

Morfološka i genska karakterizacija populacije obrvana *Aphanius fasciatus* (Teleostei, Aphaniidae) u uvali Šćuza

Dianežević, David

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:221444>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

David Dianežević

**Morfološka i genska karakterizacija
populacije obrvana *Aphanius fasciatus*
(Teleostei, Aphaniidae) u uvali Šćuza**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

David Dianežević

**Morphological and genetic characterization
of the Mediterranean killifish population
Aphanius fasciatus (Teleostei, Aphaniidae) in
the Šćuza Bay**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kralješnjake i zaštitu prirode na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Buj. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar ekologije i zaštite prirode.

ZAHVALE

Veliko hvala mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Buj na strpljenju, dobroti i svom prenesenom znanju i prilici za izradu ovog diplomskog rada. Ali i na svakoj prilici za sudjelovanjem na brojnim terenima i projektima i ogromnom iskustvu koje su mi oni pružili, i što ste mi usadili veliku ljubav prema konzervacijskoj biologiji. Draga profesorice hvala Vam!

Hvala Sari Pleše na pomoći u izvođenju laboratorijskog dijela istraživanja i Svenu Horvatiću što mi je statistiku učinio razumljivijom.

Veliko hvala i ostatku ekipe iz labosa na svim druženjima i terenim, a posebno Nikoli Reniću koji je znao dati pravi savijet u pravom trenutku i na brojnim putovanjima na Plitvice.

Veliko hvala i svim predragim ljudima koje sam upoznao tijekom studija i koji su ga učinili ikoničnijim. Hvala Marti, Toniju, Luci, Loreni, Luciji, Bogiću, Reš, Pauli, Mari, Lini i Čeliku na svim kavama, razgovorima i druženjima. Za svakoga od vas bih mogao napisati posebne zahvale, ali to i ovako i onako i sami znate.

Hvala BIUS-u i BIUS-ovcima na svemu što sam od njih naučio i s njima prošao. Bez vas definitivno ne bi bilo isto!

Posebno hvala mojim roditeljima, Hrvoju i Ani, koji su mi ovo sve omogućili. Hvala vam na trpljenju i strpljenju! Hvala bratu Dariju i ostatku obitelji što su me podupirali cijelo ovo vrijeme.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Morfološka i genska karakterizacija populacije obrvana *Aphanius fasciatus* (Teleostei, Aphaniidae) u uvali Šćuza

David Dianežević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Obrvan, *Aphanius fasciatus*, je eurihalina vrsta koja naseljava vodna tijela kojima su svojstvene ekstremne vrijednosti saliniteta i temperature. Svi zabilježeni lokaliteti rasprostranjenosti međusobno su odvojeni zbog malog broja pogodnih staništa što uz značajke biologije vrste, različite pritiske i ugroze te izostanak protoka gena između populacija dovodi opstanak lokalnih populacija u pitanje. Ciljevi ovog istraživanja bili su opisati morfološke karakteristike i gensku raznolikost populacije u uvali Šćuza, utvrditi filogenetski položaj i srodstvene odnose u odnosu na druge populacije ove vrste te predložiti konzervacijske mjere za opstanak populacije. Za proučavanje morfologije koristila se deskriptivna statistika, a t-testom je istraživana razlika u morfometrijskim karakteristikama mužjaka i ženki. Kako bi se utvrdili srodstveni odnosi među populacijama, provedena je filogenetska rekonstrukcija na temelju sekvenci gena za citokrom *b* pomoću metode najveće parsimonije, metode najveće vjerojatnosti i metode susjednog povezivanja. Uz to analizom vijabilnosti populacije utvrđeno je koje prijetnje imaju najveći učinak na opstanak populacije. Dobiveni rezultati smještaju istraživanu populaciju u sjevernojadransku grupu populacija obrvana. Utvrđena je umjerena genska raznolikost, no nešto viša nego u drugim populacijama na istočnoj obali Jadrana. Kao najveća prijetnja opstanku populacije prepoznata je degradacija staništa.

Ključne riječi: *Aphanius fasciatus*, morfologija, populacijska genetika, citokrom *b*, konzervacija, Jadransko more
(46 stranica, 11 slika, 12 tablica, 64 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelji:

izv. prof. dr. sc. Ivana Buj
prof. dr. sc. Antun Alegro
doc. dr. sc. Zoran Marčić

Rad prihvaćen: 6. lipnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Morphological and genetic characterization of the Mediterranean killifish population *Aphanius fasciatus* (Teleostei, Aphaniidae) in the Šćuza Bay

David Dianežević

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The Mediterranean killifish, *Aphanius fasciatus*, is a euryhaline species that inhabits water bodies characterized by extreme values of salinity and temperature. All recorded localities of distribution are separated from each other due to the small number of suitable habitats, which in addition to the features of the species' biology, different pressures and threats and the absence of gene flow between populations leads local populations to extinction. The aim of this study was: describe the morphological characteristics and genetic diversity of the population in the Šćuza bay, determine the phylogenetic position and relationships in relation to other populations of this species, and to propose conservation measures for the survival of the population. Descriptive statistics was used to study the morphology, and the difference in the morphometric characteristics of males and females was investigated using the t-test. To determine relationships between populations, a phylogenetic reconstruction was used, based on cytochrome *b* gene sequences using the maximum parsimony, maximum likelihood and median joining. In addition, a population viability analysis determined which threats have the biggest effect on the population survival. The results place the researched population in the northern Adriatic group of Mediterranean killifish populations. Moderate genetic diversity was found, but somewhat higher than in other populations on the eastern coast of the Adriatic. Habitat degradation is recognized as the biggest threat to the survival of the population.

Keywords: *Aphanius fasciatus*, morphology, population genetics, cytochrome *b*, conservation, Adriatic Sea

(46 pages, 11 figures, 12 tables, 64 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Ivana Buj, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Ivana Buj, PhD

Prof. Antun Alegro, PhD

Asst. Prof. Zoran Marčić, PhD

Thesis accepted: 6.6.2024.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Raznolikost hrvatske ihtiofaune	1
1.2.	Obrvan	3
1.2.1.	Taksonomija obrvana	3
1.2.2.	Opis i biologija vrste	5
1.2.3.	Rasprostranjenost obrvana	7
1.2.4.	Rasprostranjenost obrvana u Hrvatskoj.....	8
1.2.5.	Ugroženost i zaštita obrvana	8
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	10
3.	PODRUČJE ISTRAŽIVANJA	11
4.	MATERIJALI I METODE	13
4.1.	Popis korištenih kemikalija, opreme i računalnih programa	13
4.1.1.	Terenska oprema za sakupljanje uzoraka	13
4.1.2.	Laboratorijska oprema i kemikalije.....	13
4.1.3.	Računalni programi	13
4.2.	Skupljanje uzoraka	14
4.3.	Morfometrija	14
4.4.	Statistička obrada morfometrijskih značajki.....	16
4.5.	Laboratorijske analize uzoraka (izolacija DNA, umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje)	17
4.6.	Filogenetska rekonstrukcija.....	19
4.7.	Genska raznolikost.....	21
4.8.	Analiza vijabilnosti populacije.....	22
5.	REZULTATI	23
5.1.	Morfometrijske značajke populacije.....	23
5.2.	Korelacija tjelesnih mjera sa standardnom duljinom tijela.....	24
5.3.	Shapiro-Wilk test normalnosti.....	25
5.4.	T-test.....	26
5.5.	Filogenetska rekonstrukcija.....	29
5.6.	Genska raznolikost.....	33
5.7.	Analiza vijabilnosti populacije.....	33
6.	RASPRAVA	35
7.	ZAKLJUČAK	40
8.	LITERATURA	41

1. UVOD

1.1. Raznolikost hrvatske ihtiofaune

Ribe su najraznolikija i najbrojnija skupina živućih kralješnjaka te predstavljaju vrlo važan dio ukupne biološke raznolikosti i ključnu sastavnicu gotovo svakog morskog i slatkovodnog ekosustava. One pokazuju neobično velike prilagodbe u biološkim i ekološkim osobinama te u morfologiji i staništima koja nastanjuju (Dulčić i Kovačić 2020). Iako je pojam „riba“ itekako uvriježen, on ne odražava evolucijsku i taksonomsku jedinicu, već se njime mogu opisati svi vodeni kralješnjaci sa škrigama tijekom cijelog života i tjelesnim privjescima u obliku peraja (Nelson 2006). Prateći taj kriterij, pojam „riba“ predstavlja polifiletsku skupinu kralješnjaka i uključuje sljedeće, danas živuće, razrede: sljepulje (Myxini), paklare (Petromyzonti), prečnouste (Elasmobranchii), cjeloglavke (Holocephali), mnogoperke (Cladistii), zrakoperke (Actinopteri), resoperke (Coelacanthi) i dvodihalice (Dipneusti) (Van der Laan i sur. 2014).

Jedna od najčešćih podjela riba je prema tipu vodenog staništa koje nastanjuju. Tako je danas uvriježena podjela riba na morske, na koje otpada oko 49 % svih trenutno opisanih vrsta, i slatkovodne, na koje otpada oko 51 % svih trenutno opisanih vrsta (Fricke i sur. 2024). Voda koja prekriva oko 73 % planeta Zemlje predstavlja izazovno stanište, ali i nudi brojne mogućnosti. Tako danas ribe nastanjuju gotovo sva vodna tijela na planetu, no njihova raznolikost itekako se razlikuje. Naime, brojna staništa zahvaljujući svojoj kompleksnosti, kao što su koraljni grebeni i slatkovodna staništa, pružaju brojne ekološke niše koje su omogućile specijaciju brojnih vrsta. S druge strane, brojna druga staništa kao što je otvoreno i duboko more su u potpunosti drugačijeg karaktera što je uvjetovalo specijaciju nešto manjeg broja vrsta izrazito drugačijih strategija životne povijesti (Pough i sur. 2013).

Današnja raznolikost morskih riba u Hrvatskoj odražava geološku prošlost čitavog Jadrana. U prvom redu njegove zemljopisne, hidrografske i batimetrijske osobine. U geološkoj prošlosti, promjene u razini mora i temperature Jadrana u posljednjih 2,5 milijuna godina, uključujući i zadnje ledeno doba kada je razina mora bila oko 120 m niža nego danas, utjecale su na sastav vrsta u Jadranu. Uz to, Jadran se može promatrati kao zaljev Sredozemnog mora, pa se tako glavnina vrsta koje se mogu pronaći u Jadranu, mogu naći i u ostatku Sredozemnog mora. Razlike u dubinama sjevernog, srednjeg i južnog Jadrana također utječu na mogućnost naseljavanja pojedinih riba, naročito mezopelagičkih vrsta. Osim toga, u proteklim desetljećima čovjekov utjecaj također uvjetuje promjenu u zajednicama živih organizama koji se u pogledu morskih ihtiocenoza očituje kroz direktne negativne ljudske djelatnosti, klimatske promjene i

„lesepsijske migracije“ što značajno mijenjaju sastav ihtiofaune Jadrana. Tako prema trenutnim podacima u Hrvatskoj obitava 449 morskih riba no taj broj bi u narednim godinama mogao biti i veći (Lipej i sur. 2022, Dulčić i Kovačić 2020).

Raznolikost slatkovodnih riba u Hrvatskoj rezultat je nekoliko razloga. Prvi je geografski položaj Hrvatske koja se nalazi na raskrižju nekoliko biogeografskih regija: kontinentalne, mediteranske i alpinske. Takav geografski položaj uključuje dva potpuno ihtiološki odvojena i različita riječna slijeva: dunavski i jadranski, od kojih je jadranski izrazito bogat endemima (Ćaleta i sur. 2019). Upravo zbog velikog broja endema, to je područje dobilo naziv „vruće točke“ raznolikosti. Drugi je razlog kompleksna geološka prošlost regije koja je omogućila razne vikarijatne događaje i razdoblja povoljnih prilika, pa je područje dinaridskog krša omogućilo nesmetan razvoj starih populacija nekih slatkovodnih vrsta riba i izvorište je u kojem je počela kolonizacija šireg područja (Ćaleta i sur. 2015, Ćaleta i sur. 2019). No, čovjekov utjecaj na slatkovodne ekosustave rezultirao je i uvođenjem stranih vrsta u iste, koje danas predstavljaju glavnu prijetnju opstanku autohtonih. Prema Ćaleta i sur. (2019), u Hrvatskoj obitava 137 vrsta slatkovodnih riba što ju svrstava u sam vrh prema brojnosti vrsta slatkovodnih riba u Europi (Mrakovčić i sur. 2006).

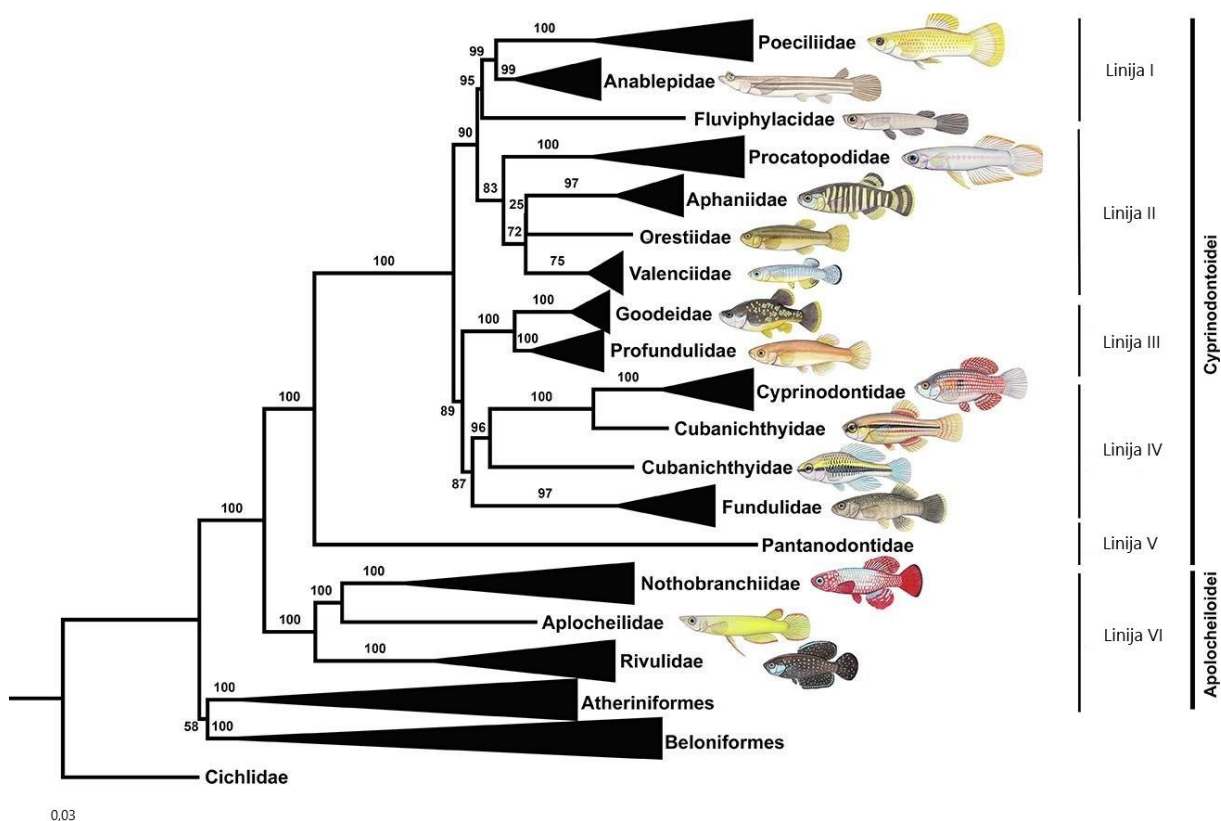
Kada bismo htjeli prikazati ukupan broj riba koje možemo pronaći u Hrvatskoj, on neće biti jednak zbroju gore navedenih brojeva, budući da postoji dio riba koji se može pronaći u oba staništa. Riječ je o eurihalnim vrstama koje nastanjuju brakične i tranzicijske vode, odnosno ekosustave na granici kopna i mora pod utjecajem plime i oseke, sa salinitetom većim od 0,5 ‰ (Agencija za okoliš i prirodu 2015). Tranzicijske vode obuhvaćaju obalne močvare i pličine, lagune, estuarije i druge prijelazne vode te morske uvale. Ova specifična staništa imaju obilježja usko povezana s količinom unosa slatke vode površinskim tokovima ili vruljama, fluktuacijama plime i oseke, ali i ljudskim djelatnostima koja su u prošlosti, često značajno, mijenjala ova područja kroz melioraciju zemljišta, pretvorbu istog u ribnjake za uzgoj ribe ili izgradnju solana (Facca i sur. 2020). U eurihalne vrste riba koje dolaze u Hrvatskoj ubrajaju se obrvan, *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821), čepa, *Alosa fallax* (Lacepède, 1803), šilo crnoboko, *Syngnathus taenionotus* Canestrini, 1871, iverak, *Platichthys flesus* Linnaeus, 1758, lubin, *Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758, orada, *Sparus aurata* Linnaeus, 1758, glavoči, Gobiidae, i cipli, Mugilidae (Ćaleta i sur. 2019, Dulčić i Kovačić 2020). Spomenute vrste ili trajno nastanjuju takva staništa ili ih koriste kao skloništa, mjesto reprodukcije, mjesto čuvanja mlađi ili kao hranilišta (Franco i sur. 2009).

