi razine *Shh* su povišene, čime se narušava ravnoteža između razina *Pax6*, *Pax2* i *Vax2* i što rezultira smanjenjem očnog vrča i produljenjem očnog drška. Zatim, nakon 24 h, započinje apoptoza leće i mrežnice te gubitak oka (Slika 11). Ovoj pretpostavci odgovaraju i rezultati dobiveni induciranjem ciljanih razina *Shh*. Prekomjerna ekspresija *Shh* kod površinskih formi rezultirala je fenotipom oka izrazito sličnim onome kod špiljskih formi, dok je inhibicija *Shh* kod špiljskih formi dovela do razvoja nešto većih očiju (Yamamoto i sur., 2004).



Slika 11. Razvoj oka kod površinske i špiljske jedinke *A. mexicanus*. Plavom, narančastom i žutom bojom označeni su geni *Shh*, *Pax6* i *Pax2/Vax1*. Jačina boje odgovara razini ekspresije pojedinih gena. Kod špiljske jedinke smanjena je razina *Pax6*, a povećana razina *Shh* i *Pax2/Vax1*. Nakon 24 h započinje apoptoza leće te zatim apoptoza mrežnice i gubitak oka. (Prilagođeno iz Krishnan i Rohner, 2017)

Apoptozu leće u razvoju uzrokuje smanjena ekspresija *Pax6*, čime započinje proces degeneracije oka (Jeffery i Martasian, 1998). Kako bi se ispitalo je li apoptoza stanica u leći odgovorna za poticanje degeneracije čitavog oka, Yamamoto i Jeffery (2000) transplantirali su leću površinske jedinke u očni vrh embrija špiljske jedinke iste dobi, kao i leću špiljske jedinke na površinsku jedinku (Slika 12). Transplantacija je obavljena na jednom oku, dok je drugo oko služilo kao kontrola. Transplantirano oko na špiljskoj jedinki normalno se razvilo, sa mrežnicom i fotoreceptorskim stanicama, iako u nešto manjoj veličini. Kod površinske jedinke transplantirano oko ostalo je nerazvijeno. Ovi rezultati sugeriraju da leća ima ključnu ulogu u razvoju oka te da svojim signaliziranjem utječe na razvoj drugih očnih tkiva (Yamamoto i Jeffery, 2000).

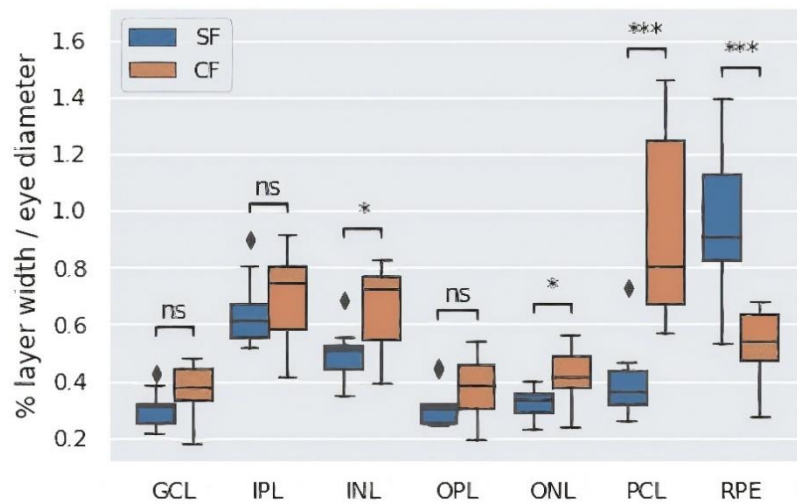


Slika 12. Leća kao ključni faktor u razvoju oka i degeneraciji kod podzemnih riba. Degenerirano oko nakon transplantacije leće špiljske jedinke na površinsku jedinku (b). Leća površinske jedinke transplantirana na špiljsku jedinku inducirala razvoj oka (d). Kontrolne strane bez transplantacije (c) i (d). Skala 1 mm. (prilagođeno iz Krishnan i Rohner, 2017)

1.4.3. Utjecaj konstantne tame i fenotipska plastičnost u očiju riba

Kako bi istražili rane plastične odgovore meksičke tetre na boravak u tami, Bilandžija i sur. (2020) izložili su površinske jedinke laboratorijskim uvjetima konstantnog mraka (SFDD – surface fish dark dark) u trajanju od 2 godine. Morfološka usporedba mrežnice jedinki uzgajanih u mraku sa kontrolnom skupinom jedinki uzgajanom u uvjetima izmjene svjetla i mraka (SFLD – surface fish light dark) pokazala je da su kod skupine SFDD prisutni dobro razvijeni slojevi mrežnice te, iznenađujuće - zadebljanje, odnosno proliferacija stanica u slojevima INL, ONL i PCL u odnosu na skupinu SFLD. Suprotno očekivanom smanjenju i degradaciji tkiva mrežnice, proliferacija stanica može se protumačiti kao neadaptivni plastični odgovor na nedostatak svjetlosti. Mrežnica koštunjača održava se i raste tijekom cijelog života ribe opetovanim stvaranjem novih stanica iz niša matičnih stanica (Otteson i sur., 2001). Spomenuti slojevi su regije stanične proliferacije, pa je moguće da nedostatak svjetlosti aktivira mitotičku aktivnost u ovim slojevima mrežnice kao kompenzaciju zbog neispravnog prijenosa svjetlosti iz leće i stresa inducirano na mrežnicu (Bilandžija i sur., 2020; Alunni i sur., 2007).

Čupić i sur. (rad u recenziji) napravili su morfološku analizu građe oka i mrežnice jedinki nadzemne (SF – surface fish) i podzemne (CF – cave fish) populacije kapelske svijetlice uzetih iz prirode. Usporedba između skupina pokazala je da je veličina oka CF manja nego kod SF, no svi slojevi mrežnice osim RPE širi su kod CF nego kod SF. Kod CF utvrđeno je statistički značajno zadebljanje u slojevima INL, ONL i PCL (Slika 13), jednako kao i u istraživanju provedenom na meksičkoj tetri. Ovi rani neadaptivni odgovori mrežnice oka *A. mexicanus* i *T. karsticus* na promjenu svjetlosnog režima u skladu su s činjenicom da su plastični odgovori obično nasumični u svom adaptivnom ishodu (Ghalambor i sur., 2007) te ukazuju na to da bi negativna selekcija usmjerena na ovaj početni neadaptivni odgovor mogla biti uključena u evoluciju degeneracije oka.



Slika 13. Širina pojedinih slojeva mrežnice nadzemne i podzemne populacije *T. karsticus* iz prirode. Kod podzemne populacije vidljivo statistički značajno zadebljanje u slojevima INL, ONL i PCL. (Čupić i sur., rad u recenziji)

2. Cilj istraživanja

Prethodnim istraživanjem utvrđeno je da se morfologija mrežnice oka jedinki podzemne populacije *T. karsticus* iz prirode razlikuje od mrežnice oka nadzemne populacije. Smatra se da je ova promjena u građi inducirana boravkom u tami te da označava početak procesa prilagodbe na podzemne ekološke uvjete.

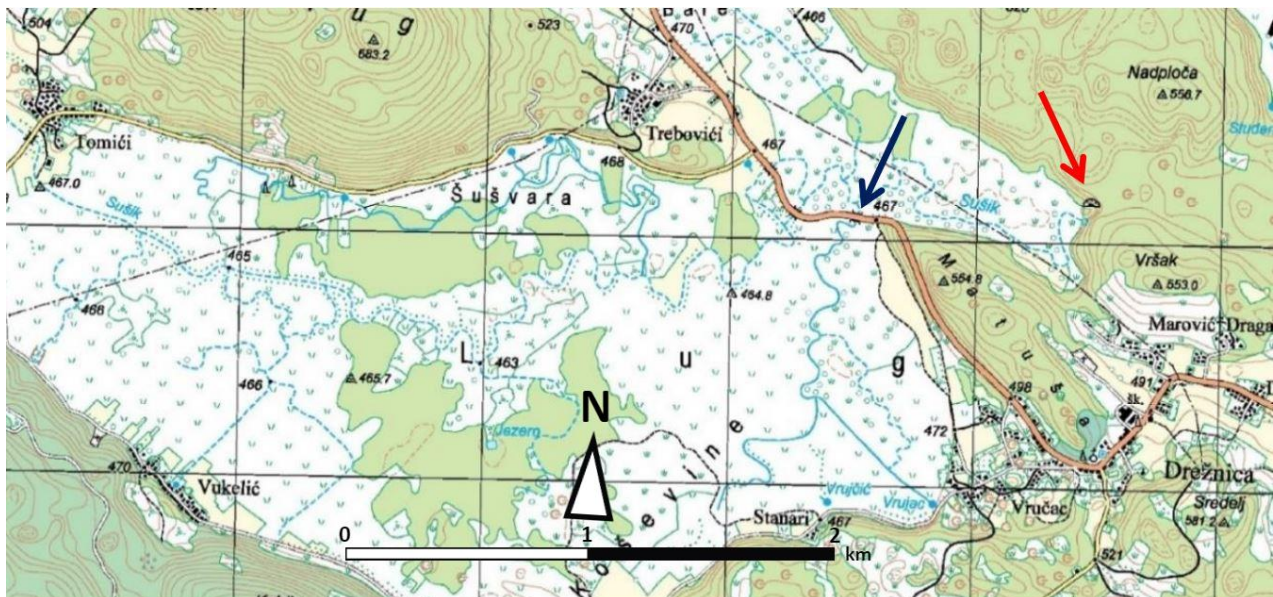
Cilj ovog rada je pobliže istražiti mehanizme i vrijeme potrebno za razvoj prilagodbi kapelske svjetlice, specifično prilagodbe očiju, na život u podzemlju. U vidu tog cilja jedinke nadzemnog i podzemnog porijekla izložene su različitim svjetlosnim eksperimentalnim uvjetima u laboratoriju, u trajanju od 22 mjeseca, te je provedena analiza i usporedba građe mrežnice oka između različitih eksperimentalnih skupina.

