

Morfološka i genska karakterizacija populacije velike pliske (*Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat, 2007) u Hrvatskoj

Konjuh, Rebecca

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:240936>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-06**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Rebecca Konjuh

MORFOLOŠKA I GENSKA KARAKTERIZACIJA POPULACIJE VELIKE PLISKE
(*Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat, 2007) U HRVATSKOJ

Diplomski rad

Zagreb, 2018

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

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ivani Buj te suvoditelju dr. sc. Zoranu Marčiću na strpljenju, savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima koji su mi uz velika odricanja omogućili studiranje i bili uz mene u najljepšim ali i najtežim trenutcima. Najveću zaslugu za moj uspjeh pripisujem njima.

Hvala mojoj sestri Nikolini i Marinu.

Hvala mojoj kolegici Eleni uz koju su mi dani u Zagrebu bili ispunjeni radošću i veseljem te koja mi je vječna potpora u životu.

Na kraju, hvala mom dečku Nikši na strpljenju i podršci tijekom studiranja.

Ovaj diplomski rad posvećujem svom ocu koji će mi zauvijek biti najveći oslonac u životu. Bilo to na nebu ili na Zemlji...

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Morfološka i genska karakterizacija populacije velike pliske (*Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat, 2007) u Hrvatskoj

Rebecca Konjuh
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Vrsta *Alburnus sarmaticus* u Europi obitava u rijekama Južni Bug i Dniepr u Ukrajini, rijeci Dunav u Rumunjskoj i najvjerojatnije u Bugarskoj. Jedna posve izolirana populacija nastanjuje rijeke Kupu, Mrežnicu i Dobru (Hrvatska i Slovenija). U ovo istraživanje uključene su jedinke s navedena tri lokaliteta u Hrvatskoj. Kako bi opisala morfološke i genske karakteristike ove populacije u Hrvatskoj te odredila razinu interpopulacijske i intrapopulacijske raznolikosti u istim značajkama, koristila sam morfometrijske i filogenetske analize. Morfometrijske analize su uključivale mjerenje pojedinih duljina na tijelu riba, njihovu statističku obradu i uspoređivanje. Najveću duljinu tijela imala je populacija iz Dobre, a najmanju populacija iz Kupe. Broj šipčica se razlikovao među populacijama. Najviše ljustaka u bočnoj pruzi imala je populacija iz Kupe. Analizom varijance utvrđena je razlika između uzoraka jedinki svih populacija u 18 omjera. Analizom glavnih komponenta uočeno je blago izdvajanje populacije iz Kupe i preklapanje populacija iz Dobre, Mrežnice i Dunava. Filogenetske analize provela sam metodom najveće parsimonije i metodom najveće vjerojatnosti pomoću programa MEGA. Dobivena filogenetska stabla rezultirala su sličnom topologijom i dobrom podržanošću vanjskih grananja. Sekvence velike pliske izdvojile su se u zasebnu, monofiletsku liniju, koja predstavlja sestrinsku liniju ostalim vrstama roda *Alburnus* i potvrđuje njihovu nezavisnu evoluciju.

(50 stranica, 8 tablica, 10 slika, 45 literarnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Alburnus sarmaticus*, morfologija, meristika, filogenija, Hrvatska

Voditelj: dr. sc. Ivana Buj, doc.

Ocjenitelji:

dr. sc. Ivana Buj, doc.

dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc.

dr. sc. Ivana Šola, doc.

Rad prihvaćen: 01.03.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Morphological and genetic characterization of shemaya population (*Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat, 2007) in Croatia

Rebecca Konjuh
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Alburnus sarmaticus species is represented in Europe in the rivers South Bug and Dniepr in Ukraine, the river Danube in Romania and most likely in Bulgaria. One completely isolated population inhabits the rivers Kupa, Mrežnica and Dobra (Croatia and Slovenia). Included in this research are individuals from these three sites in Croatia. In order to describe the morphological and genetic characteristics of this population in Croatia and determine the level of interpopulation and intrapopulation diversity in genetic and morphological features, I used morphometric and phylogenetic analyzes. Morphometric analyzes included measuring specific individual lengths on the fish body and their statistical processing and comparison. The population from Dobra river had the largest body length and the population from Kupa river had the smallest. The number of spines differed among the populations. Population from Kupa river had the most scales in a lateral line. The variance analysis confirmed the difference between the samples of all populations in 18 proportions. Analysis of the main components showed a slight separation of populations from Kupa river and overlapping populations from Dobra, Mrežnica and Danube rivers. Phylogenetic analyzes were performed by the maximum parsimony and the maximum likelihood methods using the MEGA program. Phylogenetic trees which were obtained showed a similar topology and a good support of the outer branches. Shemaya sequences made a separate, monophyletic lineage in phylograms, sister lineage to all the remaining *Alburnus* species, which corroborates its separate evolutionary history.