1.2. Obrvan

1.2.1. Taksonomija obrvana

Obrvan, *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821), pripada rodu *Aphanius*, porodici Aphanidae, redu Cyprinodontiformes, razredu Actinopterygii.

Šaranozupke (Cyprinodontiformes) su monofiletski red, morfološki i ekološki raznolikih riba koje su globalno rasprostranjene u slatkovodnim, brakičnim i morskim staništima tropskog i umjerenog pojasa. Taksonomija reda je nedavno revidirana (Piller i sur. 2022) te ga tako danas sačinjava šesnaest priznatih porodica: Anablepidae, Aphanidae, Aplocheilidae, Cubanichthyidae, Cyprinodontidae, Fluviphylacidae, Fundulidae, Goodeidae, Nothobranchiidae, Orestiidae, Pantanodontidae, Poeciliidae, Procatopodidae, Profundulidae, Rivulidae i Valenciidae (Slika 1) (Parenti 1981, Freyhof i sur. 2017, Bragança i Costa 2018, Piller i sur. 2022).



Slika 1. Filogram (ML) reda Cyprinodontiformes. Preuzeto iz Piller i sur. 2022.

Taksonomija vrsta roda *Aphanius* bila je predmet brojnih istraživanja, budući da se vrste nisu mogle jednostavno razlikovati na temelju vanjske morfologije. Naime, tradicionalni pristupi taksonomiji temeljen na morfologiji često ne može razlikovati kriptične sastavnice

bioraznolikost što može dovesti do podcjenjivanja iste, naročito genske raznolikosti, čime može doći do neadekvatne zaštite pojedinih vrsta i/ili populacija (Esmaeili i sur. 2020). Stoga se integrativnim pristupom temeljenim na morfološkim i molekularnim podacima dobivaju novi pogledi na taksonomiju i filogeniju pojedinih vrsta.

Prema ranijim shvaćanjima, obrvan je pripadao porodici Cyprinodontidae (Parenti 1981), a na temelju opsežnih, multigenih filogenetskih istraživanja pokazano je kako je porodica Cyprinodontidae polifiletska te je rod *Aphanius* srodniji porodicama Valenciidae i Poeciliidae (Pohl i sur. 2015, Helmstetter i sur. 2016, Reznick i sur. 2017). Tako su Freyhof i sur. (2017) na temelju navedenog izdvojili pripadnike roda *Aphanius* u zasebnu porodicu Aphaniidae. Naime, tradicionalno su ciprinodontiformne ribe zapadnog Palearktika svrstavane u dvije porodice, Valenciidae i Cyprinodontidae (Parenti 1981, Kottelat i Freyhof 2007, Van der Laan i sur. 2014), no porodica Cyprinodontidae je obuhvaćala četiri sasvim različite skupine riba: pet srodnih rodova (*Cualac*, *Cyprinodon*, *Floridichthys*, *Jordanella*, *Megupsilon*) iz Sjeverne, Srednje i sjevera Južne Amerike, rod *Aphanius* iz zapadnog Palearktika i sjeverne do istočne Afrike, rod *Orestias* iz Anda te rod *Cubanichthys* s Kariba i Kolumbije (Parenti 1981., Van der Laan i sur. 2014).

Osim promjena na razini porodice, u proteklim je godinama došlo i do promjena na razini taksonomije samog roda *Aphanius*. Brojnost vrsta roda *Aphanius* kretala se oko dvadeset (Kottelat i Freyhof 2007), a u proteklih desetak godina opisan je velik broj novih vrsta naročito s područja Turske i Irana (Teimori i sur. 2012, Esmaeili i sur. 2014, Teimori i sur. 2014, Yoğurtçuoğlu i Freyhof 2018). Nakon što su Esmaeili i sur. (2020) proveli DNA barkodiranje vrsta roda *Aphanius*, prepoznata je velika genska raznolikost te je predloženo smještanje određenih vrsta u nove rodove *Aphaniops* i *Paraphanius*. Upravo je to iziskivalo dodatan pregled molekularnih podataka i morfoloških karakteristika na temelju čega je napravljena nova klasifikaciju same porodice Aphaniidae (Freyhof i Yoğurtçuoğlu 2020). Unatoč činjenici, kako su sve vrste unutar porodice slične po uzorcima ljustica na tijelu, položaju peraja i merističkim obilježjima, pronađene su razlike te je prepoznato osam rodova: *Anatolichthys*, *Aphaniops*, *Aphanius*, *Apricaphanius*, *Esmaeilius*, *Kosswigichthys*, *Paraphanius* i *Tellia* (Freyhof i Yoğurtçuoğlu 2020).

Tako se rod *Aphanius* razlikuje od ostalih rodova porodice Aphaniidae po jedinstvenom uzorku boje mužjaka, prvenstveno žute repne peraje, koja se dobro razlikuje od srebrnastih međuprostora između sivih ili smeđih bočnih pruga; po prisutnosti kožnog omotača na bazi analne peraje kod ženki (nasuprot odsutnosti kod *Aphaniopsa*), prisutnosti crnog ruba leđne

peraje kod mužjaka (nasuprot odsutnosti kod svih *Aphaniops* osim *A. sirhani*) i prisutnosti kanala glave (nasuprot odsutnosti u *Anatolichtys*) (Freyhof i Yoğurtçuoğlu 2020).

1.2.2. Opis i biologija vrste

Jedinke obrvana malene su veličine s izraženim spolnim dimorfizmom, pri čemu su mužjaci manji od ženki (mužjaci dosegnu duljinu od 5 cm, a ženke od 6 cm ukupne duljine). Tijelo im je izduženo i bočno spljošteno s dorzoventralno stisnutom glavom i širokim međuorbitalnim razmakom. Tijelo je prekriveno velikim cikloidnim ljuskama. Nemaju bočne pruge, a u mediolateralnom nizu postoji 23 do 30 ljusaka. Usta su polugornja s blago ispupčenom donjom čeljusti te 12 do 16 trovrhkih zubi u jednom redu u obje čeljusti. Sve peraje posjeduju samo mekane šipčice. Leđna i podrepna peraja smještene su u stražnjoj polovici tijela s osnovicom leđne peraje smještenom nešto više prema naprijed. Prsne peraje su umjereno kratke, a trbušne su male i smještene na sredini tijela (Kottelat i Freyhof 2007, Dulčić i Kovačić 2020).

Spolni dimorfizam jedinki osim u veličini tijela očituje se i u obojenosti jedinki (Slika 2). Mužjaci ove vrste imaju zelenosmeđe do sivosmeđe obojenje tijela s 8 do 15 plavosivih okomitih traka duž bokova te žućkaste peraje s više ili manje izraženim crnim, poprečnim pojasom blizu ruba repne i leđne peraje. Leđna i podrepna peraja su veće od istih kod ženki, a njihova veličina i intenzitet obojenosti pokazuju dominantnost jedinke (Cavaro i sur. 2021). Ženke su svjetlije obojene te imaju 11 do 17 kraćih tamno smeđih traka koje se ne protežu cijelom visinom tijela. Peraje su bezbojne do blijedo žute (Jardas i sur. 2008, Kottelat i Freyhof 2007, Mrakovčić i sur. 2006). Obojenje mužjaka povezano je s okolišnim čimbenicima tako mužjaci koji žive u staništima većeg saliniteta imaju izraženije žuto obojane peraje budući da mnogi pigmenti pokazuju antioksidativno djelovanje. Također, imaju izraženiju ispruganost ako naseljavaju staništa s više vodene vegetacije što je pokazano i na drugim ribama koje naseljavaju heterogena staništa s gustom podvodnom vegetacijom (Cavaro i sur. 2021).

Obrvan je eurifagni omnivor koji se hrani uglavnom beskralješnjacima, algama i organskim detritusom (Jardas i sur. 2008, Kottelat i Freyhof 2007, Mrakovčić i sur. 2006), a njegova prehrana varira s dobi jedinke i godišnjim dobima (Facca i sur. 2020). Uz to, ima ključnu ulogu u priobalnim i hipersalinim ekosustavima gdje je bitna karika u hranidbenim mrežama.



Slika 2. Morfologija mužjaka (A) i ženke (B) obrvana (*Aphanius fasciatus*).

Preuzeto iz Lionetto i sur. 2023.

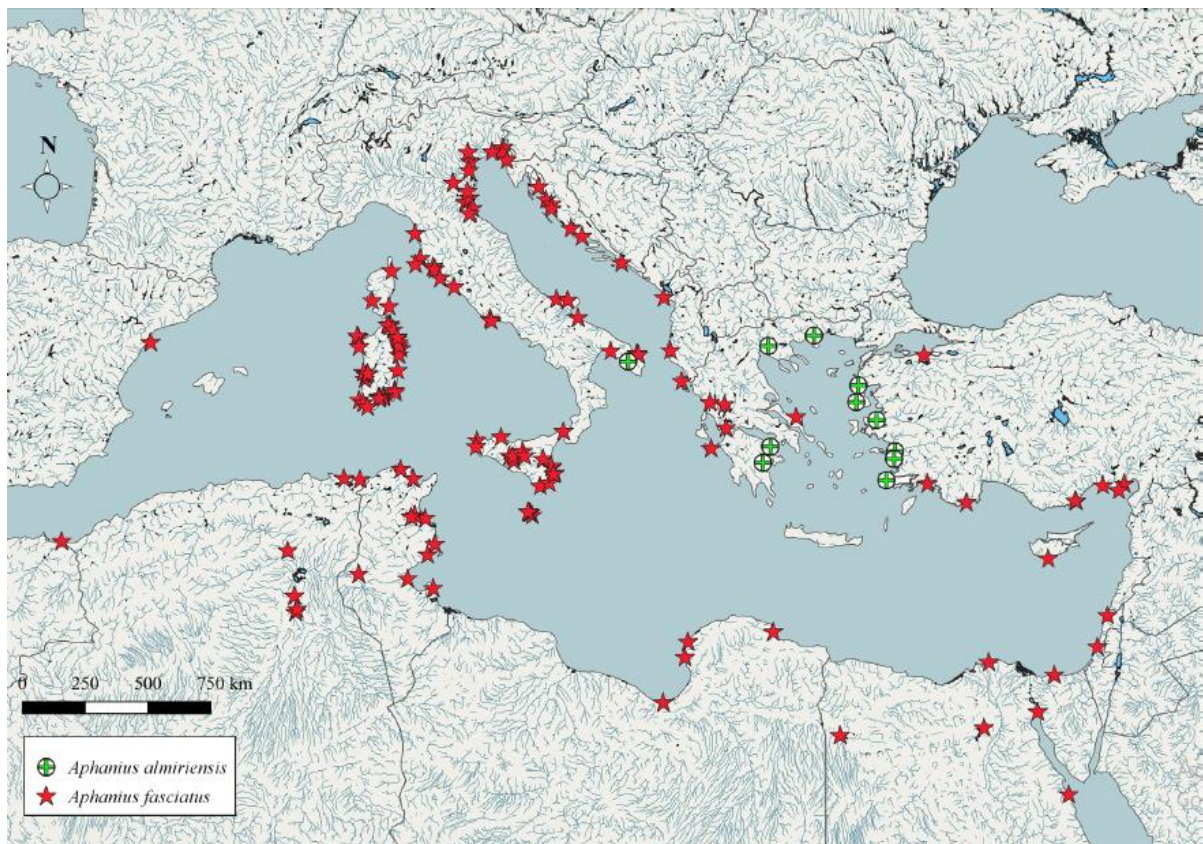
Obrvan ima kratko generacijsko vrijeme koje u prosjeku iznosi 3,5 godina, a najviše do šest godina. Jedinke spolno sazrijevaju sa 7 do 12 mjeseci, a upravo rano spolno sazrijevanje jedna je od strategija životinja koje žive u nestabilnom i nepredvidljivom okolišu. Mrijeste se u više navrata u periodu od travnja do kolovoza čime im je povećan fekunditet te omogućeno polaganje većih jaja što pozitivno utječe i na vjerojatnost preživljavanja. Mrijest se uglavnom odvija u izrazito slanim ili bočatim vodama bez kompetitivnog pritiska. Ličinačka faza izostaje. Mlađ se izvaljuje nakon 10 do 14 dana, nakon čega tvore velike plove. Ženke su općenito brojnije od mužjaka, iako omjer spolova pokazuje sezonske varijacije. Tako mužjaci koji su obojaniji od ženki i koji se udvaraju prilikom parenja imaju veću smrtnost tijekom reproduktivnog razdoblja (Facca i sur. 2020, Kottelat i Freyhof 2007, Mrakovčić i sur. 2006).

Obrvan naseljava obalne lagune, obalne močvare, pličine i muljeve, estuarije i druge prijelazne vode, kao i umjetna slana i bočata staništa (Matić-Skoko i sur. 2005, Mrakovčić i sur. 2006, Bakran-Petricioli i Jakl 2007, Buj i sur. 2015, Renić i sur. 2023). Staništa koja nastanjuje su uglavnom malih površina i diskontinuirana, a mogu biti vrlo visoke slanosti što je za mnoge ribe nepogodno te predstavlja zapreku njihovom opstanku. Tako je za obrvana zanimljivo da može podnijeti temperaturni raspon od 4 do 40 °C te se razmnožavati pri salinitetu

od 10 do 80 %, čime se ubraja među najotpornije euritermne i eurihaline vrste Mediterana (Facca i sur. 2020, Buj i sur. 2015, Jardas i sur. 2008).

1.2.3. Rasprostranjenost obrvana

Prirodno je rasprostranjen u većem dijelu Mediterana (Slika 3). Izostaje u njegovu najzapadnijem dijelu gdje je zamijenjen vrstama *Apricaphanius iberus* (Valenciennes, 1846) i *Apricaphanius baeticus* (Doadrio, Carmona & Fernández-Delgado, 2002) te u Egejskom moru gdje ga zamjenjuje *Aphanius almiriensis* Barbieri, Kottelat & Stomboudi, 2007. U jugoistočnom Sredozemnom moru areal mu se djelomično preklapa s rasprostranjenošću vrste *Aphaniops dispar* (Rüppell, 1829). Također može se pronaći i u Sueskom kanalu i u slatkim vodama sjevera Afrike (Freyhof i Yoğurtcuoğlu 2020). Današnja mu je rasprostranjenost ograničena na bočate i hipersaline vode u slanim močvarama i lagunama gdje je broj pri malim dubinama. Procjenjuje se da na razini Mediterana danas obitava 135 populacija obrvana (Valdesalici i sur. 2019).



Slika 3. Kartografski prikaz rasprostranjenosti vrsta roda *Aphanius*.

Preuzeto iz Freyhof i Yoğurtcuoğlu 2020.

1.2.4. Rasprostranjenost obrvana u Hrvatskoj

Budući da je obrvan vrsta koja se najčešće ne uzorkuje standardnim metodama i u standardnim praćenjima stanja kako morskih, tako i slatkovodnih ihtiocenoza, podaci o njegovoj rasprostranjenosti u Hrvatskoj su sporadično poznati. Prvi precizni podaci o rasprostranjenosti su objavljeni u Crvenoj knjizi slatkovodnih riba Hrvatske (Mrakovčić i sur. 2006) i Crvenoj knjizi morskih riba Hrvatske (Jadaras i sur. 2008) i to na lokalitetima solanama Ston, Pag i Nin, uvalama Zrče i Dinjiška (otok Pag), Pantan te na ušćima Dragonje, Zrmanje, Karišnice i Neretve. Također postoji povijesni podatak o nalazu obrvana u Vranskom jezeru kod Biograda na Moru na temelju dva primjerka obrvana iz Prirodoslovnog muzeja u Trstu, što je i jedini nalaz za to područje (Mustafić i sur. 2017). Istraživanjima kasnijih godina ustanovljen je izostanak obrvana na lokalitetima Karišnica (Miočić-Stošić 2012.) i ušće Zrmanje (Bašić i sur. 2008, Matić-Skoko i sur. 2007), no pronađeni su novi lokaliteti i to uvala Supetarska Draga na otoku Rabu i jezero Male Soline u Zablaću kod Šibenika (Marčić i sur. 2015). Novijeg datuma, je pronalazak obrvana u uvali Šćuza, čija je populacija predmet ovog rada. Tako danas obrvan u Hrvatskoj nastanjuje solanu Pag, uvalu Dinjiška, solanu Nin, solanu Ston, otok Rab (Supetarska Draga), Pantan, uvalu Šćuza i jezero Male Soline kod Zablaća pored Šibenika (Renić i sur. 2023).