Pretpostavka istraživanja je da će mrežnica oka kapelskih svjetlica pokazati fenotipske promjene ovisno o porijeklu i eksperimentalnim uvjetima kojima su jedinke bile izložene.

3. Materijali i metode

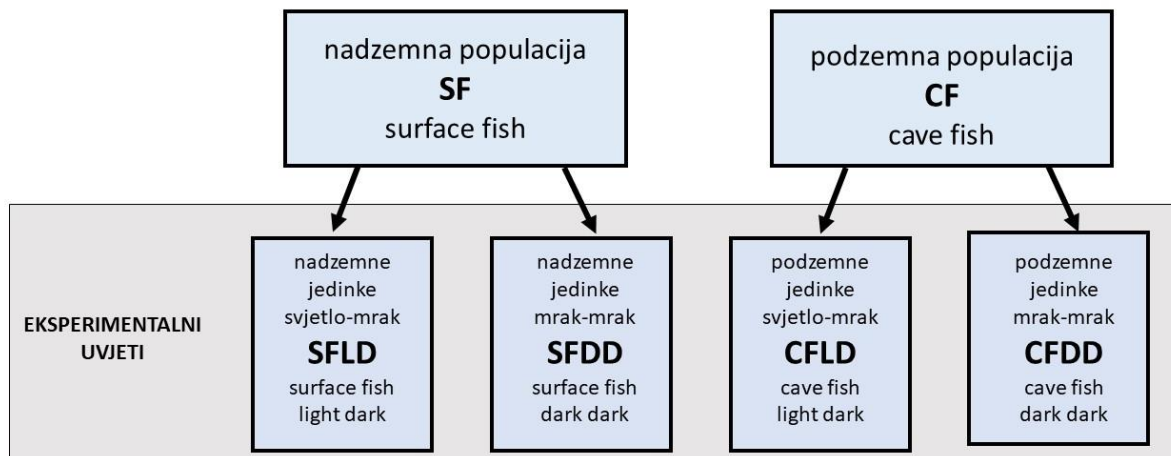
3.1. Uzorkovanje i uzgoj jedinki u laboratoriju

Uzorci obrađivani u ovom istraživanju su histološki preparati oka kapelske svijetlice. Jedinke kapelske svijetlice sakupio je doc. dr. sc. Zoran Marčić u srpnju 2020. godine metodom elektroribolova, pomoću aparata marke Hans Grassl, modela IG-200-1. Nadzemne jedinke uzorkovane su u potoku Sušik, a podzemne u ponoru Sušik. Lokacije uzorkovanja prikazane su na Slici 14.



Slika 14. Lokacije uzorkovanja; plavom strelicom označena nadzemna lokacija – potok Sušik, crvenom strelicom označena podzemna lokacija – ponor Sušik

Jedinke su nakon uzorkovanja prebačene na Institut Ruđer Bošković. Nadzemna skupina i podzemna skupina jedinki zasebno su nasumično razdijeljene između 2 eksperimentalna svjetlosna režima: LD – svjetlo mrak (light dark) i DD – mrak mrak (dark dark). Ovakva razdioba rezultirala je s 4 skupine – 2 kontrolne i 2 eksperimentalne, kako je prikazano na Slici 15.



Slika 15. Dizajn istraživanja – podjela na 4 skupine *T. karsticus*

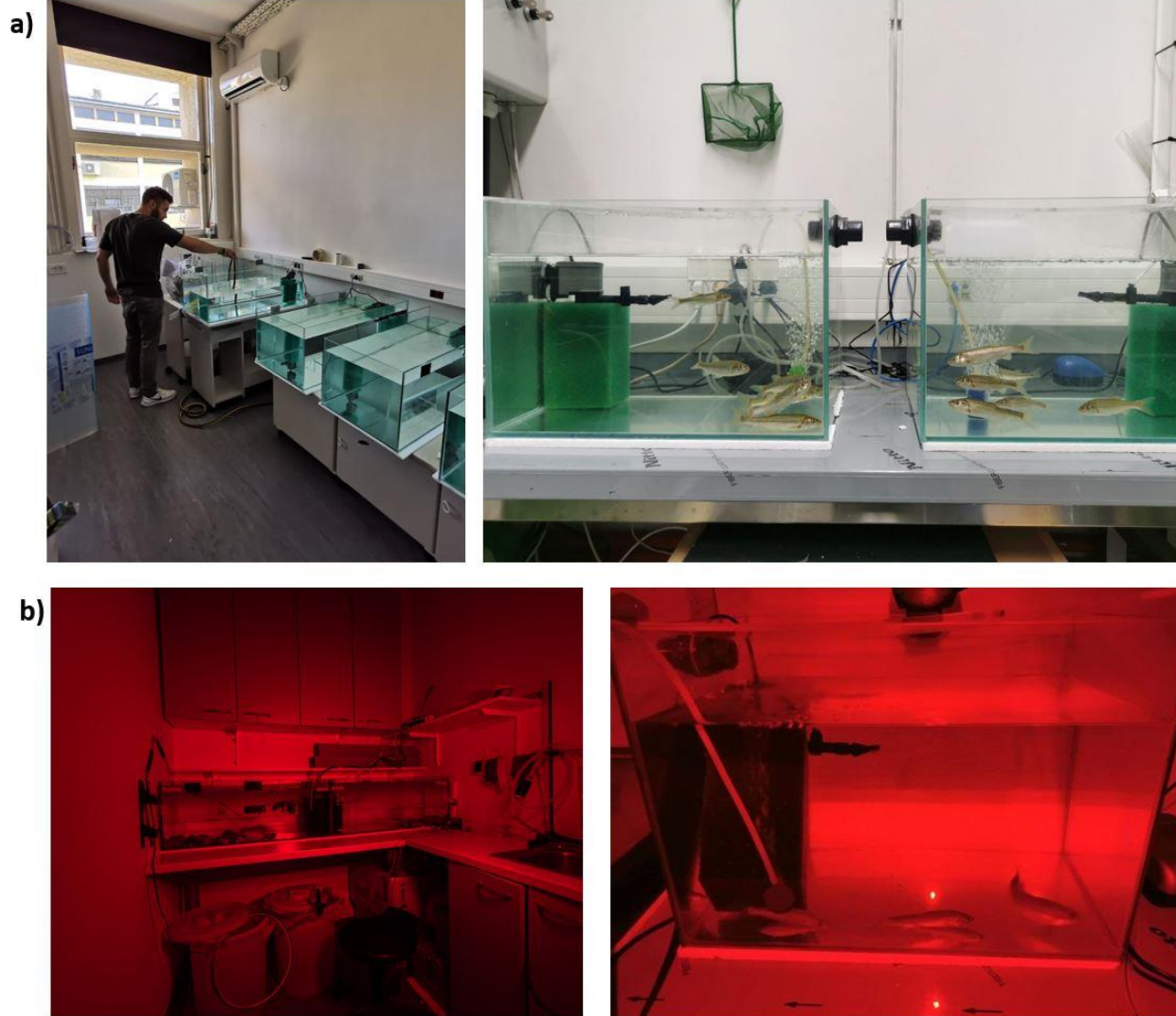
Eksperimentalni uvjeti svake skupine prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Eksperimentalni svjetlosni uvjeti i broj jedinki u skupinama *T. karsticus*

Skupina	Kontrolna/ eksperimentalna	Broj jedinki	Osvjetljenje
1. SFLD - nadzemne jedinke u uvjetima nadzemnog osvjetljenja	kontrolna	9	prirodni ciklus dana i noći; zadnjih 6 mj. 12-12 sati svjetlo-mrak
2. SFDD - nadzemne jedinke u uvjetima podzemnog osvjetljenja	eksperimentalna	5	konstantni mrak
3. CFDD - podzemne jedinke u uvjetima podzemnog osvjetljenja	kontrolna	8	konstantni mrak
4. CFLD - podzemne jedinke u uvjetima nadzemnog osvjetljenja	eksperimentalna	5	prirodni ciklus dana i noći; zadnjih 6 mj. 12-12 sati svjetlo-mrak

U svrhu simulacije prirodnih uvjeta nadzemnog osvjetljenja skupine SFLD i CFLD su u laboratoriju izložene izmjeni dana i noći prateći prirodni ciklus, osim zadnjih 6 mjeseci kada su držane u kontroliranim uvjetima izmjene svjetla i mraka svakih 12 sati, dok su skupine SFDD i CFDD uzgajane u konstantnom mraku koji simulira prirodno podzemno osvjetljenje (Slika 16).

Ribe su uzgajane pri temperaturi od $\sim 22^{\circ}\text{C}$ u akvarijima od 120 L. Sve skupine hranjene su istom hranom: ekstrudiranom hranom za ribe (S.A.K. 55 granula, EXOT HOBBY, Češka) i smrznutim ličinkama crvenog komarca (Petra Aqua, cat. #Y306). Ribe uzgajane u konstantnom mraku su za potrebe hranjenja i manipulacije izlagane isključivo crvenoj svjetlosti.