(50 pages, 8 tables, 10 figures, 45 references, original language: hrvatski)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: *Alburnus sarmaticus*, morphology, meristic, phylogeny, Croatia

Supervisor: dr. sc. Ivana Buj, doc.

Reviewers:

dr. sc. Ivana Buj, doc.

dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc.

dr. sc. Ivana Šola, doc.

Thesis accepted: 01.03.2018.

Sadržaj

1 UVOD.....	1
1.1 Raznolikost riba Hrvatske.....	1
1.2 Razlozi ugroženosti slatkovodnih riba Hrvatske	2
1.3 Taksonomski položaj roda <i>Alburnus</i>	3
1.4 Velika pliska (<i>Alburnus sarmaticus</i> Freyhof & Kottelat, 2007).....	5
2 CILJ ISTRAŽIVANJA.....	6
3 PODRUČJE ISTRAŽIVANJA.....	6
4 MATERIJALI I METODE	9
4.1 Materijali.....	9
4.2 Metode.....	9
4.2.1 Ulov riba, uzimanje i konzerviranje uzoraka.....	9
4.2.2. Morfometrijske analize	12
4.2.3. Merističke analize	16
4.3. METODE MOLEKULARNE GENETIKE	18
4.3.1. Izolacija DNA	18
4.3.2. Lančana reakcija polimerazom	19
4.3.3. Pročišćavanje produkata reakcije PCR	20
4.3.4. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu.....	21
4.3.5. Sekvenciranje	21
4.3.6. Analiza sekvenci	22
5 REZULTATI	26
5.1 Morfometrija.....	26
5.2 Meristika	29
5.2.1 Šipčice u perajama	29
5.2.2 Ljuske	30
5.2.3 Ždrijelni zubi.....	30
5.3 Statističke analize omjera	31
5.3.1 ANOVA – morfometrijski omjeri	31
5.3.2 Analiza glavnih komponenta morfometrijskih omjera	33
5.4 Filogenetska analiza	35
5.4.1 DNA polimorfizam istraživanih populacija	35

5.4.2 Rezultati filogenetske rekonstrukcije metodom maksimalne parsimonije (MP).....	36
5.4.3 Rezultati filogenetske rekonstrukcije metodom najveće vjerojatnosti (ML).....	37
6 RASPRAVA	39
6.1 Morfometrija.....	39
6.2 Meristika	41
6.3 Filogenija	41
7 ZAKLJUČAK	43
8 LITERATURA.....	44
9 ŽIVOTOPIS	49

1 UVOD

1.1 Raznolikost riba Hrvatske

Slatkovodna ihtiofauna Hrvatske izrazito je raznolika s obzirom na broj vrsta, a posebno endemskih, zbog čega se Hrvatska smatra jednom od ihtiološki najraznolikijih zemalja Europe. Bogatstvo vrsta posljedica je zemljopisnoga položaja Hrvatske, koji obuhvaća dva riječna slijeva: crnomorski i jadranski, ali i složene geološke prošlosti te izoliranosti rijeka jadranskog slijeva (Ćaleta i sur., 2015).

Crnomorski slijev nastanjuje 81 vrsta riba (62 vrste nastanjuju samo taj slijev, a 19 vrsta oba slijeva), od kojih je 12 endemskih. Autohtono je 68 vrsta, a ostalih su 13 alohtone vrste, unešene u prošlom stoljeću. U jadranskom slijevu živi 88 vrsta riba (69 vrsta naseljava samo taj slijev, a 19 oba slijeva) (Ćaleta i sur., 2015).