1.2.5. Ugroženost i zaštita obrvana

Obrvan je strogo zaštićena zavičajna divlja svojta sukladno Zakonu o zaštiti prirode (NN 70/05, 139/08), Pravilniku o proglašavanju svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 99/09) te je uvrštena u Crvenu knjigu slatkovodnih riba Hrvatske (Mrakovčić i sur. 2006) i Crvenu knjigu morskih riba Hrvatske (Jardas i sur. 2008) u kojima ima status ugrožene vrste (EN). Na globalnom i europskom Crvenom popisu IUCN-a označena je kao najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC) (Crivelli 2006, Freyhof 2010). Međunarodno je zaštićen Bernskom konvencijom (Dodaci II i III) te Direktivom o očuvanju prirodnih staništa i divlje faune i flore (Dodatak II). Temeljem spomenute Direktive na području Republike Hrvatske su izdvojena sljedeća područja ekološke mreže na kojima su populacije vrste cilj očuvanja: HR2001359 Otok Rab, HR3000450 Solana Pag, HR2001384 Solana Dinjiška, HR3000421 Solana Nin, HR3000430 Pantan i HR3000167 Solana Ston (Renić i sur. 2023).

Kao glavne prijetnje populacijama obrvana prepoznate su sljedeće ugroze: različite aktivnosti koje dovode do uništavanja ili degradiranja prirodnih i poluprirodnih staništa,

odnosno uništavanje plitkih i muljevitih morskih obala navoženjem kamenja i sličnog materijala (Renić i sur. 2023). Tako u prvom redu nasipavanje obale i podmorja krutim materijalom i otpadom, kao i nekontrolirana gradnja privatnih i turističkih objekata te gradnja marina, lukobrana, sidrišta, kupališta i umjetnih plaža u zatvorenim uvalama priobalnog pojasa ima za posljedicu promjene ekoloških čimbenika (Jardas i sur. 2008), ali i gubitak geološki uvjetovanog malog broja pogodnih staništa za obrvana.

Zatim, strane vrste prisutne u istim staništima kao obrvan vjerojatno izražavaju predacijski, a moguće i kompeticijski negativan učinak (Renić i sur. 2023). Poglavitito gambuzija (*Gambusia holbrooki* Girard, 1859), koje se nalazi na IUCN-ovom popisu 100 svjetski najopasnijih invazivnih stranih vrsta i za koju je dokazan kompeticijski, čak i predacijski učinak na pojedine populacije obrvana posebice u slatkovodnim i bočatim staništima (Monti i sur. 2021, Kottelat i Freyhof 2007, Crivelli 1995).

Različite promjene hidroloških režima tekućica kao što su kaptiranje izvora, crpljenje vode ili meliorativne radnje također negativno djeluju na ovu vrstu jer im je sezonsko poplavljanje krških izvora potrebno za razmnožavanje u bočatim dijelovima vodotoka (Renić i sur. 2023).

Solane, iako antropogena, izrazito su bitna staništa za opstanak ove vrste. Tako svi uzroci ugroženosti koji su posljedica izostanka aktivnosti nužnih za održavanje takvih poluprirodnih staništa (npr. prestanak rada solana s tradicionalnom proizvodnjom morske soli i sl.) mogu uzrokovati promjene ekoloških uvjeta nužnih za opstanak obrvana (Renić i sur. 2023).

Kao dugoročna ugroza koja prvenstveno ugrožava stanište obrvana prepoznato je podizanje razine mora, naročito uz niži dotok sedimenta slatkom vodom, poglavito povremenih i presušujućih vodotoka (Cavraro i sur. 2017).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Svrha ovog istraživanja bila je morfološki i genski okarakterizirati populaciju obrvana u uvali Šćuza te pokušati objasniti podrijetlo ove populacije te moguće lokalne čimbenike koji utječu na njenu raznolikost i trenutno stanje populacije.

Stoga su postavljeni sljedeći ciljevi istraživanja:

- opisati morfometrijske značajke populacije,
- opisati gensku raznolikost populacije,
- utvrditi filogenetski položaj i srodstvene odnose u odnosu na druge populacije ove vrste,
- predložiti konzervacijske mjere za opstanak populacije.

Ostvarivanjem navedenih ciljeva istraživanje će omogućiti određivanje evolucijskih puteva ciljne populacije sa srodnim i geografski bliskim populacijama obrvana te će se omogućiti predviđanje budućih reakcija populacije na promijene i prijetnje u okolišu. Prvi cilj pomoći će određivanju raznolikosti morfoloških značajki između mužjaka i ženki na istraživanom području. Drugi i treći cilj pružit će uvid u gensku strukturu i raznolikost istraživane populacije i povezanost iste s drugim populacijama ove vrste, dok će se četvrtim ciljem na temelju prikupljenih podataka i korištenjem adekvatnih analiza donijeti zaključci o najefikasnijim mjerama zaštite populacije. Sve navedeno omogućit će kvalitetnije planiranje aktivnosti očuvanja populacije obrvana u povoljnom stanju, kao i njegovog staništa.

3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je područje uvale Šćuza (Slika 4). Ona predstavlja najjuvčueniji dio Medulinskog zaljeva od kojeg je odvojena zaštitnim zidom (umjetna porozna barijera). Smještena je na samom jugu poluotoka Istre, između rta Brigi na poluotoku Premantura i rta Munat Pomerski. Administrativno se nalaze na području Istarske županije, Općine Medulin (Anonymus 2023).

Uvala Šćuza predstavlja prirodnu uvalu nastalu transgresijom mora nakon posljednje glacijacije. Površina uvale iznosi 68,56 hektara s maksimalnom izmjerenom dubinom od 1,7 m. Na području uvale Šćuza prema Karti obalnih i pridnenih morskih staništa (Bioportal 2023) nalaze se sljedeći stanišni tipovi: Infralitoralni pjeskoviti muljevi, pijesci, šljunci i stijene u eurihalinom i euritermnom okolišu (G. 3. 1.) i Asocijacija s vrstom *Cymodocea nodosa* (G. 3. 2. 2. 1.). Asocijacija s vrstom *Cymodocea nodosa* odgovara kodu stanišnog tipa značajnog za EU (Natura kod) 1110 Pješćana dna trajno prekrivena morem, dok stanišni tip Infralitoralni pjeskoviti muljevi, pijesci, šljunci i stijene u eurihalinom i euritermnom okolišu odgovara Natura kodu 1150* Obalne lagune. Ovi stanišni tipovi nalaze se i na Popisu ugroženih i rijetkih stanišnih tipova zastupljenih na području Republike Hrvatske značajnih za ekološku mrežu Natura 2000, a stanišni tip Obalne lagune prepoznat je kao prioritetni stanišni tip. Uvala Šćuza predstavlja jedno od najvažnijih područja u Hrvatskoj za prioritetni ciljni stanišni tip 1150* obalne lagune (Anonymus 2023), zbog čega je područje uvale obuhvaća područje ekološke mreže značajno za očuvanje ciljnih vrsta i ciljnih stanišnih tipova; HR3000174 Šćuza.

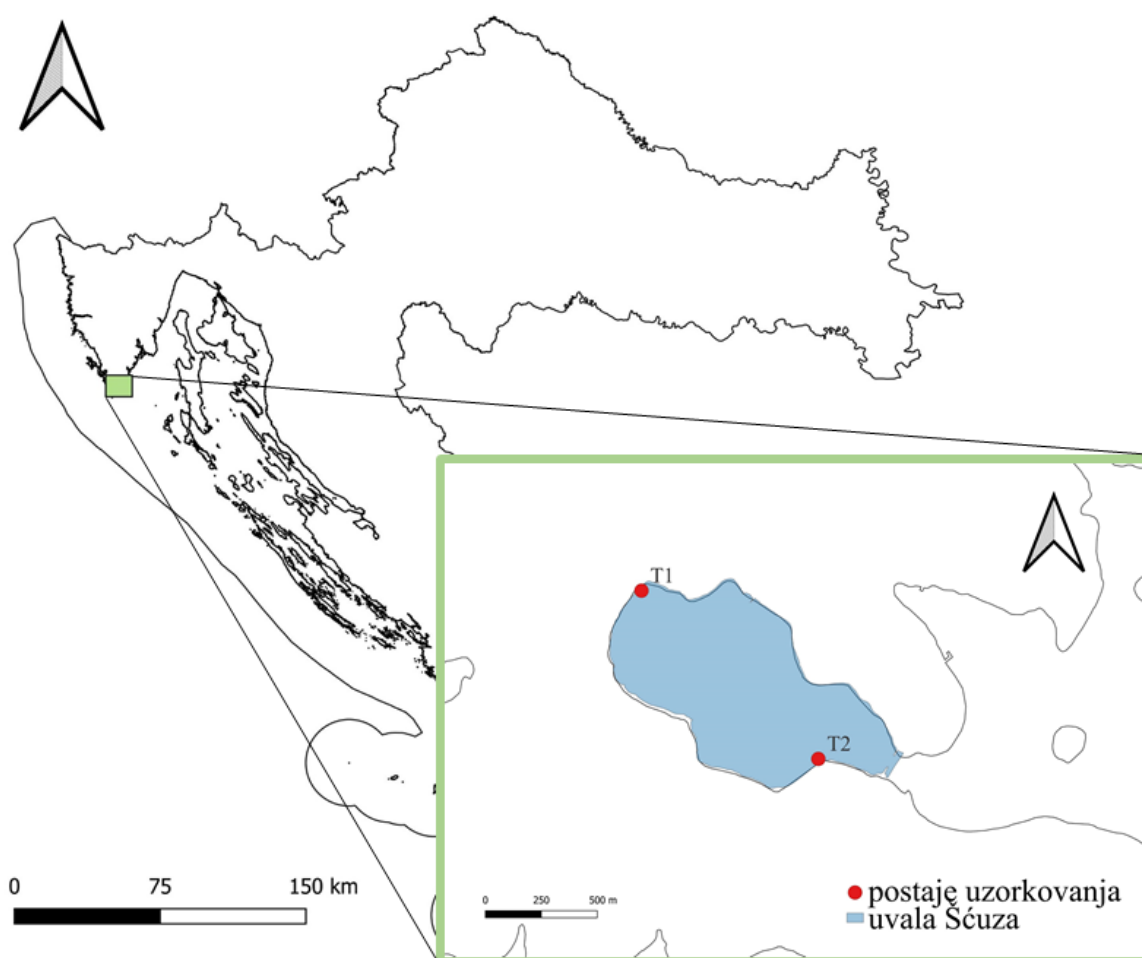
Zbog svojih stanišnih obilježja uvala Šćuza ima važnu funkciju rastilišta i hranilišta mnogih vrsta riba, a livade morskih cvjetnica pružaju pogodne uvijete za sparidne vrste riba (ljuskavke, Sparidae). Na području čitavog Medulinskog zaljeva na temelju trenutnih podataka obitava 79 vrsta priobalnih riba svrstanih u 31 porodicu, od čega nešto manje od 60 % stalno prisutnih, oko 30 % povremeno prisutnih i nešto preko 10 % tranzitnih vrsta riba (Anonymus 2023).

Unatoč dugoj tradiciji u lovu i uzgoju školjkaša, kao i u ribolovu (na pomorskoj karti i TK 25.000 uvala se naziva Ribnjak), na području uvale uzgoj danas ne postoji (Anonymus 2023). Uz to, uvala Šćuza je na inicijativu lokalnih ribara uvrštena u Pravilnik o obavljanju ribolova u zaštićenim područjima, posebnim staništima i područjima s posebnom regulacijom ribolova (NN 125/20) kao područje ribolovnog mora s posebnom regulacijom ribolova u kojoj je svaki oblik ribolova (gospodarski, mali obalni, sportski i rekreacijski) zabranjen (NN 125/20; Anonymus 2023).

Uzorkovanje je provedeno na dvije postaje. Postaja T1, koja odgovara transektu 1, predstavlja najsjeverniju točku zaljeva, a ujedno i mjesto gdje se ulijeva povremeni vodotok u more. Postaja T2, koja odgovara transektu 2, nalazi se na mjestu spoja obale sa zaštitnim zidom koji uvalu odvaja od Medulinskog zaljeva. Koordinate uzorkovanih postaja zabilježene su u HTRS96/TM projekcijskom koordinatnom sustavu te su prikazane u Tablici 1. Kartografski prikaz područja istraživanja izradio sam u QGIS 3.22.14. programskom paketu.

Tablica 1. Uzorkovane postaje s pripadajućim koordinatama u HTRS96/TM projekcijskom sustavu.

	X koordinata	Y koordinata
T1	293148	4968204
T2	293943	4967444



Slika 4. Kartografski prikaz područja istraživanja. Sve podloge preuzete su s Bioportala (<https://bioportal.hr/gis/>), a kartografski prikaz je izrađen u programskom paketu QGIS 3.22.14.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Popis korištenih kemikalija, opreme i računalnih programa

4.1.1. Terenska oprema za sakupljanje uzoraka

- mreža potegača
- čizme
- posude za pohranjivanje uzoraka
- 96 %-tni etanol

4.1.2. Laboratorijska oprema i kemikalije

- digitalna pomična mjerka (Mitutoyo CD-6 CS)
- PCR uređaj (Eppendorf nexus GX2)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5424)
- vodena kupelj (SHEL LAB model no: 1225)
- set kemikalija za izolaciju DNA (Dneasy Blood & Tissue Kit; QIAGEN): ATL pufer, AL pufer, AW1 i AW2 koncentrirani pufer (prema uputama treba dodati 96-100 % -tni etanol), AE elucijski pufer, proteinaza K
- set kemikalija za lančanu reakciju polimerazom (HotStarTaq Plus Master Mix Kit; QIAGEN)
- agarozna (Thermo Scientific TopVision Agarose Tablets)
- TAE pufer
- boja za agarozni gel (Invitrogen SYBR Safe DNA gel stain)
- oprema za elektroforezu (BIO RAD SUB-CELL GT i BIO RAD POWER PAC 300)
- vrtložna miješalica (BIO RAD BR-2000 Vortexer)
- mikropipete (Eppendorf Research plus)
- uređaj za fotografiranje gela s UV svjetlom (FastGene GelPic LED Box)

4.1.3. Računalni programi

- BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (Hall 1999)
- DnaSP 5.10 (Librado i Rozas 2009)
- Network 4.5.1.6. (Fluxus Technology Ltd.)
- MEGA 6.06 (Tamura i sur. 2007)

- PAUP 4.0b10 (Swofford 2002)
- QGIS 3.20.2
- Microsoft Office 2010 programski paket
- Past 4.13 (Hammer i sur. 2001)
- VORTEX 10.6.0.0. (Lacy i Pollak 2023)

4.2. Skupljanje uzoraka

U ovom istraživanju obradio sam 40 jedinki obrvana za morfometrijska istraživanja i dodatnih 30 jedinki za genska istraživanja. Uzorke su metodom mreža potegača, skupili djelatnici Zoologijskog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, dana 19. lipnja 2023. godine. Sve analizirane jedinke obrvana uzorkovane su na postaji T1, dok na postaji T2 obrvan nije zabilježen. Nakon što su ulovljene, jedinke su konzervirane u 96 %-tnoj otopini etilnog alkohola.

Mreže potegače predstavljaju primjerenu metodu za uzorkovanje pridnenih ili pelagičkih morskih riba u plitkim obalnim dijelovima, kao i slatkovodnih kada elektroribolov zbog veće količine otopljenih soli nije moguć (Renić i sur. 2023). Njima se zapasuje jedan dio mora (uvala, dio lagune, kanali, ušća vodotokova u more i sl.) te se potom mreža jednoliko s obje strane poteže prema obali bilo užetom ili pomoću vitla na plovilu koje je privezano za obalu ili fizičkom snagom čovjeka (Cetinić i Swiniarski 1985).