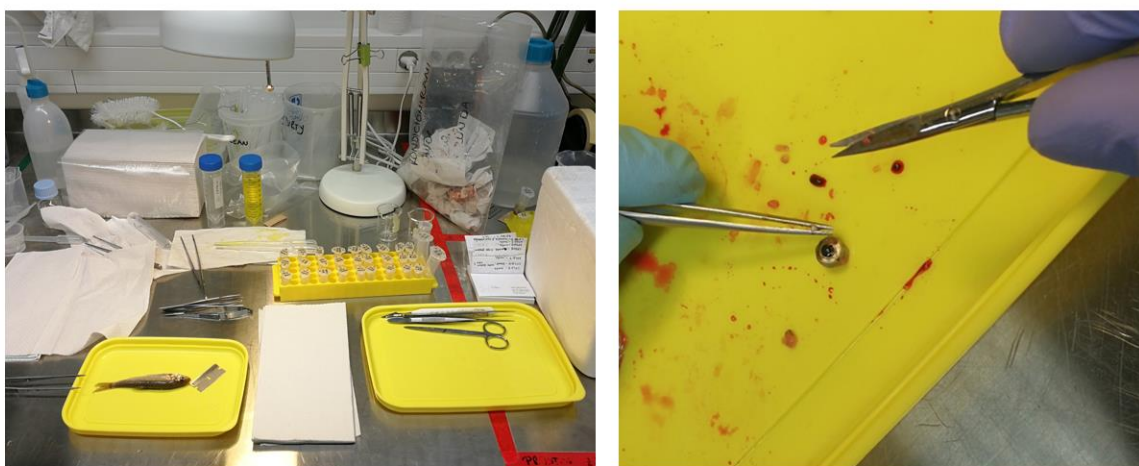


Slika 16. Uzgoj u laboratoriju: a) skupine SFLD i CFLD u uvjetima izmjene svjetla i mraka; b) skupine SFDD i CFDD u konstantnom mraku (autor: Marko Lukić)

3.2. Izrada histoloških preparata

U svibnju 2022. godine jedinke kapelske svjetlice sam eutanazirala uranjanjem u ledenu vodu, nakon čega je uslijedila sekcija (Slika 17). Svakoj jedinki izolirala sam lijevo i desno oko.

Oči sam odmah nakon izolacije pohranila u Bouinov fiksativ, u kojem su stajale 24 sata na sobnoj temperaturi. Omjer tkiva i fiksativa bio je 1:10 u korist fiksativa, odnosno tkivo je plutalo u fiksativu. Nakon 24 sata oči sam isprala pod tekućom vodom, dok tkivo nije prestalo otpuštati žutu boju iz fiksativa, i zatim ih prebacila u 70%-ni alkohol etanol. Tkiva u 70%-nom etanolu moraju biti minimalno 2 dana, a mogu stajati i nekoliko tjedana.



Slika 17. Sekcija jedinki kapelske svjetlice i izolacija očiju

Nakon fiksacije tkiva se uklapaju u parafinske blokove, kako bi ih se moglo rezati uz pomoć mikrotoma i na taj način dobiti vrlo tanke presjeke pogodne za mikroskopiranje. Za svaku jedinku izrađivala sam histološki preparat lijevog oka. Desna oka su sačuvana u 70%-nom etanolu kako bi mogla biti naknadno iskorištena po potrebi.

Najprije je iz uzoraka tkiva potrebno postupno ukloniti svu vodu, čime se smanjuju oštećenja u tkivu (Mescher, 2013). Dehidracija tkiva sastoji se od provođenja tkiva kroz rastući niz koncentracije alkohola etanola i zatim stavljanja u kloroform (Tablica 3). Prebacivanje tkiva iz otopine u otopinu napravila sam dekantiranjem, tako što sam pridržavala uzorak pincetom u posudi te izlivala prethodnu otopinu i dodavala slijedeću. Kao posude korištene su Eppendorf epruvete od 1,5 mL. Nakon alkohola, uzorke tkiva sam prebacila u staklene bočice, prekrila aluminijskom folijom i ostavila preko noći u zatvorenom neupaljenom digestoru.

Tablica 3. Vremensko trajanje i kemikalije korištene u dehidraciji tkiva

Kemikalija	Trajanje u satima
70%-ni alkohol	48+
80%-ni alkohol	1
96%-ni alkohol	1
100%-ni alkohol 1	1
100%-ni alkohol 2	1
kloroform	preko noći (12+)

Nakon dehidracije slijedi uklapanje uzoraka tkiva u parafinske blokove, odnosno paraplast. Koraci uklapanja u paraplast prikazani su u Tablici 4. Uklapanje tkiva radila sam sa 10 uzoraka istovremeno. Prva tri koraka odvijaju se u peći na temperaturi od 60°C, koja sprječava hlađenje i stvrdnjivanje paraplasta, a ujedno omogućava i isparavanje kloroforma kako bi paraplast mogao prožeti cijelo tkivo. Za vrijeme rada u peći uzorci su bili smješteni u staklene posudice, iz kojih sam izlijevala i dolijevala smjese u odgovarajućim vremenskim intervalima, lagano pridržavajući uzorak pincetom. Za uklapanje uzorka u čisti paraplast prethodno sam kao kalup izradila lađice od papira. Uzorke sam pomoću igle i pincete položila na sredinu dna lađice, sa prednjim dijelom oka okrenutim prema dnu lađice. Zatim sam preko uzorka izlila čisti tekući paraplast iz dispenzera, te ostavila lađice da se stvrdnjavaju na sobnoj temperaturi.

Tablica 4. Postupak uklapanja tkiva u paraplast

Smjesa	Trajanje u minutama
Kloroform: paraplast (1:1)	50
Paraplast 1	50
Paraplast 2	50
Čisti paraplast iz dispenzera	ulijeva se u lađice i ostavlja na sobnoj temp. do stvrdnjavanja

Za rezanje tkiva uklopnjenog u blokove paraplasta koristila sam rotacijski mikrotom (Slika 18). Blokove sam rezala na debljinu od 12 mikrona. U pojedinim slučajevima je zbog strukture i raspadanja tkiva bilo potrebno napraviti nešto deblji prerez, do maksimalno 15 mikrona. Blokove sam rezala dok nisam došla do sredine oka, gdje je promjer oka najveći. Rezove sam zatim kistom prenijela u vodenu kupelj s destiliranom vodom zagrijanom na 50°C kako bi se izravnali.



Slika 18. a) rezanje blokova uz pomoć mikrotoma (desno) i vodena kupelj (lijevo); b) dobiveni rezovi

Prije sakupljanja rezova, predmetna stakalca sam namazala glicerom, koji služi kao adhezivno sredstvo koje zalijepi rez za stakalce, te ih pustila da se osuše na zraku. Za svaki uzorak odabrala sam u prosjeku 9 najboljih rezova, koje sam iz vodene kupelji prikupila na više predmetnih stakalaca. Na svako pojedino stakalce prikupila sam 3-4 reza istog uzorka. Nakon prikupljanja rezova stakalca sam ostavila da se suše na stalku na sobnoj temperaturi minimalno 2 dana prije daljnje obrade.

Za bojanje preparata pomoću hematoksilina i eozina (HE) koristila sam protokol prikazan u Tablici 5. Pri bojanju koristila sam sljedeće kemikalije: ksilen (ksilol), alkohol etanol različitih koncentracija, destiliranu vodu, Hematoksin H (HEMH-44/19, BioGnost) te 0,5%-ni alkoholni Eozin Y (EOYA-05-22/19, BioGnost). Samo bojanje odvija se tek nakon koraka deparafiniranja, odnosno uklanjanja paraplasta u ksilenu, te rehidriranja tkiva uz pomoć opadajućih koncentracija alkohola i vode. Bojanje mješavinom hematoksilina i eozina omogućuje jasno razlikovanje jezgara i citoplazmatskih struktura tkiva. Hematoksin boji plavoljubičasto staničnu jezgru i organele s mnogo RNA, dok eozin boji ružičasto do crveno citoplazmu, eritrocite i vezivno tkivo. Nakon

ispiranja u vodi, tkivo se ponovno dehidrira rastućim koncentracijama alkohola i prosvjetljuje u ksilenu. Od svakog uzorka odabrala sam 3 najbolja predmetna stakalca za bojanje. Bojanje sam napravila u upaljenom digestoru, u serijama od po 10 predmetnih stakalaca (Slika 19). Kadnicu za bojanje s umetnutim stakalcima prebacivala sam redom iz posude u posudu s odgovarajućim kemikalijama i u odgovarajućim vremenskim intervalima.

Tablica 5. Protokol za bojanje hematoksilinom i eozinom

Deparafiniranje i rehidriranje	Trajanje u minutama ' i sekundama "
Ksilen 1	2'
Ksilen 2	2'
Ksilen 3	2'
100%-ni alkohol 1	5'
100%-ni alkohol 2	3'
96%-ni alkohol	2'
Destilirana voda	2'
Bojenje	Trajanje u minutama ' i sekundama "
Hematoksilin H	3'
Uron u destiliranu vodu	1"
Tekuća voda	3'
Uron u destiliranu vodu	1"
96%-ni alkohol	30"
Eozin 0,5%	20"
Dehidriranje	Trajanje - uroni
96%-ni alkohol 1	10-15 urona
96%-ni alkohol 2	10-15 urona
100%-ni alkohol 1	10-15 urona
100%-ni alkohol 2	10-15 urona
100%-ni alkohol 3	10-15 urona
Prosvjetljivanje	Trajanje u minutama '
Ksilen 3	2'
Ksilen 4	2'



Slika 19. Bojanje uzoraka u digestoru

Zadnji korak u izradi trajnih histoloških preparata je uklapanje tkiva u kanadski balzam. Predmetna stakalca sam pincetom izvadila iz ksilena i pažljivo obrisala ostatak tekućine papirnatim ubrusima. Na stranu stakalca na kojoj se nalazi tkivo nakapala sam kanadski balzam te lagano pomoću iglice na vrh položila pokrovno stakalce. Gotove preparate sam ostavila u digestoru da se suše i stvrdnjavaju 2 dana prije daljnje obrade.