U vodotoke jadranskog slijeva unešeno je 14 alohtonih vrsta i niz vrsta koje primarno naseljavaju crnomorski slijev. Rijeke ovog slijeva su kratke i izolirane, što je velika razlika u odnosu na rijeke crnomorskog slijeva. Vrlo često teku kroz duboke kanjone stvarajući slapove i jezera. Kada prolaze kroz krška polja, obale su im mjestimično pliće, a dna korita mekana i obrasla bujnom vodenom vegetacijom. Obiluju vodom u jesenjem i proljetnom razdoblju, a ljeti mogu posve presušiti. Upravo takvi specifični ekološki i stanišni uvjeti u kombinaciji sa zanimljivom geološkom prošlošću čine ovo područje ihtiološki neprocjenjivim. U jadranskom slijevu živi čak 38 endemskih vrsta riba (Ćaleta i sur., 2015).

U našim slatkim vodama živi 150 vrsta riba, od kojih 21 vrsta boravi i u boćatim i slanim vodama. Po ukupnom broju slatkovodnih ribljih svojti Hrvatska zauzima drugo mjesto u Europi, iza Turske čiji je teritorij znatno veći (Mrakovčić i sur., 2006).

1.2 Razlozi ugroženosti slatkovodnih riba Hrvatske

Utjecaj čovjeka na različite vodene ekosustave je velik no posljedice tog djelovanja nerijetko su podcijenjene. Mijenjanje značajki ekosustava rezultira promjenama unutar zajednice riba. Posljednjih je stotinjak godina čovjek svojim intenzivnim djelovanjem na vodena staništa uzrokovao velike promjene zajednica riba, pa su danas slatkovodne ribe jedna od najugroženijih skupina kralješnjaka. Mnoge, nekada uobičajene vrste, su danas gotovo nestale ili su se njihove populacije jako smanjile. Promjene u sastavu populacija i raznolikosti vrsta naglašen su signal koji ukazuje da se u vodenom ekosustavu dogodila značajna i, u pravilu, dugotrajna promjena jednoga ili više čimbenika. Pri tome su naročito u opasnosti rijetke, osjetljive i endemske vrste (Ćaleta i sur., 2015).

Brojni čimbenici utječu na populacije riba na različite načine, a njihovo djelovanje često ima sinergistički učinak. Riba su vrlo osjetljive na promjene staništa, poput izmjene brzine toka i pregradnje rijeka te zagrijavanje i intenzivno iskorištavanje vode (Descy i Empain, 1984). Najveći utjecaj na riblje zajednice u Hrvatskoj ima unos alohtonih vrsta, onečišćenje, regulacija vodotoka i degradacija staništa. Ostali čimbenici, poput izgradnje brana i hidroakumulacija, potrebe za tehničkom i pitkom vodom, prelov, turizam i sl. također utječu na riblje zajednice (Mrakovčić i sur., 2006).

U Crvenoj knjizi slatkovodnih riba Hrvatske nalazi se 90 vrsta i podvrsta u različitim kategorijama kritičnosti. Iz naših je voda izumrlo šest vrsta riba – 4 vrste iz dunavskog i dvije iz jadranskog slijeva. Iz dunavskog slijeva nestale su moruna, jesetra, sim i pastruga, a iz jadranskog slijeva atlantska jesetra i gatačka gaovica. U budućnosti bi se ove brojke mogle i znatno povećati, s obzirom na to da se 14 vrsta riba smatra kritično ugroženima. Najvećim dijelom to su endemske vrste jadranskog slijeva i, ako se ne poduzmu mjere zaštite, mogle bi nestati iz naših vodotoka. Ugroženo je 20 vrsta riba, a 29 je osjetljivo (Mrakovčić i sur., 2006).

1.3 Taksonomski položaj roda *Alburnus* Rafinesque, 1820

Carstvo: Animalia (životinje)

Koljeno: Chordata (svitkovci)

Potkoljeno: Vertebrata (kralješnjaci)

Razred: Actinopterygii (zrakoperke)

Red: Cypriniformes (šaranke)

Porodica: Cyprinidae (šarani)