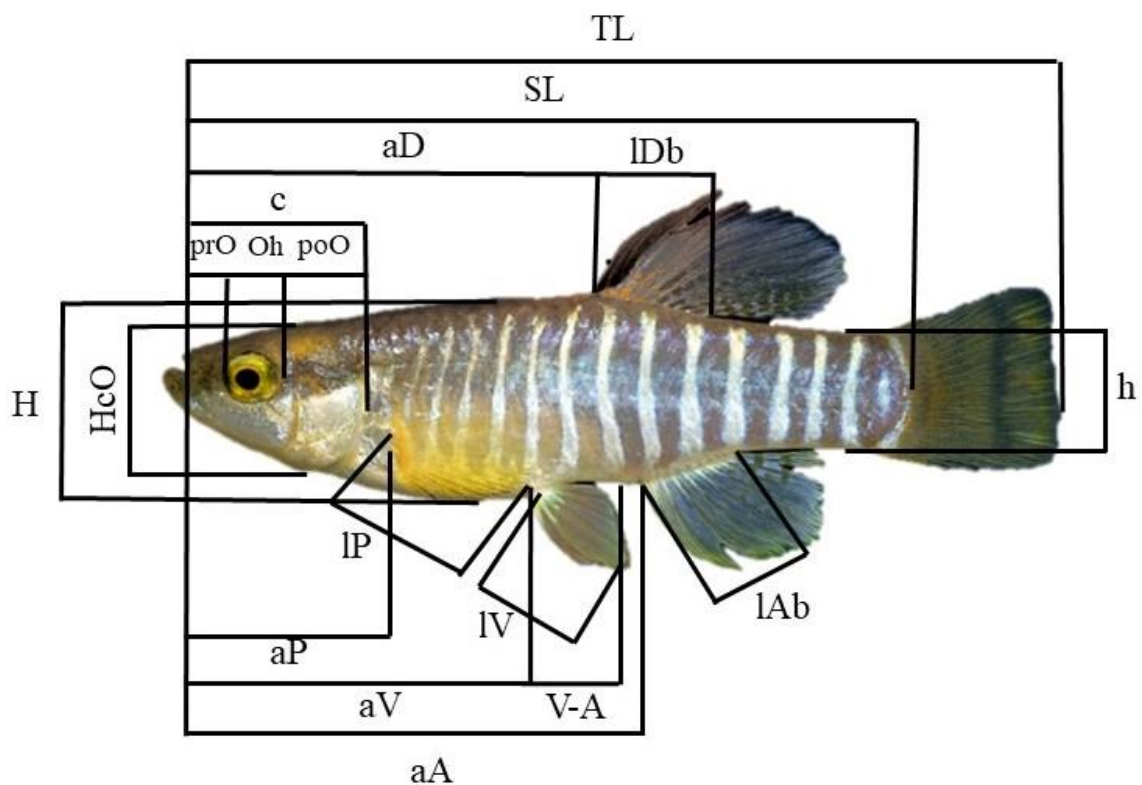
Mreža potegača korištena u ovom istraživanju je jednostruka mreža veličine mrežnog oka od 2 mm do 4 mm. Njome se upravlja pomoću dva dugačka užeta pričvršćena na krajevima radi povlačenja i zbijanja jata riba. Važna značajka potegača je da se riba u njih ne zapliće, nego se samo skuplja. Sastoji se od gornjeg konopca s plutućama koji plutaju na površini te donjeg dijela s utezima koji stružu po dnu. Iz tog razloga moguće ju je koristiti samo na onim lokalitetima gdje su dna čista pomična, pjeskovita i pjeskovito-muljevita, odnosno tamo gdje nema stijena, zadijeva i prepreka. Površina i dno mreže predstavljaju prirodne zapreke koje onemogućuju bijeg riba iz područja ograđenog mrežom (Renić i sur. 2023).

4.3. Morfometrija

Kako bih morfološki opisao populaciju na istraživanom području, analizirao sam morfometrijske odnose 40 jedinki obrvana. Morfometrijska obilježja odnose se na mjere

djelova tijela te udaljenosti između pojedinih dijelova tijela ili određenih točaka na tijelu te predstavljaju kontinuirane značajke kojima se opisuje sam oblik tijela. Morfometrijske analize uključuju mjerenje pojedinih duljina na tijelu riba te njihovu statističku obradu i uspoređivanje. Na taj način se omogućuju opisivanje oblika tijela pojedinih riba te utvrđivanje razlika između populacija i vrsta.

Sve mjere sam izmjerio na tijelu ribe, od točke do točke, u laboratoriju pomoću digitalne pomične mjerke marke Mitutoyo CD-6 CS s točnosti od 0,1 mm. Izmjerio sam dvadeset odabranih morfometrijskih svojstava prema Kottelat i Freyhof (2007), (Slika 5): totalna duljina (TL), standardna duljina (SL), predorzalna udaljenost (aD), predprsna udaljenost (aP), predtrbušna udaljenost (aV), predpodrepna udaljenost (aA), duljina glave (c), predočni prostor (prO), promjer oka (Oh), zaočni prostor (poO), duljina baze leđne peraje (lDb), duljina prsne peraje (lP), duljina trbušne peraje (lV), V-A udaljenost, duljina baze podrepne peraje (lAb), visina repnog drška (h), najveća visina tijela (H), visina glave (HcO), najveća širina tijela (lac) i međuočna širina (io).



Slika 5. Prikaz morfometrijskih mjera koje su se koristile u istraživanju. Prikazane su sve mjere osim mjera širine. Prikaz sam izradio u programu Microsoft PowerPoint 2010, a fotografiju preuzeo iz Freyhof i Yoğurtçuoğlu 2020.

Kako bih mogao analizirati morfometrijske mjere, a da se pritom što više smanji komponenta ekološkog utjecaja na njih, napravio sam njihovu standardizaciju odnosno iskazao ih kao relativne vrijednosti. Iako se utjecaj ekoloških faktora na morfometrijske odnose također ne može zanemariti, ipak je znatno smanjen. Naime, u brojnim je slučajevima dokazano kako na morfološke značajke pojedinih riba uvelike utječu ekološki uvjeti staništa te budući da genski faktori uvjetuju određene raspone dimenzija tijela unutar kojih mogu nalaziti pojedine vrste. Standardizaciju sam proveo tako da sam mjere pretvorio u morfometrijske odnose te ih iskazao kao odnose koliko puta neka mjera stane u SL, c i H (Kottelat i Freyhof 2007).

Iz izmjerenih mjera za svaku sam jedinku odredio 20 morfometrijskih odnosa ili omjera: omjer standardne duljine i ukupne duljine tijela (SL/TL); omjere duljine glave, predpodrepne, predtrbušne, predprsne i predorzalne udaljenosti, V-A udaljenosti, duljina baza leđne i podrepne peraje, duljina prsne i trbušne peraje, najveće širine tijela te najveće i najmanje visine tijela sa standardnom duljinom (c/SL, aA/SL, aV/SL, aP/SL, aD/SL, V-A/SL, IDd/SL, lAd/SL, lP/SL, lV/SL, lac/SL, H/SL i h/SL); omjere širine međuočnog prostora, promjera oka, predočnog i zaočnog prostora s duljinom glave (io/c, Oh/c, prO/c, poO/c); omjere visine glave i najmanje visine tijela s najvećom visinom tijela (hco/H i h/H).

4.4. Statistička obrada morfometrijskih značajki

Statistička obrada morfometrijskih podataka obuhvaćala je deskriptivnu statistiku, računanje koeficijenta korelacije te utvrđivanje statistički značajnih razlika u morfometrijskim mjerama i omjerima između mužjaka i ženki.

Deskriptivnom sam statistikom uredio nestandardizirane podatke te formirao statistički niz, sažeo pojedinačne podatke i izrazio ih pomoću pokazatelja srednje vrijednosti i mjera disperzije. Istaknuo sam minimalne i maksimalne vrijednosti svih morfometrijskih mjera odvojeno za mužjake i ženke. Izračunao sam aritmetičku sredinu, kao najčešću srednju vrijednost, svih morfometrijskih značajki također odvojeno za mužjake i ženke. Od položajnih srednjih vrijednosti odredio sam medijan. Uz to, kao mjeru disperzije kojom sam opisao stupanj varijabilnosti podataka izračunao sam standardnu devijaciju. Svu deskriptivnu statistiku sam napravio u programu Past 4.13 (Hammer i sur. 2001).

U istom programu izračunao sam i koeficijent korelacije (Pearsonov koeficijent) koji govori o linearnom odnosu između dvije varijable, a računa se kao kovarijanca standardiziranih

vrijednosti dviju varijabli. S obzirom na to da je ovim testom zaključeno da većina mjera značajno korelira sa standardnom duljinom, napravio sam standardizaciju podataka.

Kako bih provjerio imaju li svi podaci/varijable normalnu raspodjelu (distribuciju) proveo sam Shapiro-Wilks test normalnosti pri razini pouzdanosti od 95 % i njime dodatno potvrdio potrebu za standardizacijom podataka. Naime, nulta hipoteza ovog testa pretpostavlja da vrijednosti podataka svih varijabli prate normalnu distribuciju gdje dolazi do odbacivanja nulte hipoteze ako je p-vrijednost manja od 0,05. Neke varijable nisu imale normalnu raspodjelu prema Shapiro-Wilks testu, zbog čega sam dodatno transformirao čiste podatke pomoć logaritma po bazi 10 budući da su sve korištene mjere kontinuirane varijable. Ponovnom provedbom testa podaci i dalje nisu imali normalnu distribuciju.

Za usporedbu srednjih vrijednosti dva nepovezana uzorka, u ovom istraživanju mužjaka i ženki, koristio sam parametarski t-test (s obzirom da je većina podataka imala normalnu distribuciju) kako bih mogao usporediti, razlikuju li se statistički značajno mužjaci i ženke po svojim morfometrijskim karakteristikama. T-test polazi od nulte hipoteze da su dva uzorka uzeta iz populacija s jednakim srednjim vrijednostima. Nultu hipotezu, kako su aritmetičke sredine pojedinog morfometrijskog svojstva između mužjaka i ženki s pojedinog lokaliteta statistički značajno različite (na razini značajnosti od 5 %) prihvaćamo ako je p-vrijednost manja od 0,05.

Sve navedene testove proveo sam i na morfometrijskim mjerama i morfometrijskim omjerima u računalnom programu Past 4.13. (Hammer i sur. 2001).

4.5. Laboratorijske analize uzoraka (izolacija DNA, umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje)

Za genske analize je uzorkovano dodatnih 30 jedinki obrvana. Svim jedinkama sam odrezao repne peraje, a ako su bile premalene i komadić prsnih. Svaki uzorak tkiva sam odložio u označenu Eppendorf tubicu (0,5 ml), a po potrebi ga i dodatno usitnio škarama. Iz uzoraka tkiva izolirao sam DNA pomoću *DNeasy Blood & Tissue* kompleta za izolaciju (QIAGEN) slijedeći protokol proizvođača. U tubice s uzorcima, prvo sam dodao 180 μ l ATL pufera i 20 μ L proteinaze K. Zatim sam tubice zatvorio i stavio na vrtložnu miješalicu kako bi se njihov sadržaj ravnomjerno izmiješao. U sljedećem koraku uzorke u tubicama stavio sam u vodenu kupelj na temperaturu od 56 °C u trajanju od 24 sata. Drugi dan ponovno sam ih stavio na

vrtožnu miješalicu (u trajanju desetak sekundi) nakon čega sam dodao 200 µl AL pufera. Zatim sam sve opet promiješao na vrtožnoj miješalici nakon čega sam uzorcima dodao 200 µl 96%-tnog etilnog alkohola. Ponovno je uslijedilo miješanje na vrtožnoj miješalici nakon kojeg sam iz tubica mikropipetom izvadio 650 µl uzorka te sam taj volumen prebacio u tubice s kolonom koje sam prethodno označio jednako kao i na prethodnim tubicama. Nakon toga, uzorke sam stavio na centrifugu 8000 rpm na 1 minutu. Nakon centrifuge, kolone tubica sam prenio u nove tubice u koje sam zatim dodao 500 µl AW1 pufera te sam ih ponovno centrifugirao na 8000 rpm na 1 minutu. Kolonu sam ponovo prenio u novu tubicu u koju sam dodao 500 µl AW2 pufera. Pri svakom prenošenju kolone u novu tubicu, donji dio tubice s membranom sam odlijevao. Zatim je uslijedila centrifuga uzoraka na 14000 rpm u trajanju od 3 minute. Nakon centrifuge donji dio tubice s kolonom sam odlio, a kolonu sam prenio u Eppendorf tubicu s prethodno označenim pripadajućim kodom. U svaku tubicu dodao sam 150 µl elucijskog AE pufera i tubice s uzorcima sam ostavio 2 do 3 minute na sobnoj temperaturi da pufer može djelovati. Nakon toga uslijedilo je centrifugiranje uzoraka (8000 rpm na 1 minutu) nakon koje sam kolone bacio, a u Eppendorf tubicama su zaostali DNA izolati.

Dobivene DNA izolate sam umnožio lančanom reakcijom polimerazom (PCR reakcijom) uz uvijete i početnice navedene u Tablici 2. Prije stavljanja u PCR uređaj, uzorke sam pripremio s obzirom na genski marker, odnosno gen za citokrom *b* (*cyt b*), koristeći komplet kemikalija *HotStarTaq Plus Master Mix Kit* (QIAGEN) te početnice sintetiziranih u MacroGenEurope servisu.

Tablica 2. Laboratorijski protokol za PCR i početnice za analizirani genski marker prema Buj i sur. 2015.

genski marker	<i>cyt b</i>
PCR ciklus	10 min, 95°C 35x 1 min, 92°C 01:30, 48°C 03:00, 72°C 4 min, 72°C
početnice	ApL14724: GTGACTTGAAAAACCACCGTTG ApH15915: CAACGATCTCCGGTTTACAAGAC

Rezultat i uspješnost PCR reakcija provjerio sam elektroforezom na agaroznom gelu. Gel sam pripremio pomoću 1 g agaroze koju sam stavio u 100 ml TAE (1 %) pufera. Također da bi gel kasnije bilo moguće fotografirati pod UV svjetlom dodao sam u mješavinu za gel i 8 µl SYBR Safe boje. Uzorke sam mikropipetom nanio u jažice na gelu koji sam zatim stavio u kadu za elektroforezu te proveo elektroforezu na 120 V, 30 minuta. Nakon pola sata gel sam fotografirao u stroju za fotografiranje s UV svjetlom. Dobiveni PCR produkti provjereni elektroforezom zatim su poslani na sekvenciranje u MacroGenEurope servis u Nizozemskoj.

4.6. Filogenetska rekonstrukcija

S ciljem utvrđivanja srodstvenih odnosa populacije obrvana iz uvale Šćuza s ostalim populacijama te vrste, proveo sam filogenetsku rekonstrukciju metodama najveće parsimonije (MP) i najveće vjerojatnosti (ML), koje rezultiraju filogenetskim stablima te metodom susjednog sparivanja (MJ), koja rezultira filogenetskom mrežom. Kao osnovni genski marker za filogenetsku rekonstrukciju koristio sam gen za citokrom *b* (*cyt b*), koji se u prethodnim istraživanjima pokazao kao najpogodniji za taksonomske analize te analize populacijske genetike riba, s obzirom na odgovarajuću stopu mutacija i broj parsimonijskih mjesta prikladnih baš za istraživanja na razini inter- i intraspecijske raznolikosti.

Sekvence dobivene iz prikupljenih uzoraka za ovo istraživanje sravnio sam pomoću računalnog programa BioEdit (Hall 1999), a kromatograme svih dobivenih sekvenci sam provjerio vizualno. Kao ulazne sekvence za izradu filogenetskih stabala i mreže koristio sam haplotipove koje sam odredio prema sekvencama dobivenim iz uzoraka prikupljenih za ovo istraživanje pomoću programa DnaSP 5.10.01 (Librado i Rozas 2009). Osim haplotipova dobivenih ovim istraživanjem, u filogenetsku rekonstrukciju uključio sam i sve sekvence zadovoljavajuće duljine prisutne u Banci gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tablica 3). Sekvence preuzete iz Banke gena predstavljaju jedinice s lokaliteta iz Italije, Slovenije, Hrvatske, Crne Gore, Albanije i Grčke, a koristio sam ih radi dobivanja jasnijeg uvida u filogenetski položaj proučavanih jedinki u odnosu na njihove europske srodnike.