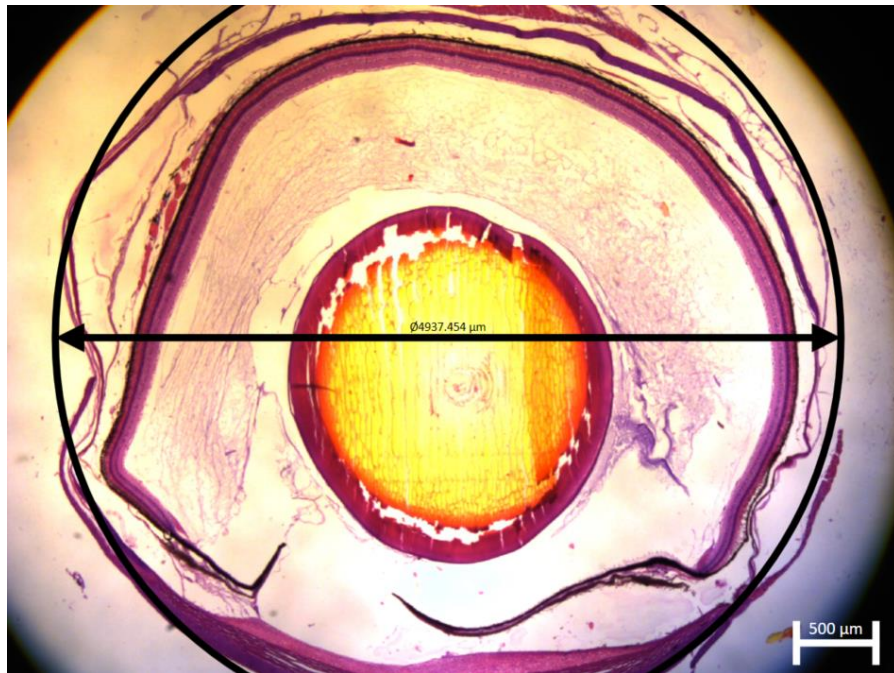
3.3. Mikroskopiranje uzoraka

Histološke preparate analizirala sam svjetlosnim mikroskopom Nikon Eclipse E600. Za slikanje uzoraka koristila sam program ZEN 2 (blue edition), Carl Zeiss Microscopy. Za svaki uzorak uzela sam u prosjeku 10 fotografija mrežnice, na različitim mjestima duž kružnice oka, pri povećanju od 40x. U pojedinim uzorcima mrežnica je bila raspadnuta ili je stajala pod krivim kutem, pa je bilo moguće uzeti samo manji broj fotografija. Za svaki uzorak fotografirala sam i čitavi presjek oka ± 4 puta pri povećanju od 2x. Morfometrijska analiza uzoraka također je provedena u programu ZEN2.

3.4. Mjerenje parametara

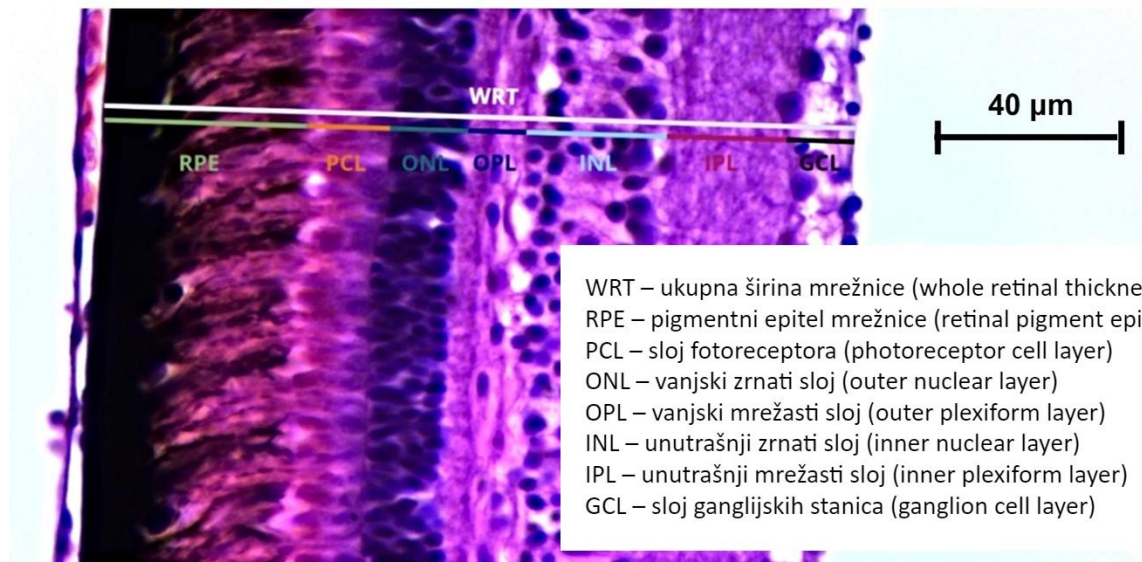
Morfometrijska analiza oka provedena je na ukupno 27 jedinki kapelske svijetlice u 4 skupine (SFLD – 9 jedinki, SFDD – 5 jedinki, CFDD – 8 jedinki i CFLD – 5 jedinki). Za svaki uzorak, odnosno jedinku *T. karsticus*, izmjereni su sljedeći parametri: promjer oka, ukupna širina mrežnice oka te širina svakog od 7 slojeva mrežnice. Sva mjerenja izražena su u μm . U pojedinim uzorcima je na različitim fotografijama varirala izmjerena vrijednost promjera oka. Varirala je i vrijednost širine mrežnice i njezinih slojeva duž istog presjeka oka i između fotografija istog uzorka. Ponavljajuća mjerenja svakog parametra na istom uzorku provedena su u svrhu povećanja preciznosti i smanjenja utjecaja spomenute varijabilnosti na statističku obradu podataka. Za svaki ispitivani parametar je iz više mjerenja na istom uzorku izračunata srednja vrijednost, koja je zatim korištena u daljnjim izračunima.

Veličina oka mjerena je kao promjer krajnje vanjske kružnice tkiva vidljive na fotografiji (Slika 20).



Slika 20. Mjerenje promjera oka na uzorku SFDD5

Nazivi slojeva mrežnice oka i njihove granice prikazane su na Slici 21. U nekim uzorcima vanjski dijelovi sloja RPE bili su djelomično otkinuti ili potpuno odvojeni od ostatka mrežnice. U takvim slučajevima odvojeni dijelovi nisu mjereni kao dio sloja RPE niti su uključeni u mjerenje ukupne širine mrežnice.



Slika 21. Granice slojeva mrežnice oka *T. karsticus*, obilježeno na uzorku CFDD1

3.5. Statistička obrada podataka

Uzevši u obzir da oči riba neprestano rastu kroz životni vijek, kako bi se isključio utjecaj veličine oka ovisan o starosti pojedine jedinke na statističku analizu, provedena je normalizacija podataka prema sljedećoj formuli:

$$\frac{\text{srednja vrijednost širine pojedinog sloja}}{\text{srednja vrijednost promjera oka}} \times 100$$

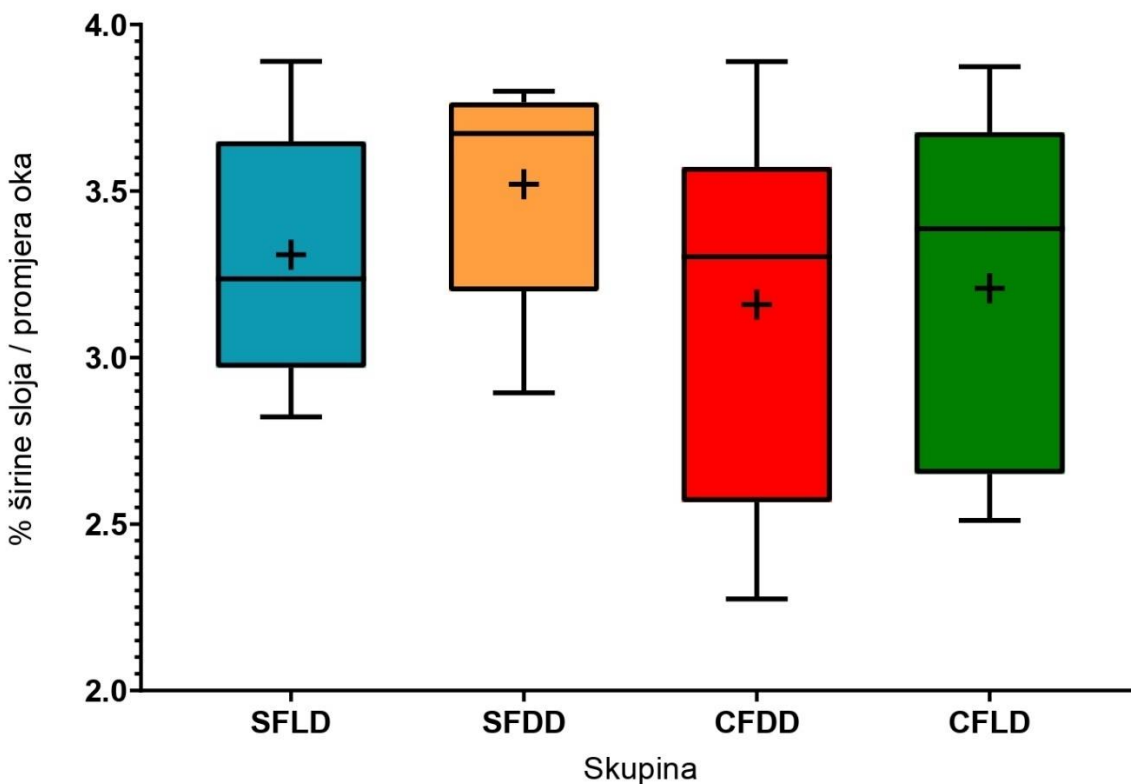
Na taj način su vrijednosti za svaku jedinku izražene kao postotak omjera širine sloja i promjera oka. Ekstremne vrijednosti za svaki parametar utvrđene su IQR metodom i isključene iz daljnje analize. Normalnost distribucije vrijednosti za svaki parametar provjerena je Shapiro-Wilk testom. Međusobna jednakost varijanci između skupina ispitana je Levene-ovom provjerom. Usporedba između svih skupina s obzirom na ukupnu širinu mrežnice te svakog od slojeva mrežnice provedena