Rod: *Alburnus*

Daleko najveća i najuspješnija skupina riba su Actinopterygii (zrakoperke). Danas postoji preko 44 redova, 453 porodica s 4289 rodova i preko 26891 vrsta opisanih unutar ovog razreda, ali kako istraživanja napreduju, mijenja se i taksonomija i broj poznatih vrsta (Nelson, 2006). Šaranke (lat. Cypriniformes) red su riba iz razreda zrakoperki s najvećom rasprostranjenosti u jugoistočnoj Aziji, dok prirodno nisu rasprostranjene samo u Australiji i Južnoj Americi. Red sadrži šest porodica, 321 rod s oko 3268 vrsta (Nelson, 2006). Posebnost riba iz ovog reda je što posjeduju sustav koščica tzv. Weberov aparat koji omogućuje prenošenje zvuka povezujući plivaći mjehur i unutrašnje uho (Berra, 2001). Weberov uređaj, po postanku, čine odijeljeni dijelovi četiri ili pet prednjih kralješaka koji omogućuju ovim životinjama bolji sluh, koji je posebice koristan noću ili u mutnim vodama. Možda su upravo zato šaranke dominantne u plitkim, slatkim vodama, te ih nema u morskim staništima. Weberov aparat služi za izbjegavanje predatora, ima ulogu u ponašanju te pomaže kod grupiranja jedinki iste vrste (Billard, 1999). Jedna od karakteristika vrsta iz ovoga reda je to što nikada nemaju zube u ustima, a najčešće imaju produživu gornju čeljust. Većinom nemaju ljuske na području glave; imaju 3 branhiostegalne šipčice; većinom nemaju masnu peraju te obično imaju bodljaste šipčice u leđnoj i podrepornoj peraji (Nelson, 2006).

Dvije trećine vrsta iz reda šaranki čini porodica Cyprinidae (šarani) koja dominira slatkim vodama Sjeverne Amerike, Afrike i Euroazije (Nelson, 2006). Neke vrste su nakadno unešene i na Madagaskar, u Australiju, Novi Zeland i Južnu Ameriku gdje porodica nije prirodno rasprostranjena (Kottelat i Freyhof, 2007). To je najveća porodica uglavnom slatkovodnih riba s oko 2100 vrsta (Kottelat i Freyhof, 2007) koje se međusobno razlikuju po obliku tijela, načinu života i staništu u kojem žive. Pripadnici ove porodice (kao i cijeli red kojemu ona pripada), od ostalih skupina riba razlikuju se po tome što nemaju zube u čeljustima, ali imaju ždrijelne zube (Kottelat i Freyhof, 2007). Posebnost ove porodice jest i tolerancija na velike temperaturne raspone, a mnoge vrste dobro podnose i fluktuacije u količini otopljenog kisika u vodi (Billard, 1999). Kada je prehrana u pitanju, ova porodica iznimno je raznovrsna te se hrani na svim trofičkim nivoima. Ovisno o vrsti, hrane se biljkama, fitoplanktonom, zooplanktonom, zoobentosom, detritusom, te čak i drugim ribama (Billard, 1999).

Rod *Alburnus* pripada potporodici Leuciscinae, koja čini najveću europsku potporodicu ciprinida, a osim u Europi, rasprostranjena je i u sjevernoj Africi, sjevernoj Aziji i Sjevernoj Americi. Njezine predstavnike ne nalazimo u južnim, tropskim dijelovima Afrike i Azije (Kottelat i Freyhof, 2007). Skupina Leuciscinae razlikuje se od ostalih potporodica po tome što imaju kratku leđnu peraju čija zadnja nerazgranata šipčica nije nazubljena niti nalik na bodlju; nemaju brčice; ždrijelni zubi su im obično u jednom ili dva reda. Najveća raznolikost im je u zapadnom Palearktiku gdje je mnogo endemskih rodova. Prema fosilnim dokazima, Europu su kolonizirali iz istočne ili središnje Azije tijekom oligocena došavši do iberskog poluotoka u kasnom oligocenu - ranom miocenu (Sanjur i sur., 2003). Odnosi unutar skupine Leuciscinae su još uvijek daleko od razrješenja pa su mnoge vrste premještane tijekom zadnjih desetljeća (Kottelat, 1997).