Tablica 3. Sekvence obrvana iz Banke gena (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) koje su uključene u filogenetsku rekonstrukciju na temelju *cyt b* gena.

pristupni kod	referenca	lokalitet
OR134828	Pappalardo i sur. 2024	Korission
OR134825	Pappalardo i sur. 2024	Korission
OR134818	Pappalardo i sur. 2024	Vain
OR134813	Pappalardo i sur. 2024	Vain
OR134812	Pappalardo i sur. 2024	Tarquinia
OR134805	Pappalardo i sur. 2024	Tarquinia
OR134797	Pappalardo i sur. 2024	Casaraccio
OR134794	Pappalardo i sur. 2024	Casaraccio
OR134788	Pappalardo i sur. 2024	Grado
OR134785	Pappalardo i sur. 2024	Grado
OR134783	Pappalardo i sur. 2024	Karavasta
OR134774	Pappalardo i sur. 2024	Karavasta
KT280033	Buj i sur. 2015	Sečovlje
KT280016	Buj i sur. 2015	Sečovlje
KT280023	Buj i sur. 2015	Pag
KT280024	Buj i sur. 2015	Pag
KT280022	Buj i sur. 2015	Dinjiška
KT280021	Buj i sur. 2015	Dinjiška
KT280017	Buj i sur. 2015	Nin
KT280018	Buj i sur. 2015	Nin
KT280025	Buj i sur. 2015	Pantan
KT280012	Buj i sur. 2015	Ston
KT280013	Buj i sur. 2015	Ston
KT280027	Buj i sur. 2015	Ulcinj
KT280028	Buj i sur. 2015	Narta
KT280030	Buj i sur. 2015	Narta

MP i ML analize proveo sam pomoću računalnog programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) i MEGA 6.06 (Tamura i sur. 2007)„, pod heurističkim modelom uz 100 ponavljanja, nasumičan redosljed unošenja taksa te preklapanje grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem (eng. *tree bisection-reconnection*). Tom se metodom traži stablo najkraće topologije preraspodjeljivanjem grana na način da se prvotni kladogram podijeli na više manjih podkladograma, koji se zatim preslaguju u nova stabla. Sva mjesta kodona, kao i sve nukleotidne supstitucije, imala su jednaku težinu. Podržanost grananja, odnosno postotna vjerojatnost za svako grananje u stablu, prilikom obje rekonstrukcije utvrdio sam analizom samopodržanja (BS, od engleskog *Bootstrap analysis*), uz 1000 BS ponavljanja i 10 replika dodatnih sekvenci. Za ukorjenjenje stabala (engl. outgroup) prilikom provođenja analiza za *cyt b* koristio sam sekvencu vrste *Poeciliopsis monacha* Miller, 1960, meksičkog endema iz porodice Poecilidae, roda Cyprinodontiformes (ime sekvence: *Poeciliopsis monacha*; pristupni kod: AF047344.1; referenca: Sanjur i Vrijenhoek neobjavljeno) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Filogenetsku mrežu izradio sam metodom susjednog sparivanja (MJ) pomoću računalnog programa Network 4.5.1.6. (Fluxus Technology Ltd.) koristeći haplotipove dobivene pomoću programa DnaSP 5.10. (Librado i Rozas 2009) i sekvence iz Banke gena (Tablica 3).

4.7. Genska raznolikost

S ciljem utvrđivanja stupnja genske raznolikosti populacije izračunao sam osnovne mjere genskog polimorfizma. Ovu sam analizu proveo pomoću računalnog programa DnaSP 5.10 (Librado i Rozas 2009) na skupu podataka koji obuhvaća 28 *cyt b* sekvenci, s obzirom na to da se taj genski marker pokazao kao najbolji za opisivanje intraspecijske raznolikosti. Odredio sam sljedeće mjere: broj polimorfnih mjesta (S), ukupan broj mutacija (η), raznolikost haplotipova (Hd), prosječan broj razlika nukleotida (K) te nukleotidna raznolikost (π). Genska raznolikost vrlo je dobar pokazatelj stanja populacija i njihove sposobnosti za suočavanje s promjenama u okolišu te je važan podatak prilikom određivanja konzervacijskih mjera, kao i djelotvornih mjera zaštite.

4.8. Analiza vijabilnosti populacije

Za potrebe provedbe 4. cilja diplomskog rada proveo sam analizu vijabilnosti populacije (PVA; eng. Population Viability Analysis) korištenjem simulacijskog modela i računalnog programa Vortex 10.6.0.0 (Lacy i Pollak 2023). Ova analiza omogućuje razumijevanje determinističkih sila te demografskih, okolišnih i genetskih stohastičnih događaja na dinamiku divljih populacija. Kako bih modelirao vijabilnost populacije tijekom sljedećih 100 godina u slučaju pojačanja ili pojave novih prijetnji, priredio sam četiri scenarija.

Scenariji su opisani kako slijedi:

- SCENARIJ 0: nisu predviđene nikakve dodatne prijetnje, ali ni uklanjanje trenutnih,
- SCENARIJ 1: uključen je utjecaj invazivnih i predatorskih vrsta, bilo riba (slatkovodnih ili morskih), bilo beskralješnjaka, koje utječu na smanjenje stopu reprodukcije, ali ne povećavaju mortalitet,
- SCENARIJ 2: uključena je degradacija staništa, čime dolazi do smanjenja kapaciteta staništa, te se snižava stopa reprodukcije obrvana i povećava mortalitet,
- SCENARIJ 3: uključuje toksično cvjetanje mora u razmacima svakih 6 godina, čime se povećava mortalitet svih razvojnih stadija.

Kao prijetnje su odabrane one ugroze koje su prepoznate prilikom terenskog istraživanja, ali i pregledom literature (Anonymus 2023, Renić i sur. 2023, Jardas i sur. 2008).

Kao ulazni podaci za ovu analizu postavljene su sljedeće postavke o veličini populacije, kapacitetu staništa, mortalitetu jedinki po starosnim kategorijama te podaci o reproduktivnom sustavu i utjecaju prijetnji na preživljavanje i stopu razmnožavanja. Simulacija svakog scenarija provedena je sto puta, a izumiranje je definirano kada veličina populacije padne ispod kritične veličine koja je definirana sa sto jedinki i temeljio na 100/1000 pravilu (Frankham i sur. 2014) prema kojem je potrebno najmanje sto jedinki za ograničavanje depresije inbreedinga na 10 % tijekom 5 generacija. Uz to, postavke svih scenarija uključivale su sljedeće populacijske značajke obrvana: populacija je poligamna, 100 % svih ženki stvara potomstvo i 100 % ih se razmnožava. Populacija se sastoji od 50 % ženki i 50 % mužjaka. Ženke donose 30 000 oocita po generaciji. Nema metapopulacija i depresije inbreedinga. Jedinke su spolno aktivne od prve do četvrte godine živote, a maksimalna dob koju mogu doživjeti je šest godina.

5. REZULTATI

5.1. Morfometrijske značajke populacije

Deskriptivnom statistikom opisane morfometrijske značajke u Tablici 4 prikazane su najmanje (min), najveće (max) i srednje vrijednosti (\bar{x}), medijan i standardna devijacija jedinki unutar populacije.

Tablica 4. Najmanje (min), najveće (max) i srednje vrijednosti (\bar{x}), medijan (med) i standardna devijacija (stdev) morfometrijskih mjera mužjaka i ženki (u milimetrima).

	mužjaci					Ženke				
	min	max	\bar{x}	med	stdev	min	max	\bar{x}	med	stdev
TL	19,80	37,61	29,60	30,38	4,09	18,92	36,39	28,90	31,45	6,70
SL	15,66	30,33	24,40	24,26	4,33	15,81	29,62	23,77	25,49	5,38
aD	9,85	47,43	15,90	14,75	7,66	8,78	18,49	14,36	15,32	3,46
aP	5,62	9,89	7,84	8,04	1,06	5,75	9,64	7,98	8,35	1,46
aV	8,15	14,58	11,38	11,30	1,57	7,41	15,29	11,91	12,69	2,74
aA	9,38	18,32	14,95	15,08	2,10	9,61	19,57	15,33	16,40	3,65
dpc/h	2,65	4,88	3,72	3,80	0,53	2,48	4,72	3,66	3,91	0,77
H	3,90	7,49	5,96	5,95	0,91	3,99	8,58	6,20	6,81	1,65
lac	2,69	5,30	4,03	3,98	0,69	2,73	5,83	4,32	4,68	1,11
V-A	2,28	4,08	3,11	3,11	0,42	2,27	5,14	3,76	3,91	0,92
c	4,99	8,64	6,98	7,05	0,89	4,61	8,84	7,09	7,55	1,40
prO	1,07	3,05	1,88	1,88	0,51	1,06	2,53	1,90	2,02	0,45
Oh	1,64	3,14	2,32	2,26	0,40	1,35	2,76	2,12	2,24	0,41
io	2,32	3,95	3,07	3,02	0,43	2,10	4,19	3,09	3,31	0,72
Hco	2,92	5,72	4,65	4,72	0,72	3,01	6,05	4,69	5,09	1,09
poO	2,44	4,12	3,23	3,16	0,47	2,13	4,08	3,29	3,49	0,68
IP	3,29	6,46	4,87	4,83	0,97	2,89	6,21	4,72	4,94	1,01
IV	1,33	5,39	3,26	3,24	0,88	1,24	3,70	2,76	3,07	0,83
IDb	2,58	5,19	3,84	3,92	0,62	2,99	5,08	3,96	3,96	0,56
IAb	2,43	4,10	3,25	3,23	0,48	2,38	3,58	2,88	2,88	0,30

5.2. Korelacija tjelesnih mjera sa standardnom duljinom tijela

Korelacija izmjerenih tjelesnih mjera i standardne duljine tijela izračunata je Pearsonovim koeficijentom korelacije. Iz Tablice 5. vidi se kako je značajan broj tjelesnih mjera u korelaciji sa standardnom duljinom tijela. Nasuprot tome, nakon što je izračunat Pearsonov koeficijent standardiziranih podataka pokazalo se da više niti jedna omjer nije u značajnoj korelaciji sa SL.

Tablica 5. Pearsonov koeficijent korelacije pojedinih mjera u odnosu na standardnu duljinu za jedinice svih populacija.

	Pearsonov koeficijent
aD	0,90481
Ap	0,91682
aV	0,89957
aA	0,92877
dpc/h	0,91667
H	0,90019
lac	0,88294
VA	0,63272
c	0,91916
pro	0,76450
Oh	0,87594
io	0,86487
Hco	0,89669
poO	0,92590
IP	0,81785
IV	0,79830
IDb	0,58683
lAb	0,42578

5.3. Shapiro-Wilk test normalnosti

Proveo sam Shapiro-Wilk test na cijelom skupu podataka i rezultati su prikazani u Tablici 6. Za većinu mjera normalna distribucija podataka nije zabilježena, ($p < 0,05$), zbog čega je bila potrebna standardizacija podataka. Kako bih standardizirao podatke pretvorio sam varijable u morfometrijske omjere.

Tablica 6. Shapiro-Wilk test na nestandardiziranim tjelesnim mjerama. Ovaj test daje testnu statistiku W i p vrijednost. Mjere za koje je vrijednost p bila manja od 0,05 su podebljane.

mjera	W	p
TL	0,9197	0,0075
SL	0,9591	0,1563
aD	0,9314	0,0179
aP	0,9448	0,0503
aV	0,9621	0,1977
aA	0,9421	0,0406
dpc/h	0,9537	0,1017
H	0,9440	0,0472
lac	0,9416	0,0391
VA	0,9353	0,0241
C	0,9496	0,0737
pro	0,9683	0,3178
Oh	0,9815	0,7460
Io	0,9665	0,2764
Hco	0,9353	0,0240
poO	0,9415	0,0388
IP	0,8524	0,0001
IV	0,9259	0,0119
ID	0,7585	1,03E-06
lA	0,7434	5,42E-07

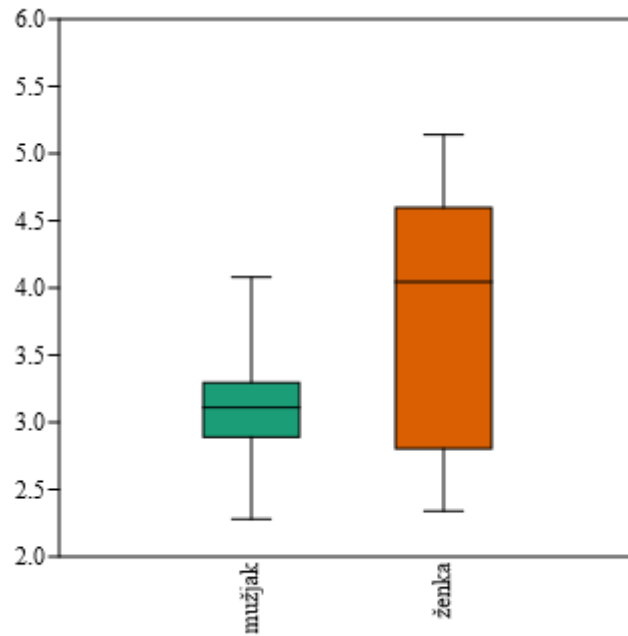
5.4. T-test

Mužjaci i ženke obrvana, razlikuju se već i na očigled prema ukupnoj veličini, ali i ostalim duljinama tijela. T-testom je potvrđeno kako se dio izmjerenih mjera statistički značajno razlikovala između mužjaka i ženki. Od 20 čistih morfometrijskih mjera njih su se dvije statistički značajno razlikovale, a od 23 morfometrijskih odnosa (neovisnima o veličini) njih se devet statistički značajno razlikovalo između mužjaka i ženki (t-test; $p < 0,05$). Rezultati t-testa morfometrijskih mjera i odnosa mužjaka i ženki prikazani su u tablicama 7 i 8.

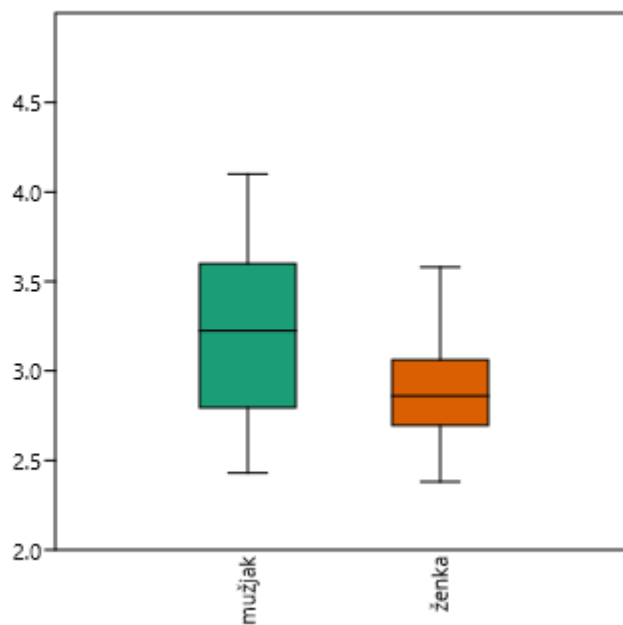
Tablica 7. T-test morfometrijskih mjera mužjaka i ženki pri razini pouzdanosti od 95 % ($p > 0,05$). Podebljane su morfometrijske mjere koje su se značajno razlikovale.

mjera	t-test	p vrijednost
TL	0,2992	0,7664
SL	0,3267	0,7457
aD	0,0783	0,9380
aP	0,4638	0,6454
aV	0,8305	0,4115
aA	0,5083	0,6142
dpc/h	0,1488	0,8825
H	0,6334	0,5303
lac	1,0785	0,2876
V-A	3,2486	0,0024
c	0,4895	0,6273
Pro	0,2239	0,8240
Oh	1,5216	0,1364
io	0,0881	0,9302
Hco	0,2839	0,7780
poO	0,3605	0,7205
IP	0,1564	0,8766
IV	1,7547	0,0876
IDb	0,6294	0,5333
lAb	2,7407	0,0097

Srednja vrijednost, standardna devijacija te raspon vrijednosti V-A vrijednosti i duljine baze podrepne peraje mužjaka i ženki, tj. morfometrijskih mjera koje se značajno razlikuju kod spolova prikazani su i standardnih Box-Whiskers dijagramima (slike 6 i 7).



Slika 6. Box-Whiskers dijagram za vrijednosti V-A udaljenosti mužjaka i ženki.



Slika 7. Box-Whiskers dijagram za duljine baza podrepne peraje mužjaka i ženki.