je jednosmjernom analizom varijance (eng. One-Way ANOVA). Usporedba između parova skupina s obzirom na pojedini parametar provedena je post-hoc Tukey-Kramer testom. U svim testovima razina statističke značajnosti postavljena je na 0.05. Statistička analiza provedena je u programima IBM SPSS Statistics 26 i Microsoft Excel.

4. Rezultati

4.1. Usporedba širine mrežnice oka između skupina

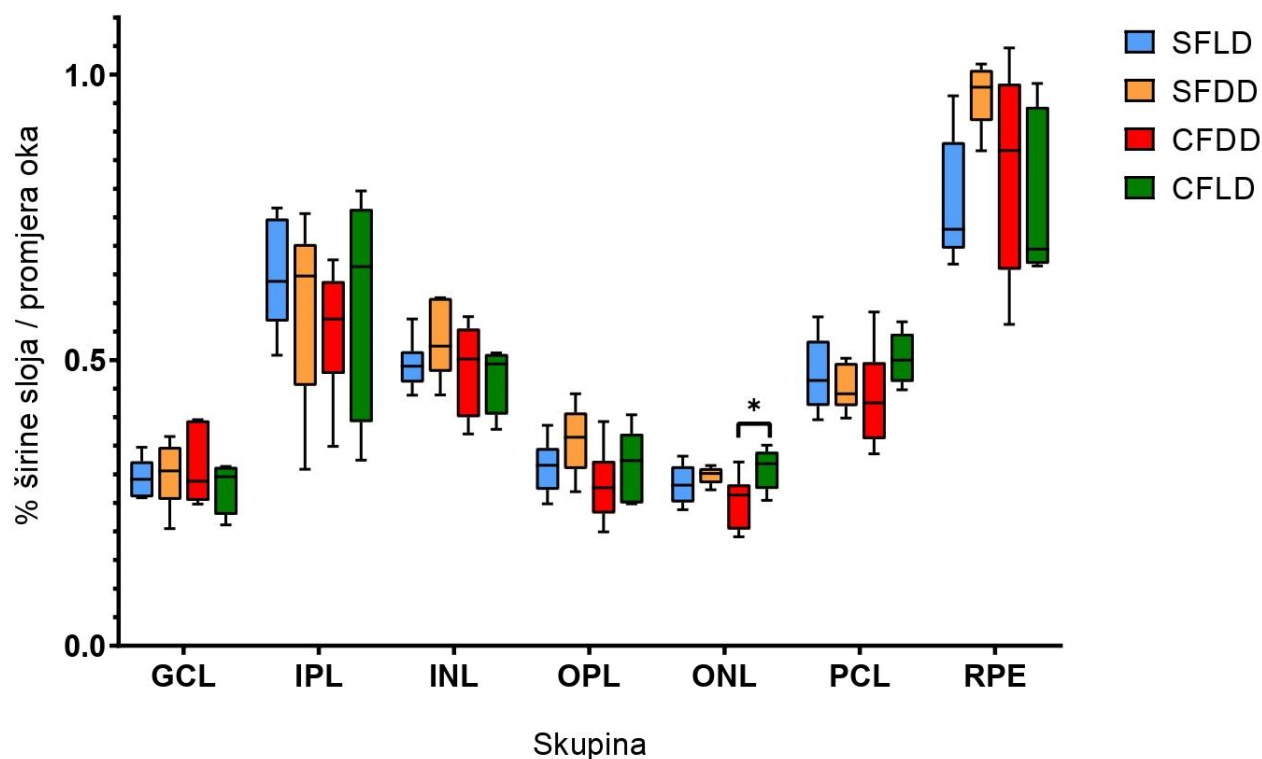
Veličinska distribucija širine mrežnice oka svih skupina prikazana je na Slici 22. Najveći raspon vrijednosti prisutan je u skupini CFDD, gdje je zabilježena i ukupno najmanja pojedinačna vrijednost širine mrežnice. Maksimalne vrijednosti širine u svim skupinama su slične. Kod obje eksperimentalne skupine, izložene uvjetima suprotnim od onih iz kojih potječu, prisutan je blagi trend povećanja u širini mrežnice u odnosu na njihove kontrolne skupine. Između skupina CFDD i CFLD razlika u srednjim vrijednostima i medijanima širine mrežnice je vrlo mala, dok je između skupina SFLD i SFDD nešto veća. Levene-ovom provjerom potvrđena je jednakost varijanci između skupina. Provedbom analize varijanci utvrđeno je da između skupina ne postoji statistički značajna razlika u širini mrežnice ($p = 0.586$).



Slika 22. Grafički prikaz veličinske distribucije širine mrežnice oka *T. karsticus* u skupinama SFLD - nadzemne jedinke svjetlo-mrak, SFDD – nadzemne jedinke mrak-mrak, CFDD – podzemne jedinke mrak-mrak i CFLD – podzemne jedinke svjetlo-mrak; srednja vrijednost označena sa +.

4.2. Usporedba širine pojedinih slojeva mrežnice između skupina

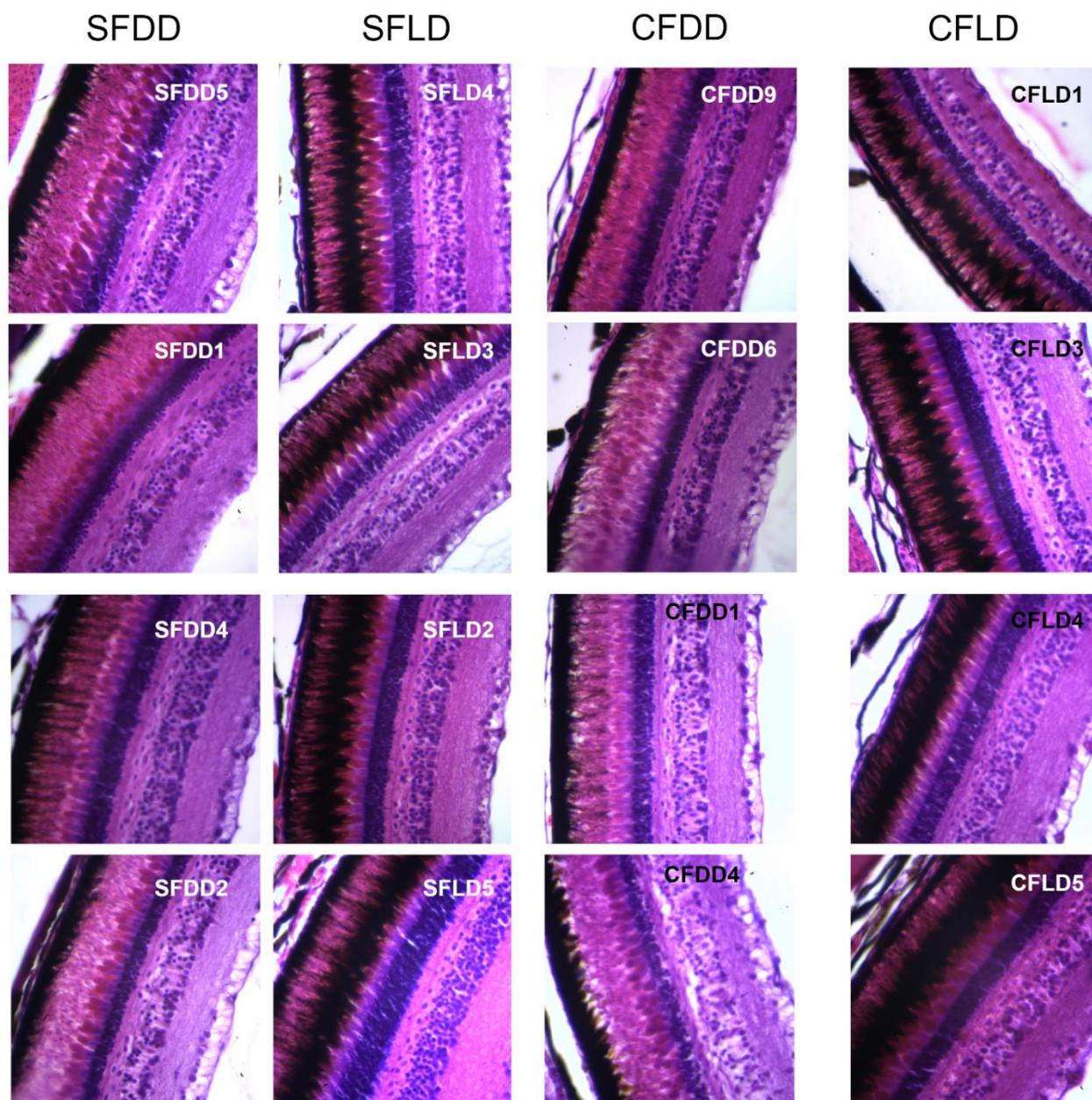
Pojedina mjerenja identificirana su kao ekstremne vrijednosti uz pomoć IQR metode pa su isključena iz daljnje analize. Veličinska distribucija širine pojedinih slojeva mrežnice svih skupina prikazana je na Slici 23. Na grafičkom prikazu vidljive su razlike između skupina za pojedine slojeve. Ove su razlike većinom premalene u odnosu na širine distribucije vrijednosti pojedinih skupina da bi se iz njih moglo izvlačiti zaključke. Jedine jasno uočljive promjene su zadebljanje slojeva INL, OPL i RPE u skupini SFDD u odnosu na skupinu SFLD i zadebljanje slojeva OPL, ONL i PCL u skupini CFLD u usporedbi sa skupinom CFDD. Leveneovom provjerom potvrđena je homogenost varijanci između skupina za svaki sloj mrežnice. Analizom varijance utvrđena je statistički značajna razlika među skupinama samo za sloj ONL ($p = 0.046$). Post hoc Tukey-Kramer testom utvrđena je statistički značajna razlika u širini sloja ONL između skupina CFDD i CFLD ($p = 0.05$).