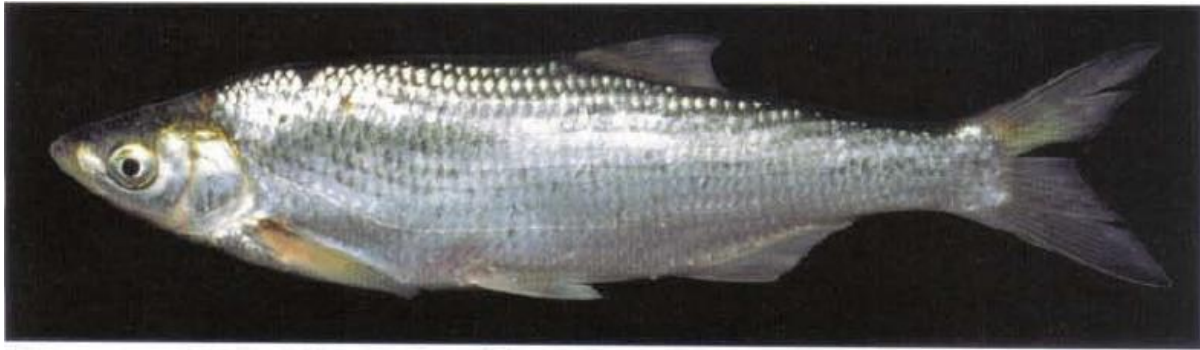
1.4 Velika pliska (*Alburnus sarmaticus* Freyhof & Kottelat, 2007)

Do nedavno se smatralo da samo dvije vrste roda *Alburnus* nastanjuju europske vode (Kottelat, 1997): *Alburnus albidus* (Costa, 1838) u Jadranskom moru i *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758) u drugim dijelovima Europe. Međutim, različiti autori su prepoznali brojne vrste (Vuković i Ivanović, 1971; Dimovski i Grupče, 1975; Oliva i sur., 1998). Na temelju radova Bogutskaya (1997), Bogutskaya i Naseka (2004), kao i sistematike Kottelat i Freyhof (2007), rodovi *Alburnus* (uklije) i *Chalcalburnus* su spojeni u jedan rod, *Alburnus*. Ranija razlika između ova dva roda se temeljila na ventralnom grebenu na kojemu je bilo ili nije bilo ljuski, broju i veličini škržnih šipčica, te stupnju nazubljenosti ždrijelnih zubi.

Velika pliska (*Alburnus sarmaticus* Freyhof i Kottelat, 2007) (Slika 1) u Europi obitava u rijekama Južni Bug i Dniepr u Ukrajini, rijeci Dunav u Rumunjskoj i najvjerojatnije u Bugarskoj. Jedna posve izolirana populacija nastanjuje rijeke Kupu, Mrežnicu i Dobru (Hrvatska i Slovenija), te se vjeruje da je u ostatku dunavskog slijeva izumrla u posljednjih 50-100 godina (Kottelat i Freyhof, 2007).

Postoje polu-anadromne i riječne populacije. Anadromne populacije počinju ulaziti u rijeke u jesen i kreću uzvodno u zimu i/ili proljeće. Nakon mriješćenja, odrasli se vraćaju natrag u donje dijelove rijeka, gdje se hrane. Mlade jedinke migriraju u rijeke u jesen iste godine ili sljedećeg proljeća. U ranom i srednjem 20. stoljeću došlo je do znatnog pada populacija ove vrste zbog izgradnje brana koje su spriječile dostizanje mrijestilišta (Kottelat i Freyhof, 1972).

Velika pliska može tolerirati salinitete i do 12 ‰. Odrasli se hrane pretežno planktonskim rakovima, kopnenim kukcima i malom ribom, dok se ličinke i mlađ hrane zooplanktonom, algama te ličinkama insekata.



Slika 1. Prikaz vrste *Alburnus sarmaticus* na kojemu se dobro vidi vanjski izgled jedinke

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

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi ovog rada su:

- (i) Opisati morfološke i genske karakteristike populacija vrsta *A.sarmaticus* u Hrvatskoj,
- (ii) Utvrditi filogenetski položaj i srodstvene odnose populacije velike pliske u Hrvatskoj u odnosu na srodne vrste
- (iii) Usporediti rezultate dobivene morfometrijskim i filogenetskim metodama s literaturnim podacima iste vrste u drugim područjima,
- (iv) Odrediti razinu interpopulacijske i intrapopulacijske raznolikosti u genetskim i morfološkim značajkama.