Tablica 8. T-test morfometrijskih omjera mužjaka i ženki pri razini pouzdanosti od 95 % ($p > 0,05$). Podebljani su morfometrijski omjeri koji su se značajno razlikovali.

mjera	t-test	p vrijednost
SL/TL	2,3966	0,0216
aD/SL	0,7345	0,4674
aP/SL	2,0195	0,0505
aV/SL	3,0174	0,0045
aA/SL	2,5632	0,0144
h/SL	0,4517	0,6540
H/SL	2,0819	0,0441
lac/SL	3,5624	0,0010
VA/SL	5,0822	0,00001
c/SL	2,1260	0,0401
prO/c	0,1149	0,9091
Oh/c	3,6719	0,0007
Io/c	1,2398	0,2226
Hco/c	0,5316	0,5981
poO/c	0,4217	0,6756
IP/SL	0,8135	0,4213
IV/SL	3,1366	0,0033
ID/SL	0,3966	0,6941
IA/SL	3,2822	0,0024
Hco/H	0,8285	0,4126
h/H	1,5426	0,1312
h/lpc	3,2553	0,0024

5.5. Filogenetska rekonstrukcija

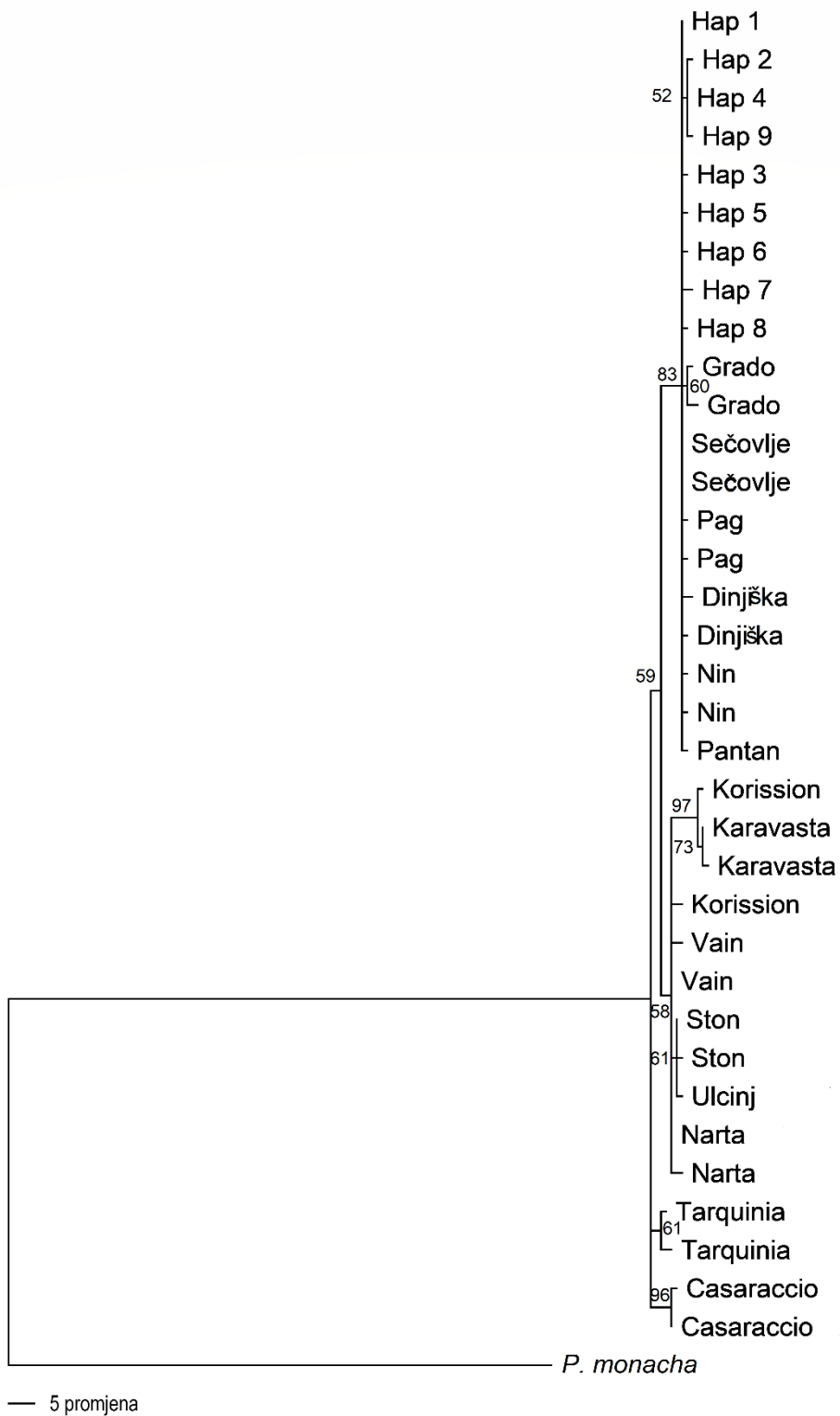
Filogenetska rekonstrukcija istraživane populacije temeljena je na sekvencama gena za citokrom *b*. Ulazni podaci za dobivanje filogenetskih stabala su sekvence duge 1103 parova baza, od kojih je 842 mjesta konstantno, a 233 varijabilno. Parsimonijski značajnih mjesta je 28, a preostalih 79 varijabilnih mjesta nisu nositelji filogenetskog signala. Analize sam proveo na ukupno 28 sekvenci dobivenih iz prikupljenih uzoraka te sam pomoću računalnog programa DnaSP 5.10 (Librado i Rozas 2009) utvrdio prisutnost 9 haplotipova. Uz tih 28 sekvenci u analizama sam radi točnijeg pozicioniranja vrste s istraživanog područja, uključio još i 26 sekvenci iste vrste iz Banke gena (Tablica 5).

Dobivena stabla (Slika 8 i Slika 9) pokazuju jednaku topologiju, a haplotipovi su se grupirali na isti način. Grane oba stabla su plitke, odnosno kratke, što može biti odraz nedavne divergencije.

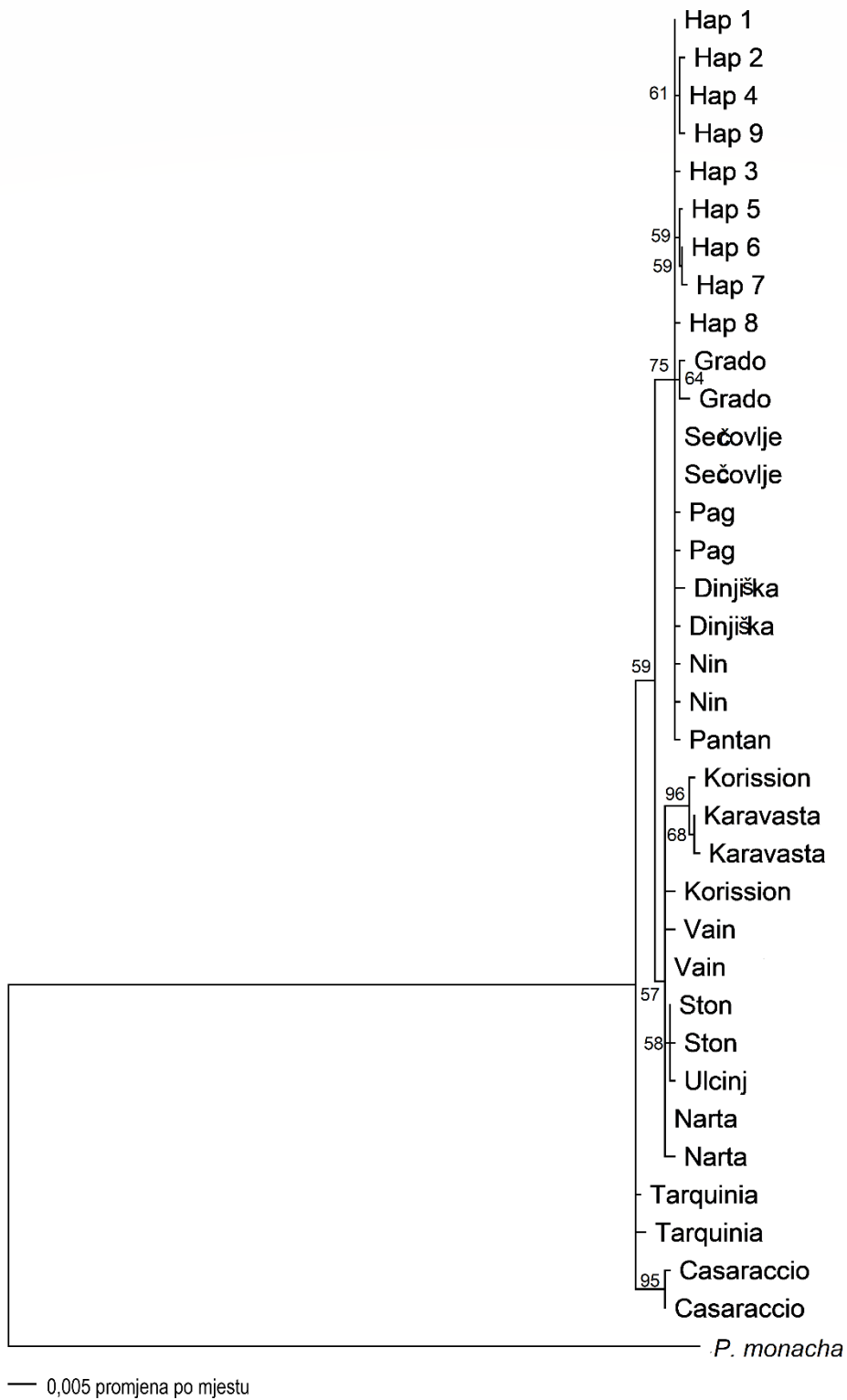
Osnovni podaci o filogenetskom stablu koje je dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) nalaze se u Tablici 9, dok je parametar (Ln) koji opisuje filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) naveden u opisu Slike 9.

Tablica 9. Podaci o filogenetskom stablu na Slici 8.

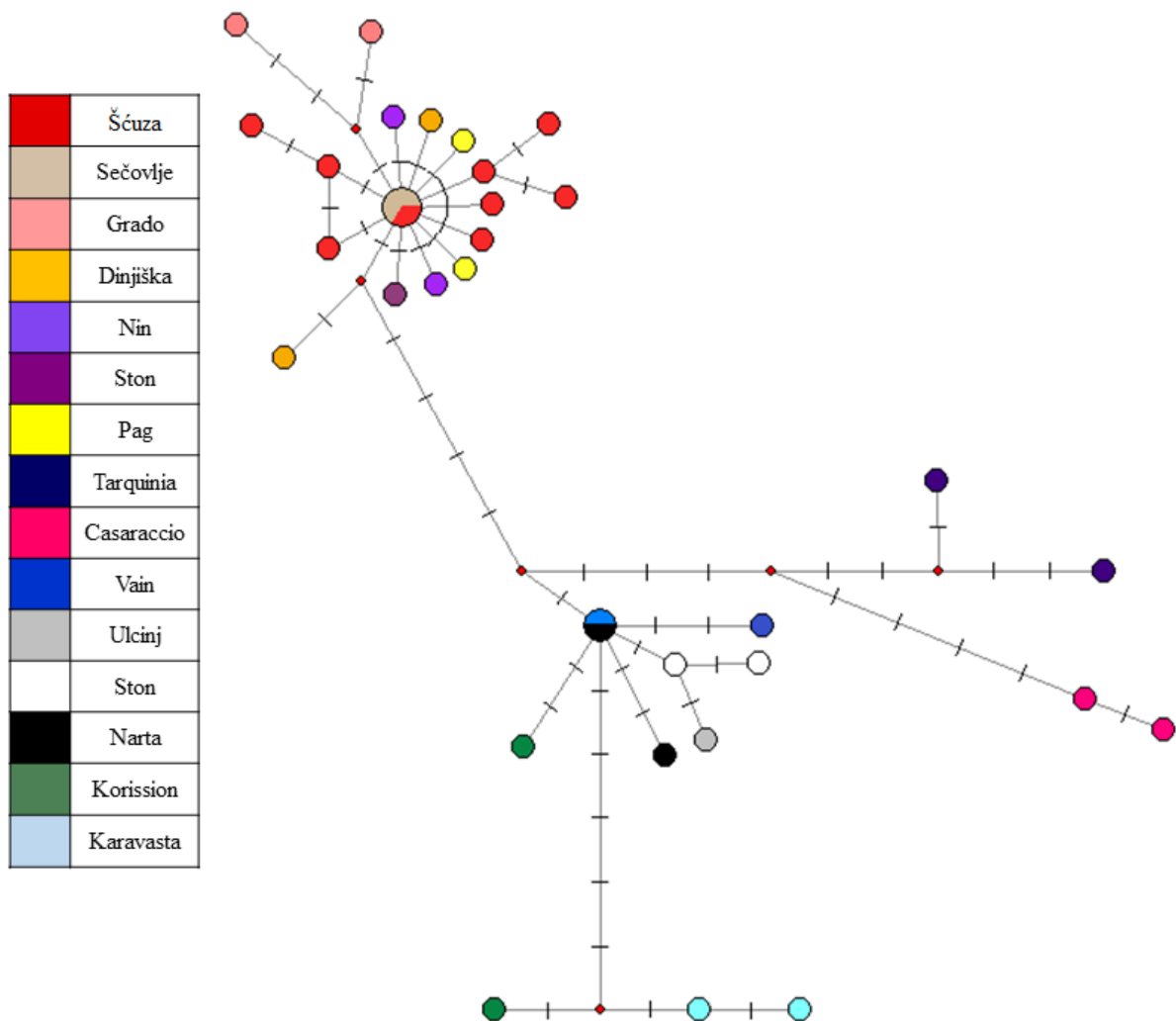
duljina stabla	283
indeks konzistencije (CI)	0,9470
indeks homoplazije (HI)	0,0530
CI bez neinformativnih mjesta	0,6939
HI bez neinformativnih mjesta	0,3061
indeks retencije	0,8729
indeks reskalirane konzistencije (RC)	0,8266



Slika 8. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju *cyt b* gena; brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.



Slika 9. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju *cyt b* gena; brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.



Slika 10. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) izrađena koristeći sekvence na temelju *cyt b* gena. Svaki krug predstavlja jedan haplotip, a lokalitet na kojem je on pronađen predstavljen je zasebnom bojom koja je pojašnjena u legendi. Duljine linija proporcionalne su broju mutacija, a crvene točke označavaju haplotipove koji nisu primijećeni u ovom istraživanju.

5.6. Genska raznolikost

Ovim istraživanjem utvrđena je umjerena intraspecijska raznolikost obrvana u uvali Šćuza, gdje je nađeno 9 haplotipova u 28 uzoraka. Također je utvrđen nizak prosječan broj razlika nukleotida. Mjere genskog polimorfizma prikazane su u tablici 10.

Tablica 10. Mjere genskog polimorfizma obrvana iz uvale Šćuza na temelju cyt *b* gena. N – broj sekvenci, h – broj haplotipova, S – broj polimorfni mjesta, Hd – raznolikost haplotipova, k – prosječan broj razlika nukleotida, π - nukleotidna raznolikost, η - ukupan broj mutacija

N	h	S	Hd	k	Π	η
28	9	6	0,632	0,937	0,00085	7

5.7. Analiza vijabilnosti populacije

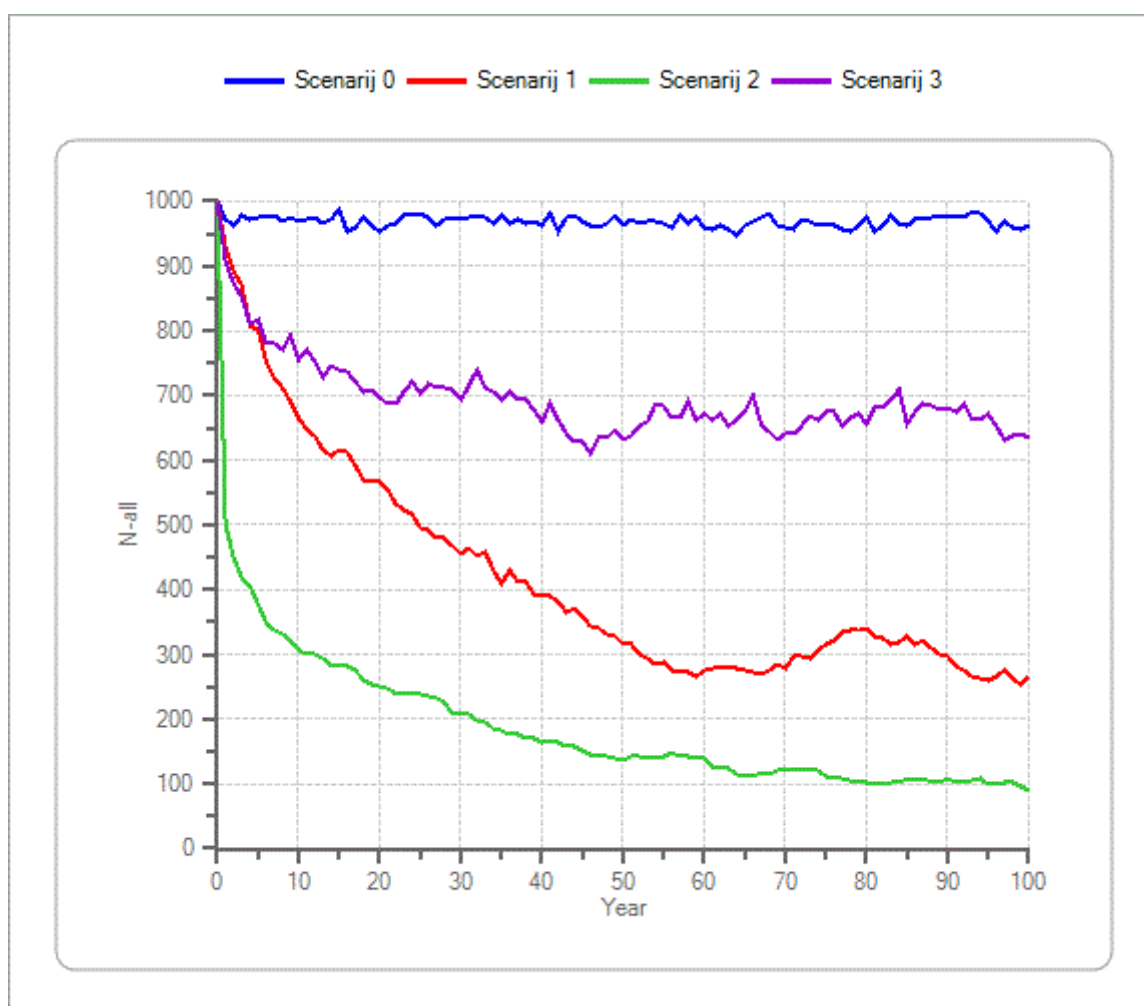
U Scenariju 0 bez ikakvih dodanih ugroza ili predviđenih katastrofa, obrvan ima održivu populaciju u kontinuitetu s malom oscilacijom u brojnosti jedinki, time je vjerojatnost izumiranja populacija svega 2 %. Uz pojavu invazivnih vrsta (Scenarij 1) predviđeno je da će se razmnožavati samo pola populacije mužjaka i da neće biti značajnije smrtnosti, što govori da bi se populacija kroz sto godina smanjila za više od 800 jedinki, ali ne bi izumrla u prvih stotinu godina. Degradacija staništa (Scenarij 2) kroz fizičke promjene i zagađenje najdrastičnije bi djelovalo na populaciju što se očituje kroz nagli pad brojnosti jedinki u prvih deset godina. Toksična cvjetanja mora (Scenarij 3) uz predviđanje njihovog pojavljivanja svakih 6 godina zbog sve većeg utjecaja klimatskih promjena, smanjilo bi veličinu populacije za otprilike 400 jedinki, ali bi ona i dalje bila održiva. Grafički prikaz kretanja veličine populacije kroz sve scenarije prikazan je na slici 11. U tablicama 11 i 12 prikazani su parametri kroz sve provedene scenarije, kako bi se jasnije vidjele posljedice pojedinog scenarija nakon prvih 50 i 100 godina.