Slika 23. Grafički prikaz veličinske distribucije širine pojedinih slojeva mrežnice oka *T. karsticus* u skupinama SFLD – nadzemne jedinke svjetlo-mrak, SFDD- nadzemne jedinke mrak-mrak, CFDD – podzemne jedinke mrak-mrak i CFLD -podzemne jedinke svjetlo-mrak; nazivi slojeva mrežnice prikazani na x osi. Zvezdicom označeno statistički značajno zadebljanje sloja ONL u skupini CFLD u odnosu na skupinu CFDD.

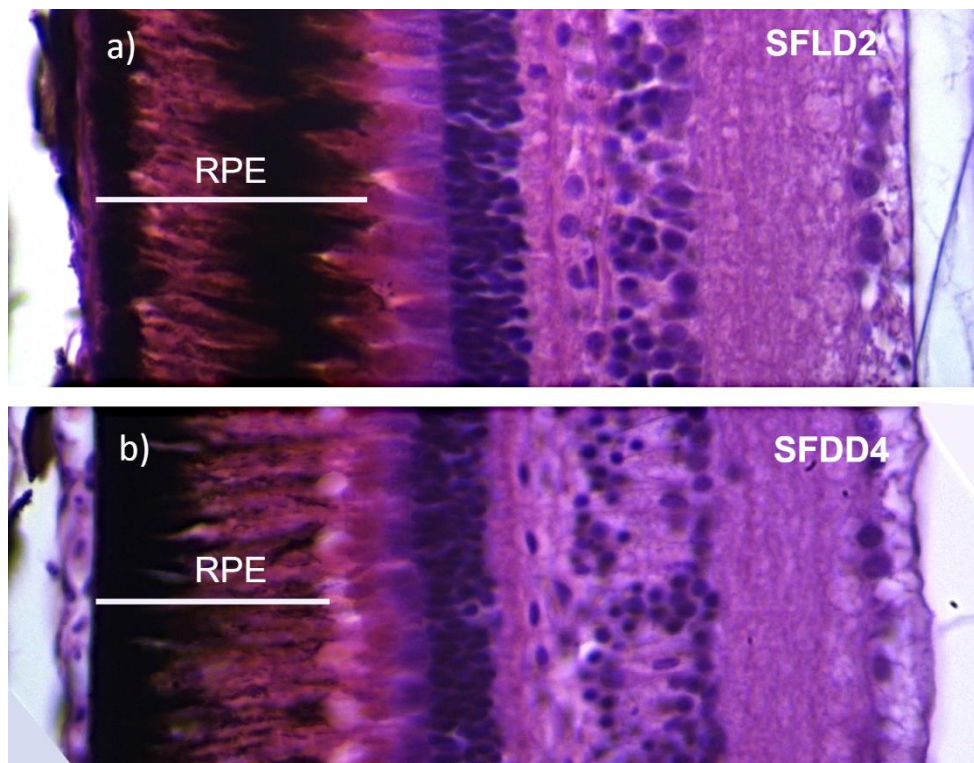
4.3. Kvalitativne razlike u mrežnici oka između skupina

Vizualnim opažanjem utvrđene su razlike u izgledu sloja RPE između skupina izloženih izmjeni svjetla i tame (SFLD i CFLD) i skupina izloženih konstantnoj tami (SFDD i CFDD) (Slika 24).



Slika 24. Presjek mrežnice oka jedinki u skupinama SFLD – nadzemne jedinke svjetlo-mrak, SFDD – nadzemne jedinke mrak-mrak, CFDD – podzemne jedinke mrak-mrak i CFLD – podzemne jedinke svjetlo-mrak; vidljive razlike u izgledu sloja RPE (lijevi rubni sloj).

Krupniji prikaz razlike u sloju RPE između skupina prikazan je na Slici 25. Kod skupina SFLD i CFLD vidljiva je vrlo izražena pigmentacija uz unutrašnji rub sloja RPE, a granica između RPE i susjednog desnog sloja PCL nije sasvim jasno razlučiva. U skupinama CFDD i SFDD ova pigmentacija uz unutrašnji rub RPE izostaje, a granica sa slojem PCL je ravnija i jasnija. Također, kod većine jedinki iz skupina CFDD i SFDD stanice sloja RPE su naizgled manje gusto raspoređene nego u skupinama SFLD i CFLD.



Slika 25. Presjek sloja RPE u skupinama izloženim izmjeni svjetla i tame – LD (a) i skupinama izloženim konstantnoj tami – DD (b).

5. Rasprava

Podzemni okoliš predstavlja izuzetno stresne i zahtjevne uvjete za potencijalne nadzemne kolonizatore jer je osjetilo vida beskorisno, orijentacija otežana i dostupnost hrane znatno ograničena. Veliko područje interesa i rasprave u evolucijskoj biologiji predstavljaju mehanizmi koji omogućavaju preživljavanje i početni stupanj kolonizacije tijekom kojeg površinska vrsta još nema razvijene nikakve specijalizirane prilagodbe na podzemni okoliš. Kapelska svijetlica predstavlja vrlo dobar model za proučavanje ovih mehanizama. Uspostavljena podzemna populacija je stalna i s mogućnošću razmnožavanja unutar špilje (Čupić i sur., rad u recenziji). Između nadzemne i podzemne populacije nema genetičkih razlika, a s obzirom na to da jedinke podzemne populacije morfološki izrazito nalikuju na jedinke nadzemne populacije i ne pokazuju očite troglomorfne karakteristike, pretpostavlja se da je ova vrsta tek nedavno kolonizirala špilju i da je u ranom stadiju adaptivne evolucije. Detaljnijim ispitivanjem razlika između populacija utvrđeno je da se fenotip podzemne populacije razlikuje od fenotipa nadzemne populacije, a ove se razlike očituju u genskoj ekspresiji, morfologiji i fiziologiji riba (Čupić i sur., rad u recenziji). Ovakvi nalazi snažno ukazuju na to da fenotipska plastičnost ima kritičnu ulogu u stvaranju početnih adaptivnih odgovora koji kapelskoj svijetlici omogućavaju život u špilji.

Analizom mrežnice oka jedinki *T. karsticus* iz prirode utvrđeno je zadebljanje slojeva mrežnice INL, ONL i PCL kod jedinki podzemne populacije u odnosu na nadzemnu populaciju (Čupić i sur., rad u recenziji). Zadebljanje istih slojeva zabilježeno je i kod površinskih jedinki *A. mexicanus* uzgajanih u konstantnom mraku (Bilandžija i sur., 2020). U ovom istraživanju jedinke kapelske svijetlice po prvi su puta izložene eksperimentalnim svjetlosnim uvjetima u laboratoriju, u svrhu ispitivanja toga kako se prvi plastični odgovor ove vrste na drastično izmještanje sa svjetla u mrak, ili obratno, manifestira u građi mrežnice oka. Dobivene razlike u ukupnoj širini i širini pojedinih slojeva mrežnice između ispitivanih skupina nisu statistički značajne, pa stoga ovaj rad na kvantitativnoj razini nije uspio potvrditi razlike utvrđene kod jedinki iz prirode. Međutim, ipak je uočljiv blagi trend zadebljanja mrežnice i pojedinih slojeva u skupinama izmještenim iz njihovih prirodnih uvjeta. Kod jedinki nadzemne populacije izloženih konstantnom mraku (SFDD) u odnosu na kontrolnu skupinu (SFLD) prisutno je blago povećanje u širini mrežnice oka, kao i blaga tendencija zadebljanja gotovo svih slojeva mrežnice, a posebice slojeva INL, OPL i RPE. Lagano povećanje u širini mrežnice te slojeva ONL i PCL vidljivo je i kod jedinki podzemne populacije

izloženih izmjeni svjetla i mraka (CFLD) u odnosu na njihovu kontrolnu skupinu (CFDD). Uočena zadebljanja u skladu su s prethodnim nalazima na *A. mexicanus* i *T. karsticus* iz prirode, a ukazuju na to da se kod ovih vrsta prvi odgovor oka na stres induciran izmjenom svjetlosnih uvjeta očituje kao proliferacija stanica u pojedinim slojevima mrežnice. Sličan plastičan odgovor mrežnice oka na tamu zabilježen je i kod brazilske slatkovodne vrste *Austrolebias charrua* Costa & Cheffe 2001. Kod jedinki izloženih konstantnoj tami je u usporedbi sa jedinkama izloženim normalnim svjetlosnim uvjetima zabilježen je znatno veći broj stanica u svim slojevima mrežnice, a posebice u sloju ONL koji sadrži jezgre fotoreceptora (Berrostequieta i sur., 2022). Slojevi INL i ONL su regije nastanka i proliferacije novih stanica, koje se zatim dalje dijele i stvaraju prekursore za razvoj novih fotoreceptora (Julian i sur., 1998). Brojna istraživanja pokazuju da ribe nedostatak svjetla kompenziraju stvaranjem većeg broja štapićastih fotoreceptora koji imaju važnu ulogu u raspoznavanju predmeta i orijentaciji pri slabom osvjetljenju (Chiu i sur., 1995; Hunt i sur., 2015; Lahne i sur., 2019). Moguće je da je proliferacija stanica u svim slojevima mrežnice uvjetovana potrebom za većim brojem fotoreceptora i nužna kako bi se dovršili neuronski putevi potrebni za njihovo pravilno funkcioniranje (Berrostequieta i sur., 2022).