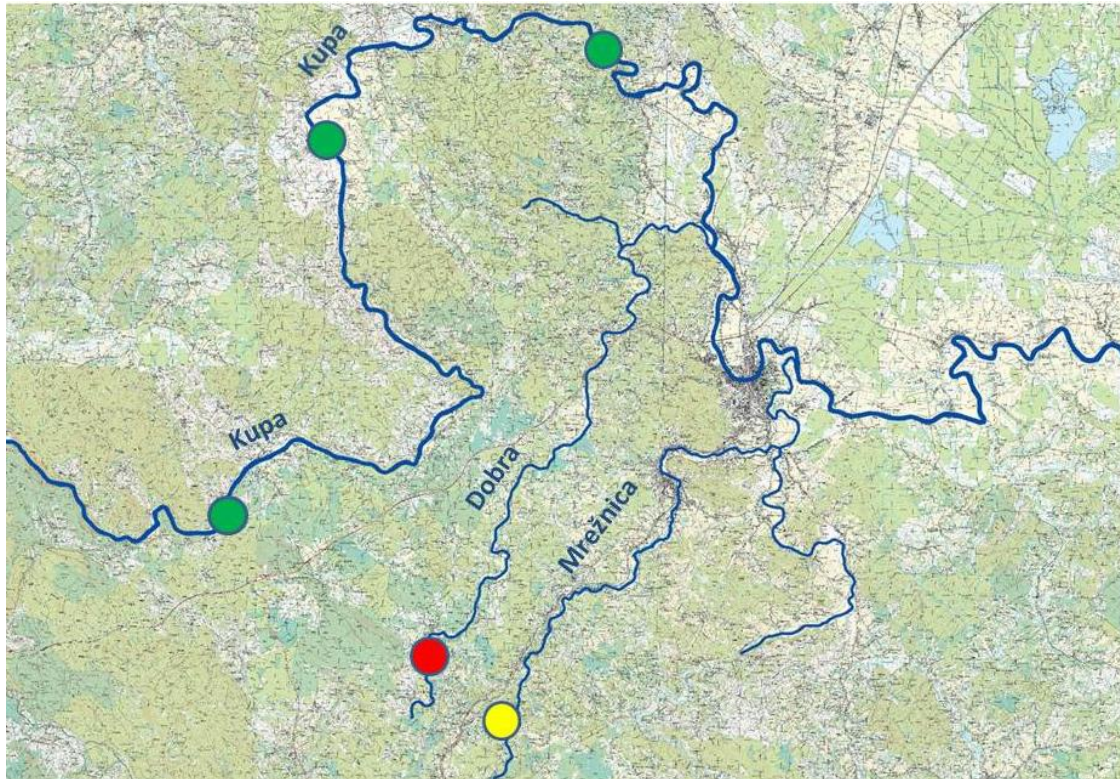
3 PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Područja s kojih su prikupljene jedinke ovog istraživanja su rijeke Kupa, Dobra, Mrežnica i Dunav. Osim vrste *A. sarmaticus* uzorkovane u rijekama Kupa, Dobra i Mrežnica, u istraživanje je uključena i znatno zastupljenija vrsta koja pripada istom rodu, *Alburnus alburnus* (Slika 2, Slika 3).