Tablica 11. Izlazni podaci u pedesetoj godini.

	srednja veličina populacije	broj izumrlih	broj opstalih	dobivena heterozigotnost	broj alela	raznolikost haplotipova
0	969,16	0,0 %	100,0 %	0,9742	74,47	24,55
1	444,69	26,0 %	74,0 %	0,8953	32,23	10,39
2	168,89	53,0 %	47,0 %	0,8605	17,68	5,55
3	674,63	8,0 %	92,0 %	0,9342	39,15	12,92

Tablica 12. Izlazni podaci u stotoj godini.

	srednja veličina populacije	broj izumrlih	broj opstalih	dobivena heterozigotnost	broj alela	raznolikost haplotipova
0	944,48	2,0 %	98,0 %	0,9499	38,26	12,58
1	269,35	51,0 %	49,0 %	0,7724	11,80	3,90
2	101,40	68,0 %	32,0 %	0,6155	5,84	2,06
3	680,74	11,0 %	89,0 %	0,8674	17,44	5,97



Slika 11. Grafički prikaz analize vijabilnosti obrvana na temelju analiza četiri scenarija kroz sto godina (0 = bez katastrofa; 1 = invazivne vrste; 2 = degradacija staništa; 3 = toksično cvjetanje mora)

6. RASPRAVA

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati pružaju nam nove spoznaje o jednoj od populacija obrvana u Jadranu. Gubitak i degradacija staništa među glavnim su prijetnjama bioraznolikosti diljem svijeta. Ljudski pritisci uzrokuju ne samo fragmentaciju staništa, već i smanjenje kvalitete istih. Zbog povezanosti s vodenim ekosustavom u kojem žive i velikog antropogenog pritiska na njihova staništa, smatra se kako su ribe, prvenstveno slatkododne, danas najugroženija skupina kralješnjaka (Ćaleta i sur. 2015). Naime, promjene brzine rasta, brojnosti i rasprostranjenosti riba direktan su pokazatelj promjena u okolišu koje su uvjetovane degradacijom staništa, eutrofikacijom, promjenama temperature i dostupnosti hrane. Prema Facca i sur. (2020) obrvan je jedna od šest vrsta riba koje su povezane s lagunama i slanim močvarama te se mogu smatrati ekološkim bioindikatorima čija prisutnost govori o zdravlju ekosustava.

Analizirajući dužinski sastav istraživane populacije uočeno je kako najveća standardna duljina tijela iznosi 36,14 mm, a najmanja 15,66 mm. Dobivene vrijednosti ovim istraživanjem su u skladu s rezultatima drugih autora. Tako Freyhof i Yoğurtçuoğlu (2020) navode sljedeće najmanje i najveće standardne duljine tijela obrvana s pojedinih lokaliteta: 18 – 28 mm Arabax (Sardinija, Italija), 11 – 29 mm Caliegri (Sardinija, Italija), 13 – 28 mm Comacchio (Italija), 18 – 48 mm Venecija (Italija), 15 – 47 mm Bechechema (Tunis), 17 – 33 mm Meggarine (Alžir), 27 – 35 mm Pag (Hrvatska). Marčić i sur. (2015) su za populaciju s otoka Raba utvrdili vrijednosti 10,5 – 27,9 mm, a za populaciju iz Zablaća 15,6 – 31,6 mm. Englezou i sur. (2018) su utvrdili vrijednosti 14,6 – 50,1 mm za populaciju s lokaliteta Morphou (Cipar). Razlike u rasponima duljina tijela odraz su različitih ekoloških prilika u kojima populacije žive. Također, treba imati na umu kako nije jednak proučavani uzorak sa svih lokaliteta pa se konkretniji zaključci ne mogu donositi. Kod obrvana u uvali Šćuza utvrđeno je da mužjaci imaju nešto veću zabilježenu maksimalnu standardnu dužinu tijela od ženki (30,33 mm prema 29,62 mm) što nije slučaj prema literaturnim navodima (Kottelat i Freyhof 2007). No provedenim testovima je utvrđeno kako se spolovi ove populacije ne razlikuju statistički značajno u pogledu veličine tijela te je razlog vjerojatnog ulova nešto većih mužjaka vrijeme uzorkovanja, budući da je u brojnim istraživanjima utvrđeno kako obrvan ima sezonski promjenjiv omjer spolova (Leonardos i Sinis 1998, Poljanić 2014, Labacci i sur. 2019, Lionetto i sur. 2023).

Osim razlika u obojenosti i ispruganosti, kao i razlike u ukupnoj i standardnoj duljini tijela, odrasli mužjaci imaju još i dvije značajke vanjskog izgleda koje omogućuju razlikovanje

mužjaka od ženki, a to su duljine leđne i podrepne peraje. Ovim istraživanjem mjerene su baze leđne i podrepne peraje jer su rubovi peraja na određenom broju jedinki bili oštećeni. Tako je ustanovljeno i na čistim mjerama i na omjerima kako se duljina baze podrepne peraje i odnos IAb/SL statistički značajno razlikuju između ženki i mužjaka (t-test, $p < 0,05$), dok se duljina baze leđne peraje nije značajno razlikovala. Uz to na oba seta podataka, mužjaci i ženke su se statistički značajno razlikovali i na temelju V-A udaljenosti (udaljenost između početka baze trbušne peraje i urogenitalne papile). Tu je razliku moguće pripisati različitim ulogama spolova prilikom reprodukcije, no tu pretpostavku treba dodatno ispitati. Nadalje, iako nisu toliko izražene, između ženki i mužjaka obrvana postoje i statistički značajne razlike u duljini trbušnih peraja (t-test, $p < 0,05$) pa se i to obilježje treba smatrati sekundarnom spolnom oznakom.

Radeći filogenetsku rekonstrukciju populaciji obrvana s istraživnog lokaliteta su utvrđeni srodstveni odnosi s ostalim populacijama. Dobivena filogenetska stabla, MP i ML, na temelju cyt *b* gena jasno prikazuju odvajanje populacija, ali s niskom vrijednošću samopodržavanja (Slike 8 i 9). Stabla su dobro strukturirana i prikazana s kratkim granama što nas upućuje na činjenicu kako nema dublje evolucijske podijeljenosti između populacija i upućuje na relativno nedavnu i brzu kolonizaciju područja rasprostranjenosti ove vrste. Osim toga uočljivo je kako je evolucijski razvoj obrvana u uvali Šćuza potekao od jednog ancestralnog haplotipa, od kojeg su se daljnjim mutacijama razvili svi ostali, a ta se tvrdnja na samom stablu očituje kroz strukturiranost. Ista se pojava očituje i na filogenetskoj mreži kroz zvjezdasti oblik.

Uočeno je grupiranje haplotipova u četiri skupine koje prate isti geografski uzorak kao u istraživanjima drugih autora (Pappalardo i sur. 2024, Langeneck i sur. 2021, Buj i sur. 2015). Haplotipovi svih skupina od susjednih su udaljene s najmanje pet mutacija, a unutar skupina ta udaljenost iznosi najviše dvije, no uglavnom je svedena na jednu mutaciju. Ranijim istraživanjima je ustanovljeno kako populacije obrvana na istočnoj obali Jadranskog mora tvore dvije skupine genski srodnih populacija. Prvoj skupini pripadaju populacije sjevernog i srednjeg, a drugoj populacije južnog Jadrana. Dokazano je kako su skupine međusobno genski različite, dok su populacije unutar svake pojedine skupine genski slične (Buj i sur. 2015). Tako se i ovim istraživanjem populacija obrvana iz uvale Šćuza smjestila u sjevernu skupinu što je jasno vidljivo na filogenetskoj mreži (Slika 10) i filogenetskim stablima. Tako su haplotipovi grupirani u sljedeće skupine: sjevernojadransku koju sačinjavaju haplotipovi s lokaliteta Grado, Sečovlje, Šćuza, Pag, Dinjiška, Nin, Pantan, južnojadransko-jonsku grupu koju čine haplotipovi s lokaliteta Ston, Ulcinj, Narta, Karavasta, Korission i tirensku grupu koju čini haplotipovi s lokaliteta Tarquinia i sardinijsku koju čini haplotip s lokaliteta Casaraccio.

Genska raznolikost istraživane populacije je umjerena. Tako rezultati ovog istraživanja potvrđuju one prethodnih studija o genskoj raznolikosti obrvana prema kojima postoji srednja haplotipska i nukleotidna raznolikost s velikim brojem privatnih haplotipova (Pappalardo i sur. 2024, Buj i sur. 2015). Uz to uočena je značajna genska homogenost što i ne iznenađuju s obzirom na rascjepkani areal te brzu izmjenu generacija i velik broj jedinki što u kratkom vremenu uvjetuje fiksaciju ili nestanak određenih haplotipova. Zbog kratkog vremena proteklog nakon kolonizacije nije došlo do razvoja većeg broja jedinstvenih haplotipova, kao ni veće raznolikosti haplotipova na pojedinim lokalitetima. Sama raznolikost haplotipa (Hd) na istraživanom lokalitetu iznosi 0,632 što je veća raznolikost od prosječne za sjevernojadransku grupu koja iznosi 0,551 i gotovo jednaka onoj u južnojadranskoj grupi gdje srednja vrijednost iznosi 0,642. Tako populacija u uvali Šćuza ima najveću gensku raznolikost u usporedbi s ostalim lokalitetima (0,182 Sečovlje; 0,571 Pag; 0,571 Dinjiška; 0,476 Nin; 0,133 Pantan; 0,455 Ston; 0,133 Ulcinj; 0,476 Narta) (Buj i sur. 2015). U istraživanju Buj i sur. (2015) veća je raznolikost zamijećena na lokalitetima koji su pretvoreni u solane i gdje je obrvan jedina vrsta ribe i nema kompeticijski pritisak, dok je u lagunama u kojima su zamijećene veća raznolikost riba imale manju gensku raznolikost. Rezultati ovog istraživanja odstupaju od tog objašnjenja budući da je uvala Šćuza raznolika ribom i predstavlja mrijestilište i rastilište brojnih morskih riba.

U oblikovanju današnje populacijske strukture i genske raznolikosti populacije obrvana u Jadranskom moru veliku ulogu imao je posljednji glacijalni maksimum (prije otprilike 18 000 godina) kada je razina mora bila 160 – 180 m niža nego danas. Tada je cijeli sjeverni dio Jadranskog bazena bio fluvio-jezerska ravnica s obalama smještenim na rubovima srednjojadranske depresije, a sjeverne granica samog Jadrana se nalazila sjeverno od linije Pantan - Lesina. Intrapopulacijska genetička divergencija većine istraživanih jadranskih populacija pleistocenskog je podrijetla, što implicira da se kolonizacija sjevernih i južnih dijelova istočnojadranskih lokaliteta nije dogodila s jednog lokaliteta nakon glacijacije, već da su populacije ostale u izoliranim dijelovima zaostale morske vode (Buj i sur. 2015).

S obzirom na to da je genska raznolikost u pozitivnom odnosu s veličinom populacije, vrste s manjom genskom raznolikošću imaju manje izgleda za preživljavanje i obratno. Taj je problem vrlo rijetko izražen kod malih prirodnih populacija koje su evolucijski prilagođene na takvu gustoću te upravo otpornost tih vrsta na promjene u okolišu proizlazi iz njihove visoke genske raznolikosti, dok se smatra kako će se populacije s umjerenom genskom raznolikošću

teže prilagoditi i oduprijeti pritiscima i prijetnjama (Buj i sur. 2020). Kako je ovim istraživanjem ustanovljeno da je genska raznolikost obrvana umjerena, provedena je analiza vijabilnosti populacije s ciljem utvrđivanja kako će potencijalne ugroze utjecati na populaciju. Analizom vijabilnosti populacije kroz sva 4 scenarija u narednih sto godina populacija će opstati unatoč oscilacijama i velikom smanjenju brojnosti jedinki u scenarijima 1 i 2. Pojava invazivnih vrsta, drastično smanjuje veličinu populacije u prvih desetak godina, ali ne izumire u prvih stotinu godina. Značajnija degradacija staništa u pogledu fizičkih promjena staništa kroz nasipavanje obala u jednom pogledu i zagađenje iz raznih izvora (slijevanje oborinskih i otpadnih voda što je trenutno uočeno kao ugroza) u drugom najdrastičnije smanjuju populaciju i dovode ju na rub izumiranja kroz sto godina. Toksična cvjetanja mora koja su karakteristična za obalne lagune izrazito variraju tijekom godina, no s trendom globalnog zagrijavanja postoji velika vjerojatnost češćeg cvjetanja i prirodne eutrofikacije gdje nastaju anoksični uvjeti koji često završavaju pomorom organizama (Bakran-Petricioli i Jakl 2007). U navedenom scenariju populacija opstaje unatoč oscilacijama u brojnosti.

Za djelotvornu zaštitu i upravljanje vrstama potrebno je što bolje poznavati njihove ekološke značajke, stanje populacija, procese koji djeluju na veličinu i rasprostranjenost populacija (Buj i sur. 2020). Kako bi se populacija obrvana iz uvale Šćuza u narednim godinama očuvala zbog jedinstvene raznolikosti i funkcija koje pružaju ekosustavu trebalo bi poduzeti konzervacijske mjere navedene u nastavku. Sve veći antropogeni pritisak na obalna područja uzrokuje progresivnu degradaciju najosjetljivijih lagunskih staništa (koja su na istočnojadranskoj obali izrazito rijetka), a neadekvatne prakse upravljanja mogu dovesti do rizika narušavanje bioraznolikosti područja (Gaertner-Mazouni i De Wit 2012, Bakran-Petricioli i Jakl 2007). Tako bi se u prvom redu trebalo regulirati nasipavanje obala kako bi se spriječilo narušavanje stanišnih uvjeta i samog staništa čija je degradacija prepoznata kao glavna ugroza populaciji obrvana. Nadalje, treba biti oprezan s mogućnošću pojave ili unosom invazivnih stranih vrsta koje vrlo brzo stvaraju stabilne populacije i imaju razne negativne učinke na nativne vrste, poglavito kroz predacijski i kompeticijski učinak (Monti i sur. 2021). Uz to, posebnu pažnju treba obratiti na tzv. lesepsijske migrante koji se sve češće uočavaju u Jadranu, a nije poznato koje sve posljedice mogu imati na nativnu faunu. Takav primjer je i vrsta srebrenopruga napuhača, *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789), koja je nedavno zabilježena u Medulinskom zaljevu, kojem pripada i uvala Šćuza.