Između skupina izloženih tami (SFDD, CFDD) i skupina izloženih izmjeni svjetla i tame (SFLD, CFLD) uočene su razlike u pigmentaciji sloja RPE. Ove razlike također su rezultat plastičnog odgovora mrežnice na izmjenu svjetlosnih uvjeta. Sloj RPE obavlja mnoge važne funkcije vidnog aparata, a jedna od glavnih uloga mu je njegovanje i zaštita susjednog sloja fotoreceptora (PCL) (Strauss, 2005). RPE se sastoji od jednog sloja poligonalnih stanica pigmentiranih melanimom, a kod riba ovi pigmenti migriraju unutar stanica ovisno o količini dostupne svjetlosti. U uvjetima tame pigmenti migriraju u baze stanica uz vanjski rub sloja RPE. U uvjetima svjetla pigmenti migriraju u apikalne produžetke stanica te na taj način okružuju i štite od štetnog UV zračenja fotoreceptore iz susjednog sloja (Burnside i Basinger, 1983). Ovaj mehanizam, tzv. sposobnost retinomotornog pokreta (eng. *retinomotor movement*) objašnjava uočene razlike u pigmentaciji RPE između ispitivanih skupina. Kod skupina SFDD i CFDD pigmenti su akumulirani uz vanjsku bazu sloja RPE, dok su kod skupina SFLD i CFLD nakupljeni u apikalnim produžecima stanica koji prodiru unutar sloja PCL i okružuju fotoreceptore.

Pretpostavka ovog istraživanja bila je da će mrežnica oka *T. karsticus* pokazati fenotipske razlike ovisno o porijeklu jedinki i svjetlosnim uvjetima kojima su izložene. Unatoč tome što dobivene

razlike između skupina nisu značajne na statističkoj razini, kod jedinki izloženih svjetlosnom stresu prisutna je promjena fenotipa, odnosno tendencija zadebljanja pojedinih slojeva mrežnice. Ostaje nepoznato pruža li ovaj prvi plastični odgovor mrežnice oka kapelskoj svjetlici korist pri snalaženju u podzemnom okolišu ili ne. Empirijska istraživanja pokazuju da prilagodba organizma na novu sredinu rezultira kombinacijom adaptivnih i neadaptivnih plastičnih odgovora u nizu različitih osobina, na koje zatim djeluje pozitivna ili negativna selekcija (Ghalambor i sur., 2007). U kontekstu regresije očiju kao „ciljane“ prilagodbe podzemnih vrsta, promjene u građi mrežnice *T. karsticus* mogu se interpretirati kao neadaptivne. S druge strane, uz ovu naizgled neadaptivnu promjenu, kod jedinki podzemne populacije *T. karsticus* iz prirode utvrđeni su i brojni drugi adaptivni odgovori na podzemne uvjete (Čupić i sur., rad u recenziji). Bez obzira na njihov adaptivni ishod, rani odgovori na drastičnu izmjenu svjetlosnih uvjeta zabilježeni kod *T. karsticus* i *A. mexicanus* ukazuju na to da fenotipska plastičnost ima važnu ulogu u početnom stadiju kolonizacije i razvoju prilagodbi na podzemno stanište.

Očit nedostatak ovog istraživanja je malen broj uzoraka iz kojeg je nemoguće izvlačiti prave zaključke. Također, iako tama predstavlja najveći selektivni pritisak na organizme u podzemnim staništima i glavni je pokretač adaptivnih promjena u očima, treba uzeti u obzir da na adaptivne procese zasigurno djeluju i drugi faktori koji nisu obuhvaćeni ovim istraživanjem. Proučavanje kolonizacije podzemnih staništa izrazito je izazovno i s ekološkog i s evolucijskog gledišta jer se radi o procesu koji je teško promatrati u prirodnim uvjetima i čije se repliciranje u laboratoriju bazira na brojnim pretpostavkama (Romero, 2009). Buduća istraživanja prilagodbe očiju kapelske svjetlice na tamu svakako bi trebala uključivati veći broj uzoraka. Također, za općenito proučavanje prelaska ove vrste u podzemlje nužno je koristiti i upariti ekološka i bihevioralna istraživanja sa genetičkim i molekularnim metodama, kako bi se dobila jasnija slika o mehanizmima razvoja njezinih prilagodbi na podzemne ekološke uvjete. Razjašnjavanje ovih procesa ključno je i kako bi se osigurala adekvatna zaštita ove ugrožene vrste.

6. Zaključak

U ovom istraživanju provedena je analiza i usporedba građe mrežnice oka između 4 skupine kapelske svijetlice uzgajane u eksperimentalnim svjetlosnim uvjetima u laboratoriju, u trajanju od 22 mjeseca: SFLD – jedinke nadzemne populacije izložene izmjeni svjetla i tame, SFDD – jedinke nadzemne populacije izložene konstantnoj tami, CFDD – jedinke podzemne populacije izložene konstantnoj tami i CFLD – jedinke podzemne populacije izložene izmjeni svjetla i tame. Ukupna širina mrežnice oka nije se statistički značajno razlikovala između 4 ispitivane skupine, no postoji indikacija povećanja širine mrežnice uslijed izlaganja jedinki nadzemne i podzemne populacije svjetlosnim uvjetima suprotnim od onih iz kojih potječu (skupine SFDD i CFLD). Usporedbom širine pojedinih slojeva mrežnice između skupina također nije utvrđena statistički značajna razlika. Međutim, uočena je blaga tendencija zadebljanja pojedinih slojeva mrežnice uslijed izlaganja jedinki nadzemne populacije konstantnoj tami (SFDD) i uslijed izlaganja jedinki podzemne populacije izmjeni svjetla i tame (CFLD). U budućim istraživanjima potrebno je povećati broj uzoraka kako bi se ustanovilo razvijaju li zaista jedinke kapelske svijetlice značajne razlike u morfologiji mrežnice oka ovisno o porijeklu i različitim eksperimentalnim svjetlosnim uvjetima.

7. Literatura

1. Alunni, A., Menuet, A., Candal, E., Penigault, J. B., Jeffery, W. R., Retaux, S. (2007). Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *The Journal of Comparative Neurology*. 5050, 221 – 233
2. Berrosteguieta, I., Rosillo, J. C., Herrera, M. L., Olivera-Bravo, S., Casanova, G., Herranz-Perez, V., Garcia-Verdugo, J. M., Fernandez, A. S. (2022). Plasticity of cell proliferation in the retina of *Austrolebias charrua* fish under light and darkness conditions. *Current Research in Neurobiology*. 3, 100042
3. Bilandžija, H., Čupić, M., Lukić, M., Gračan, R., Marčić, Z. (2022). *Telestes karsticus* – a cave adapted fish in the Dinaric Karst. 3rd Dinaric Symposium on Subterranean Biology. Abstract Book. 20
4. Bilandžija, H., Hollifield, B., Steck, M., Meng, G., Ng, M., Gračan, R., Četković, H., Porter, M. L., Renner, K. J., Jeffery, W. (2020). Phenotypic plasticity as a mechanism of cave colonization and adaptation. *eLife*. 9, e51830
5. Buj I., Marčić Z., Čaleta M., Šanda R., Geiger, M.F, Freyhof, J., Machordom, A., Vukić, J. (2017.). Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes). *PLoS ONE*, 12: e0187366
6. Buj, I., Marčić, Z., Flauder, E., Šanda, R., Vukić, J. (2022.). Population Genetic Structure of Endemic Fish Species Facilitating Their Survival in Changing Environments—A Case Study on the Genus *Telestes* in Croatia. *Diversity*. 14, 529
7. Burnside, B. i Basigner, S. (1983). Retinomotor Pigment Migration in the Teleost Retinal Pigment Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 24, 16-23
8. Butorac, V., Hanžek, N., Jalžić, B., Maleš, S. (2019.). Istraživanja u ponoru Sušiku. *Speleolog*. 67, 8-21
9. 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, 118 str.
10. Čaleta, M., Marčić, Z., Buj, I., Zanella, D., Mustafić, P., Duplić, A., Horvatić, S. (2019). A Review of Extant Croatian Freshwater Fish and Lampreys. *Croatian Journal of Fisheries*. 77(3), 137-234