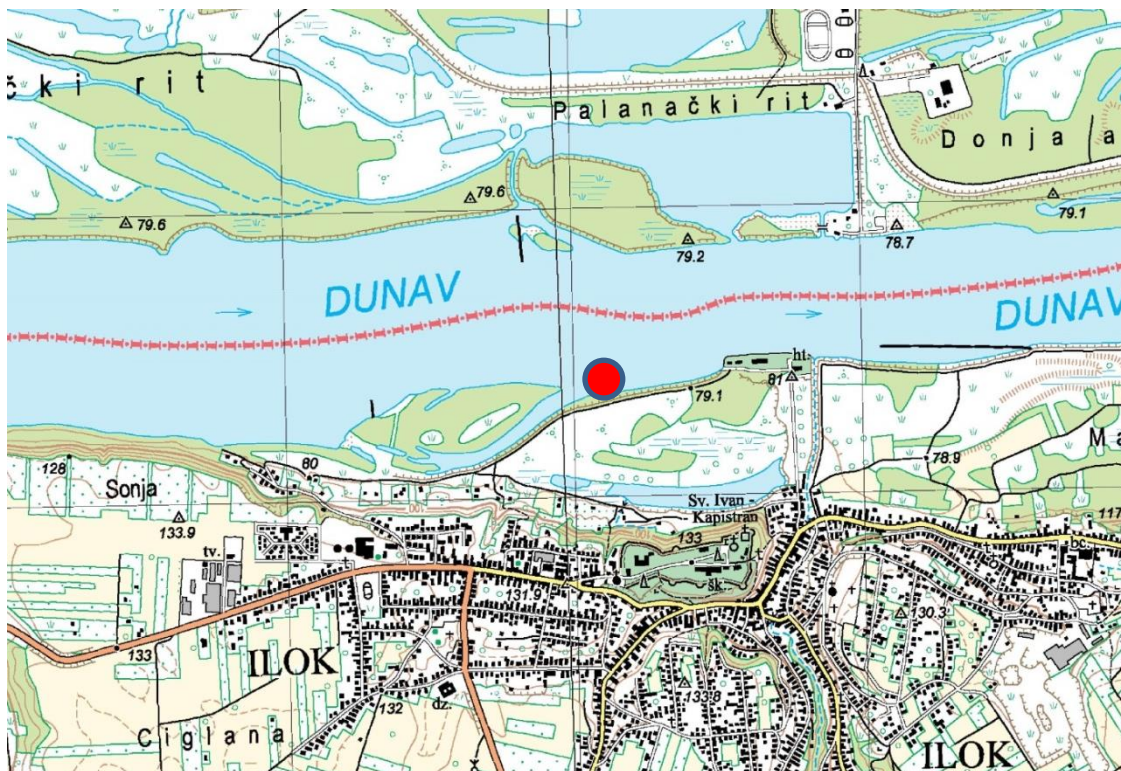
Rijeka Kupa izvire iz krškog jezerca u Nacionalnom parku Risnjak kod mjesta Razloge u Gorskom kotaru. Oko 100 metara nizvodno s desne strane prima vodu povremenog bujičnog potoka Krašićevica, a dalje s lijeve strane povremenog toka Sušice i skreće prema sjeveroistoku, te zatim prema sjeveru. Ukupna dužina toka rijeke Kupe iznosi 296 km. U salmonidnom gornjem dijelu rijeke Kupe možemo pronaći vrste poput potočne i kalifornijske pastrve, lipljana i mladice. U srednjem toku obitavaju vrste podust, mrena, klen, plotica i mladica. U donjem toku se nalaze šaran, som, štika, grgeč, deverika, jez, te ostale ciprinidne vrste nizinskih voda dunavskog sliva (www.gorskikotar.hr). Na ovoj rijeci je izgrađena mala hidroelektrana Ozalj.

Rijeka Dobra je specifična i jedinstvena rijeka ponornica u Hrvatskoj. Izvire u selu Gornja Dobra kraj stare ceste Zagreb - Rijeka. Duljine je 107,9 km i porječja površine 900 km². Bogata je ihtiofaunom. Dobra se sastoji od tri različita dijela toka. Od izvora do Đulinog ponora u Ogulinu ima naziv Gornja Dobra ili Ogulinska Dobra, te duljinu od 51,2 kilometra. Nakon poniranja prolazi podzemljem kroz špiljski sustav Đula - Medvednica (najveći špiljski sustav u Hrvatskoj, dugačak preko 16 kilometara), te ponovno izvire kraj sela Gojak, po kojem se nekad naziva i Gojačka Dobra, te se koristi za hidroelektranu (HE) Gojak. Poslije HE Gojak naziva se uglavnom Donja Dobra te nakon 52,1 kilometra toka utiče u Kupu uzvodno od Karlovca. Rijeka Dobra pritoka je rijeke Kupe (Anonimus, 2009). Uzorkovanje vrste *A. sarmaticus* izvršeno je na lokaciji Lešće.

Rijeka Mrežnica relativno je mala rijeka, lijevi je pritok rijeke Korane, a teče kroz krško područje. Izvire kod Slunja u Kordunu, a ulijeva se u Koranu kod Karlovca. Cijelim svojim tokom Mrežnica teče kroz Hrvatsku, dužina nadzemnog toka je 64 km, a površina porječja 1076 km². Dolina Mrežnice formirana je u zoni plitkog krša koja je poznata po mnogim krškim vrelima, ponorima i ponornicama. Prosječna dubina Mrežnice iznosi 2,3 m (Hršak i sur., 2010). Na lokaciji Generalski Stol izvršeno je uzorkovanje vrste *A. sarmaticus*.