Kako bi se bolje mogla štititi populacija obrvana, koji je izdvojen kao cilja vrste ekološke mreže HR3000174 Šćuza, izuzetno je važna provedba redovitog praćenja stanja

rasprostranjenosti i brojnosti populacije, površine i kvalitete staništa i utvrđivanje izgleda za budućnost. Tu treba posebno naglasiti nužnost prikupljanja podataka o genskoj raznolikosti koja omogućuje uvid u strukturiranost populacije te predviđanju nastanka mogućih scenarija, iako se obično ne smatraju procjenama rizika od izumiranja, mogu biti od velike pomoći u očuvanju vrsta, njihovu razvoju i odlukama o njihovoj zaštiti.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- Populacija obrvana u uvali Šćuza svojim se vrijednostima standardne i ukupne duljine tijela nije značajno razlikovala od ostalih populacija, dok se za ostale morfometrijske mjere ne može donijeti precizniji zaključak.
- Mužjaci i ženke se statistički značajno razlikuju u dvije morfometrijske mjere i devet morfometrijskih omjera.
- Populacija obrvana iz uvale Šćuza filogenetski je srodna sjevernojadranskim populacijama.
- Genska raznolikost populacije je umjerena, no nešto viša u odnosu na ostale populacije na istočnoj obali Jadranskog mora.
- S obzirom na dobivene rezultate analize vijabilnosti populacije, degradacija staništa predstavlja najveću ugrozu opstanku populacije te se u budućim planiranjima upravljanja područjem uvale Šćuza treba paziti da ne dolazi do fizičkih promjena u samom staništu u vidu nasipavanja obala i zagađenja iz raznih izvora. Također, potrebno je redovito pratiti stanje populacije kako bi se moglo aktivno djelovati na uklanjanju trenutnih prijetnji i uviđanju negativnog utjecaja potencijalnih.

8. LITERATURA

1. Agencija za zaštitu okoliša (2015): Kartiranje i procjena ekosustava i njihovih usluga u Hrvatskoj.
2. Anonymus (2023): Plan upravljanja područjima ekološke mreže Medulinski i Pomorski zaljev (PU 6067) 2023.-2032. JU Kamenjak, JU Natura Histrica, Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, Zadruga Granum Salis.
3. Bakran-Petricioli T., Jakl Z. (2007): Morska staništa: Priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska, Zagreb.
4. Bašić T., Jelić D., Miočić-Stošić J., Pjevac P., Novosel L. (2008): Ichthyofauna of the river Zrmanja with reference to salinity. 3rd International symposium of ecologists of Montenegro ISEM3, Hotel Delfin - Bijela, Herceg Novi, Montenegro.
5. Bioportal (2023): Karta obalnih i pridnenih morskih staništa. Oikon d.o.o., Institut za oceanografiju i ribarstvo, Hrvatski geološki institut, Sveučilište u Zagrebu Geodetski fakultet, Institut Ruđer Bošković, Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja.
6. Bragança P. H. N., Amorim P. F., Costa W. J. E. M. (2018): Pantanodontidae (Teleostei, Cyprinodontiformes), the sister group to all other cyprinodontoid killifishes as inferred by molecular data. *Zoosystematics and Evolution* 94(1): 137-145.
7. Buj I., Miočić-Stošić J., Marčić Z., Mustafić P., Zanella D., Mrakovčić M., Mihinjač T., Čaleta M. (2015): Population genetic structure and demographic history of *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae, Cyprinodontiformes) from hypersaline habitats in the eastern Adriatic. *Scientia marina* 79(4): 399-408.
8. Buj I., Čaleta M., Marčić Z. (2020): Očuvanje biološke raznolikosti. Udžbenik za konzervacijsku biologiju i zaštitu prirode. Prirodoslovno-matematički fakultet. Zagreb. Izrađeno u sklopu projekta ECOBIAS.
9. Cavraro F., Zucchetta M., Malavasi S., Franzoi P. (2017): Small creeks in a big lagoon: The importance of marginal habitats for fish populations. *Ecological Engineering* 99: 228-237.
10. Cavraro F., Finotti G., Rossato G., Zucchetta M., Facca C., Malavasi S. (2021): A comparative analysis of habitat quality between artificial and natural creeks in the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus*: Implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 31(6): 1311-1321.
11. Cetinić P., Swiniarski J. (1985): Alati i tehnika ribolova. Logos, Split.

12. Crivelli A. J. (1995): Are fish introductions a threat to endemic freshwater fishes in the northern Mediterranean region?, *Biological Conservation* 72(2): 311-319.
13. Crivelli A. J. (2006): *Aphanius fasciatus*. The IUCN Red List of Threatened Species.
14. 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.
15. 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.
16. Dulčić J., Kovačić M. (2020): Ihtiofauna Jadranskog Mora. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb and Institute of Oceanography and Fisheries Split: Split, Croatia.
17. Englezou C., Gücel S., Zogaris S. (2018): A new record of *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) on Cyprus: insights for conservation. *Cahiers de Biologie Marine* 59: 379-384.
18. Esmaili H. R., Teimori A., Gholami Z., Reichenbacher B. (2014): Two new species of the tooth-carp *Aphanius* (Teleostei: Cyprinodontidae) and the evolutionary history of the Iranian inland and inland-related *Aphanius* species. *Zootaxa* 3786(3): 246-268.
19. Esmaili H. R., Teimori A., Zarei F., Gholami S. (2020): DNA barcoding and species delimitation of the Old World toothcarps, family Aphaniidae Hoedeman, 1949 (Teleostei: Cyprinodontiformes). *PLoS ONE* 15(4).
20. Facca C., Cavraro F., Franzoi P., Malavasi S. (2020): Lagoon Resident Fish Species of Conservation Interest According to the Habitat Directive (92/43/CEE): A Review on Their Potential Use as Ecological Indicator Species. *Water* 12(7): 2059.
21. Franco A., Franzoi P., Malavasi S., Riccato F., Torricelli P., Mainardi D. (2006): Use of shallow water habitats by fish assemblages in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 66(1-2): 67-83.
22. Frankham R., Bradshaw C. J. A., Brook B. W. (2014): Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation* 170: 56-63.
23. Freyhof J. (2010): *Aphanius fasciatus* (Europe assessment). The IUCN Red List of Threatened Species.
24. Freyhof J., Özuluğ M., Saç G. (2017): Neotype designation of *Aphanius iconii*, first reviser action to stabilise the usage of *A. fontinalis* and *A. meridionalis* and comments

- on the family group names of fishes placed in Cyprinodontidae (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Zootaxa* 4294(5): 573-585.
25. Freyhof J., Yoğurtçuoğlu B. (2020): A proposal for a new generic structure of the killifish family Aphaniidae, with the description of *Aphaniops teimorii* (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Zootaxa* 4810(3): 421-451.
 26. Fricke R., Eschmeyer W. N., Van der Laan R. (2024): Eschmeyers's catalog of fishes: Genera, species, references.
 27. Gaertner-Mazouni N., De Wit R. (2012): Exploring new issues for coastal lagoons monitoring and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 114:1-6.
 28. Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41(41): 95-98.
 29. Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1).
 30. Helmstetter A. J., Papadopulos A. S. T., Igea J., Van Dooren T. J. M., Leroi A. M., Savolainen V. (2016): Viviparity stimulates diversification in an order of fish. *Nature Communications* 7: 11271.
 31. Jardas I., Pallaoro A., Vrgoč N., Jukić-Peladić S., Dadić V. (2008): Crvena knjiga morskih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska.
 32. Kottelat M., Freyhof J. (2007): Handbook of European Freshwater Fishes. Kottelat Cornol, Switzerland. Freyhof Berlin, Germany.
 33. Labbaci A., Lamy C., Hichem K. (2019): Age, growth and reproduction of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 in Mellah Lagoon (Eastern Algeria). *Environmental Biology of Fishes* 102: 1-12.
 34. Lacy R. C., Pollak J. P. (2023): Vortex: A stochastic simulation of the extinction process. Version 10.6.0. Chicago Zoological Society, Brookfield, Illinois, USA.
 35. Langeneck J., Englezou C., Di Maggio M., Castelli A., Maltagliati F. (2021): Phylogeography of *Aphanius fasciatus* (Osteichthyes: Aphaniidae) in the Mediterranean Sea, with a focus on its conservation in Cyprus. *Hydrobiologia* 848: 4093-4114.
 36. Leonardos I., Sinis A. (1998): Reproductive strategy of *Aphanius fasciatus* Nardo, 1827 (Pisces: Cyprinodontidae) in the Mesolongi and Etolikon lagoons (W. Greece). *Fisheries Research* 35(3): 171-181.

37. Librado P., Rozas J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
38. Lionetto M. G., Zonno V., Schiavone R., Giordano M. E., Barca A., Belmonte G., Verri T. (2023): The Mediterranean Killifish *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) (Teleostei: Cyprinodontidae) as a Sentinel Species for Protection of the Quality of Transitional Water Environments: Literature, Insights, and Perspectives. *Water* 15(15): 2721.
39. Lipej L., Kovačić M., Dulčić J. (2022): An Analysis of Adriatic Ichthyofauna—Ecology, Zoogeography, and Conservation Status. *Fishes* 7(2):58.
40. Marčić Z., Čaleta M., Buj I., Zanella D., Mustafić P., Mihinjač T., Mrakovčić M. (2015): New records of *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) along the eastern coast of the Adriatic sea in Croatia. *Croatian Journal of Fisheries* 73(3): 124-127.
41. Matic-Skoko S., Pehardam M., Pallaoro A., Franičević M. (2005): Species composition, seasonal fluctuations, and residency of inshore fish assemblages in the Pantan estuary of the eastern middle Adriatic. *Acta Adriatica* 46(2): 201-212.
42. Matic-Skoko S., Peharda M., Pallaoro A., Cukrov M., Baždarić B. (2007): Infralittoral fish assemblages in the Zrmanja estuary, Adriatic Sea. *Acta Adriatica* 48(1): 45-55.
43. Miočić-Stošić J. (2012): Genetička struktura populacija obrvana, *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1827) (Teleostei, Cyprinodontidae) uz istočnu obalu Jadranskog mora (Diplomski rad). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
44. Monti F., Marcelli M., Fastelli P., Fattorini N. (2021): Pushed to the edge: Environmental factors drive ecological responses of *Aphanius fasciatus* when in sympatry with invasive *Gambusia holbrooki*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 31(9): 2547-2559.
45. 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.
46. Mustafić P., Marčić Z., Zanella D., Čaleta M., Buj I., Horvatić S., Mrakovčić M. (2017): Ihtiofauna Parka prirode Vransko jezero // Znanstveno stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem Upravljanje jezerima i akumulacijama u Hrvatskoj i okrugli stol o aktualnoj problematici Vranskog jezera kod Biograda na Moru. Zbornik radova / Rubinić J. (ur.). Hrvatsko društvo za zaštitu voda, Zagreb.
47. Nelson J. S. (2006): *Fishes of the World* (4th edition.). New York: John Wiley and Sons, Inc.

48. Parenti L.R. (1981): A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 168: 335-557.
49. Piller K. R., Parker E., Lemmon A. R., Lemmon E. M. (2022): Investigating the utility of Anchored Hybrid Enrichment data to investigate the relationships among the Killifishes (Actinopterygii: Cyprinodontiformes), a globally distributed group of fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 173: 107482.
50. Pohl M., Milvertz F. C., Meyer A., Vences M. (2015): Multigene phylogeny of cyprinodontiform fishes suggests continental radiations and a rogue taxon position of *Pantanodon*. *Vertebrate Zoology* 65(1): 37-44.
51. Poljanić K. (2014): Biometrijske i neke biološke osobitosti obrvana, *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) (Pisces), iz Pantanske lagune. (Diplomski rad). Dubrovnik, Sveučilište u Dubrovniku, Odjel za akvakulturu.
52. Pravilnikom o obavljanju ribolova u zaštićenim područjima, posebnim staništima i područjima s posebnom regulacijom ribolova (NN 125/2020-2406, čl.22)
53. Pravilnik o proglašavanju divljih svojti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 99/09)
54. Renić N., Buj I., Novoselec L., Pleše S. (2023): Program praćenja stanja očuvanosti za vrstu *Aphanius fasciatus*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
55. Reznick D. N., Furness A. I., Meredith R. W., Springer M. (2017): The origin and biogeographic diversification of fishes in the family Poeciliidae. *PlosOne* 12.
56. Sanjur O. I., Vrijenhoek R. C. (neobjavljeno): An ancient clonal lineage revisited: mitochondrial Cytb variation in *Poeciliopsis monacha-occidentalis* (Pisces: Poeciliidae).
57. Swofford D. L. (2002): PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4 [Computer software and manual]. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
58. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007): MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24(8): 1596-1599.
59. Teimori A., Esmaeili H. R., Erpenbeck D., Reichenbacher B. (2014): A new and unique species of the genus *Aphanius* Nardo, 1827 (Teleostei Cyprinodontidae) from southern Iran: A case of regressive evolution. *Zoologischer Anzeiger* 253(4):327-337.

60. Teimori A., Esmaeili H. R., Gholami Z., Zarei N., Reichenbacher B. (2012): *Aphanius arakensis*, a new species of toothcarp (Actinopterygii, Cyprinodontidae) from the endorheic Namak Lake basin in Iran. *Zookeys* 215: 55-76.
61. Valdesalici S., Brahimi A., Freyhof J. (2019): First record of *Aphanius almiriensis* from Italy and notes on the distribution of *Aphanius fasciatus* (Teleostei: Aphaniidae). *Journal of Applied Ichthyology* 35: 541-550.
62. Van der Laan R., Eschmeyer W. N., Fricke R. (2014): Family-group names of Recent fishes. *Zootaxa* 3882(1): 1-230.
63. Yoğurtçuoğlu B., Freyhof J. (2018): *Aphanius irregularis*, a new killifish from southwestern Anatolia (Cyprinodontiformes: Aphaniidae). *Zootaxa* 4410(2): 319-330.
64. Zakon o zaštiti prirode (NN 70/05, 139/08)

ŽIVOTOPIS

Rođen sam 17. siječnja 2001. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje završio sam u OŠ Vukovina, a srednjoškolsko u Gimnaziji Velika Gorica (prirodoslovno-matematički smjer). Preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisao sam 2019. godine koji sam završio 2022. s temom „Raznolikost šuma hrasta lužnjaka u Posavini“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Antuna Alegra i stekao titulu sveučilišnog prvostupnika biologije, *univ. bacc. biol.* Iste godine upisao sam diplomski studij Ekologije i zaštite prirode, modul Kopno na istom fakultetu.

Aktivan sam član Udruge studenata biologije – BIUS u kojoj sam obnašao funkcije urednika studentskog časopisa *In Vivo*, voditelja Sekcije za šišmiše i organizatora istraživačko-edukacijskog projekta „Karin 2024“. Uz to sudjelovao sam i u drugim projektima Udruge kao što su: „Endemska ihtiofauna Čikole i Vrbe“, „Ptice vodarice Nina i Paga“, „Podzemlje Učke i Čićarije 2023.“, „Dlakavi vodič“, „Zagorje zelene 2023.“, „Istraživanje vidre (*Lutra lutra* L.) i dabra (*Castor fiber* L.) u Natura 2000 područjima HR2000465 Žutica i HR2000415 Odransko polje“, „Invazivna ihtiofauna rijeke Čikole“, „Slatkovodan ihtiofauna otoka Krka“, „Podzemlje Učke“ kroz što sam stekao iskustvo u raznim aspektima terenskog rada.

Tijekom preddiplomskog studija sudjelovao sam kao član tehničke ekipe na 10. konferenciji međunarodnog odbora za konzervaciju mahovina 2022. godine u Zagrebu. Također kao član tehničke ekipe sudjelovao sam na 7. hrvatskom botaničkom simpoziju u Zagrebu 2022. godine. Iste godine sam odradio i Laboratorijsku stručnu praksu u herbarijskoj zbirci Herbarium Croaticum.

Tijekom diplomskog studija svoje terensko iskustvo sam usavršavao kroz istraživanja šišmiša u sklopu stručnih projektima tvrtki Oikon i Geonatura te sudjelovanjem u brojnim terenskim istraživanjima slatkovodnih riba, kao i u ihtiološkim konzervacijskim projektima kao što su: „Uklanjanje invazivnih ribljih vrsta u Nacionalnom parku Plitvička jezera“, „Obnova populacije potočne pastrve“, „Improve River Life“ te „Usluga razvoja programa praćenja za vrste i stanišne tipove od interesa za EU“.