11. Chiu, J. F., Mack, A. F., Fernald, R. D. (1995). Daily rhythm of cell proliferation in the teleost retina. *Brain Research*. 673(1), 119-125
12. Culver, D. C., i Pipan, T. (2013). Subterranean Ecosystems. U: Levin S.A. Encyclopedia of Biodiversity (2nd ed.) Elsevier Inc. 7, 49-62
13. Culver, D. C. i Pipan, T. (2019). The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats (2nd ed.)
14. Ehrenreich, I. M. i Pfennig, D. W. (2016). Genetic assimilation: a review of its potential proximate causes and evolutionary consequences. *Annals of Botany*. 17(5), 769 – 779
15. Freyhof, J., Lieckfeldt, D., Bogutskaya, N., Pitra, C., Ludwig, A. (2006.). Phylogenetic position of the Dalmatian genus *Phoxinellus* and description of the newly proposed genus *Delminichthys* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular phylogenetics and evolution*. 38, 416-425
16. Fricke, R., Eschmeyer, W. N., R. van der Laan (2022.). Eschmeyer's Catalogue of Fishes: Genera, Species, References (elektronička verzija <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>, pristupljeno 18.1.2023.)
17. Fumey, J., Hinaux, H., Noirot, C., Thermes, C., Retaux, S., Casane, D. (2018). Evidence for late pleistocene origin of *Astyanax mexicanus* cavefish. *BMC Evolutionary Biology*. 18, 43
18. Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A. (2009). Atlas of Fish Histology (1st ed.). CRC Press. 224 str.
19. Ghalambor, C. K., McKay, J. K., Carroll, S. P., Reznick, D. N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Ecology*. 21, 394 - 407
20. Gottstein, S. (2010). Priručnik za određivanje podzemnih staništa u Hrvatskoj prema Direktivi o staništima EU. Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb. 99 str.
21. Helfman, G. S., Collette, B. B., Facey, D. E., Bowen, B. W. (2009). The Diversity of Fishes (2nd ed.). Wiley-Blackwell Publishing. 728 str.

22. Herman, A., Brandvain, Y., Weagley, J., Jeffery, W. R., Keen, A. C., Kono, T. J. Y., Bilandžija, H., Borowsky, R., Espinasa, L., O'Quin, K., Ornelas-Garcia, C. P., Yoshizawa, M., Carlson, B., Maldonado, E., Gross, J. B., Cartwright, R. A., Rohner, N., Warren, W. C., McGaugh, S. E. (2018). The role of gene flow in rapid and repeated evolution of cave-related traits in Mexican tetra, *Astyanax mexicanus*. *Molecular Ecology*. 27, 4397 – 4416
23. Hinaux, H., Poulain, J., Da Silva, C., Noiro, C., Jeffery, W. R., Casane, D., Retaux, S. (2013). De novo sequencing of *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachon cavefish transcriptomes reveals enrichment of mutations in cavefish putative eye genes. *PLOS ONE*. 8, e53553
24. Hunt, D. E., Rawlinson, N. J. F., Thomas, G. A., Cobcroft, J. M. (2015). Investigating photoreceptor densities, potential visual acuity, and cone mosaics of shallow water, temperate fish species. *Vision Research*. 111(A), 13-21
25. Jeffery, W. R. i Martasian, D. P. (1998). Evolution of Eye Regression in the Cavefish *Astyanax*: Apoptosis and the *Pax-6* Gene. *American Zoologist*. 38(4), 685 – 696
26. Jeffery, W. R., Strickler, A. G., Yamamoto, Y. (2003). To see or not to see: evolution of eye degeneration in mexican blind cavefish. *Integrative and Comparative Biology*. 43(4), 531 – 541
27. Julian, D., Ennis, K., Korenbrot, J. I. (1998). Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *The Journal of Comparative Neurology*. 394(3), 271-282
28. Ketmaier, V., Bianco, P.G., Cobolli, M., Krivokapić, M., Caniglia, R., de Mattheis, E. (2004.). Molecular phylogeny of two lineages of Leuscinae cyprinids (*Telestes* and *Scardinius*) from the peri-Mediterranean area based on cytochrome b data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32, 1061-1071
29. Ketmaier, V., Cobolli, M., de Mattheis, E., Bianco, P. (1998). Allozymic variability and biogeographic relationships in two *Leuciscus* species complex (Cyprinidae) from Southern Europe. *Italian Journal of Zoology*. 65, 41-48
30. Kottelat, M. i Freyhof, J. (2007). Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat, Cornol & Freyhof, Berlin. 646 str.
31. Kramer, D. L. i Bryant, M. J. (1995). Intestine length in the fishes of a tropical stream: 1. Ontogenetic allometry. *Environmental Biology of Fishes*. 42, 115 – 127

32. Krishnan, J. i Rohner, N. (2017). Cavefish and the basis of eye loss. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 372(1713), 20150487
33. Lahne, M., Piekos, S. M., O'Neill, J., Ackerman, K. M., Hyde, D. R. (2019). Photo-regulation of rod precursor cell proliferation. *Experimental Eye Research*. 178, 148-159
34. Ma, L., Parkhurst, A., Jeffery, W. R. (2014). The role of a lens survival pathway including sox2 and aA-crystallin in the evolution of cavefish eye degeneration. *EvoDevo*. 5, 28
35. Marčić, Z. (2013). Taksonomske i biološko-ekološke značajke roda *Telestes* Bonaparte, 1837 (Actinopterygii) na području Velike i Male Kapele. Doktorski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu
36. Marčić, Z., Abramović, A., Čaleta, M., Buj, I., Zanella, D. (2021a). Early development of the endemic dace *Telestes karsticus* (Leuciscidae, Cypriniformes) in a Dinaric karst stream in Croatia. *Journal of Applied Ichthyology*. 37, 99–105
37. Marčić, Z., Komljenović, I., Čaleta, M., Buj, I., Zanella D., Mustafić, P. (2021b). Age, growth, and population structure of endemic *Telestes karsticus* (Actinopterygii: Cyprinidae: Leuciscinae) from Sušik Creek, Croatia. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 51(3), 225–232
38. Marčić, Z., Milković, A., Čaleta, M., Buj, I., Zanella, D., Mustafić, P. (2017a). Reproductive biology of the endemic dace *Telestes karsticus* Marčić and Mrakovčić 2011 (Cyprinidae, Leuciscinae) endemic to Croatia. *Journal of applied ichthyology*, 33 (2): 203-208. doi:10.1111/jai.13306
39. Marčić, Z., Sučić, I., Čaleta, M., Buj, I., Mustafić, P., Zanella, D. (2017b). Seasonal profile of the diet of the dace *Telestes karsticus* Marčić & Mrakovčić, 2011 (Cyprinidae, Leuciscinae) endemic to Sušik Creek, Croatia. *Journal of Applied Ichthyology*. 33, 943-949
40. Mescher, A. (2013). Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas (13th ed.) McGraw_Hill Professional. 480 str.
41. Mokhtar, D. M. (2022). *Fish Histology – From Cells to Organs* (2nd ed). Apple Academic Press. 442 str.
42. Mrakovčić, M., Brigić, A., Buj, I., Čaleta, M., Mustafić, P., Zanella, D. (2006). Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb. 256 str.
43. Nelson, J. S., Grande, T. C. i Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the World*, 5th Edition. John Wiley and Sons, Hoboken. 752 str.

44. Niemiller, M. L. i Soares, D. (2015). Cave environments. U: Riesch, R., Plath, M., Tobler, M. Extremophile Fishes. Springer. 161–191
45. Niemiller, M. L., Bichuette, M. E., Chakrabarty, P., Fenolio, D. B., Gluesenkamp, A. G., Soares, D., Zhao, Y. (2019). Cavefishes. U: White, W., Culver, D.C., Pipan, T. Encyclopedia of Caves. Academic Press. 227 – 236
46. Otteson, D. C., D'Costa, A. R., Hitchcock, P. F. (2001). Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Developmental Biology*. 232(1), 62 – 76
47. Proudlove, G. S. (2010). Biodiversity and distribution of the subterranean fishes of the world. U: Trajano, E., Bichuette, M. E., Kapoor, B.G. The Biology of Subterranean Fishes. Science Publishers. 41–63
48. Reier, S., Bogutskaya, N., Palandačić, A. (2022). Comparative Phylogeography of *Phoxinus*, *Delminichthys*, *Phoxinellus* and *Telestes* in Dinaric Karst: Which Factors Have Influenced Their Current Distributions? *Diversity*. 14, 1-22
49. Romero, A. (2009). Cave Biology – Life in Darkness. Cambridge University Press. 278 str.
50. Schönhuth, S., Vukić, J., Šanda, R., Yang, L., Mayden, R. L. (2018). Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 127, 781-799
51. Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*. 85, 845-881
52. Yamamoto, Y. i Jeffery, W. R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science*. 289(5479), 631 – 633
53. Yamamoto, Y., Stock, D. W., Jeffery, W. R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature*. 431(7010), 844 – 847

8. Životopis

Rođena sam 14.4.1997. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu i glazbenu školu te Klasičnu gimnaziju. Godine 2015. upisala sam preddiplomski studij Znanosti o moru na Fakultetu prirodnih znanosti u Puli. Tijekom studija sudjelovala sam na manifestacijama poput Festivala znanosti i 1. međunarodne Green konferencije, te provela dodatni semestar na Universidad de Barcelona na studiju geologije mora. Navedeni studij završila sam radom naslova „Biološki učinci srebrnih nanočestica na larvalni razvoj ježinca *Paracentrotus lividus*“ pod vodstvom dr. sc. Daniela Marka Lyonsa. Godine 2020. upisala sam diplomski studij Ekologije i zaštite prirode na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.