Slika 2. Lokacije na kojima je uzorkovana vrsta *A. sarmaticus* (Kupa-zeleno; Dobra-crveno; Mrežnica-žuto)



Slika 3. Lokacija na rijeci Dunav pokraj Iloka na kojoj je uzorkovana vrsta *A. alburnus*

4 MATERIJALI I METODE

4.1 Materijali

U ovo istraživanje uključeno je ukupno 25 jedinki vrste *A. sarmaticus* prikupljenih na 5 lokaliteta (Slika 2) na tri rijeke (Tablica 1) koje predstavljaju područje rasprostranjenosti ove vrste u Hrvatskoj. Sve jedinke su analizirane morfološki, a metodama molekularne filogenije analizirano je 5 jedinki iz rijeke Kupe i 6 iz Mrežnice. Sekvenciranje preostalih jedinki nije bilo uspješno. Osim jedinki ove vrste, a s ciljem utvrđivanja srodstvenih odnosa i valorizacije interpopulacijske raznolikosti, u istraživanje je uključeno i 20 jedinki *A. alburnus* prikupljenih u rijeci Dunav (Slika 3, Tablica 1).

Tablica 1. Broj jedinki ulovljenih na pojedinoj postaji

Vrsta	Rijeka	broj jedinki
<i>Alburnus sarmaticus</i>	Kupa	7
<i>Alburnus sarmaticus</i>	Dobra	4
<i>Alburnus sarmaticus</i>	Mrežnica	14
<i>Alburnus alburnus</i>	Dunav	20

4.2 Metode

4.2.1 Ulov riba, uzimanje i konzerviranje uzoraka

Pri prikupljanju uzoraka korištena je metoda elektroribolova pri čemu je korišten ledni elektroagregat. Ovom metodom se ribe ne usmrćuju već se mogu žive donijeti do akvarija te se na istim jedinkama može vršiti više analiza. Velika prednost ove metode je i efikasnost jer se u relativno kratkom vremenu može prikupiti reprezentativan uzorak zbog slabe selektivnosti na veličinu i spol jedinki. To je vrlo korisno jer se može proučavati morfologija i genetika posve istih jedinki. Osim toga, na taj način je dovoljno uzeti znatno manji uzorak, a kako se radi o endemičnim i ugroženim vrstama, ta je činjenica izuzetno bitna (Buj, 2010).

Elektroribolov je metoda koja funkcionira na principu korištenja električnog polja za lov riba. Koristi se u plitkim rijekama, potocima i jezerima za utvrđivanje strukture populacije, istraživanje zdravstvenog stanja populacije riba, označavanje, te eliminaciju nepoželjnih vrsta (Reynolds, 1996). Oprema se sastoji od tri glavna dijela: izvora struje, pretvarača i elektroda. Izvor struje proizvodi dvofaznu ili trofaznu izmjeničnu struju, a jačina proizvedene energije određena je električnom provodljivošću vode. Pretvarač pretvara struju iz izmjenične u istosmjernu, koja je manje štetna za ribe. Elektrode se sastoje od dva dijela, pozitivne elektrode (anoda) u obliku obruča na kojem je mreža i negativne elektrode (katoda) uronjene u vodu, koje provode napon i tok struje kroz vodu. U vodi se stvara električno polje koje izaziva specifične odgovore kao što su npr. grčenje repne peraje, elektrotaksija (kretanje organizama u smjeru djelovanja električne struje), prisiljeno plivanje, narkoza, tetanus i drugi (Kolz, 2006). Zbog elektrotaksije i prisiljenog plivanja ribe se kreću prema anodi. Kad dođu do anode, ribe prestaju plivati te ulaze u stanje narkoze okrećući se trbuhom prema gore i u takvom stanju ostaju nekoliko sekundi.

Na učinkovitost elektroribolova utječu okolišni, biološki te tehnički čimbenici (Zalewski i Cowx, 1990). U okolišne čimbenike ubrajaju se abiotički (električna provodljivost vode, kvaliteta vode i prozirnost), stanišni (struktura, dimenzije i supstrat dna, brzina vode, dubina), sezonski (temperatura, vremenski uvjeti, visina vodostaja) te vremenski uvjeti (doba dana), dok biološki čimbenici obuhvaćaju strukturu ihtiocenoze, kao i strukturu ihtipopulacija, odnosno gustoću populacije, veličinu jedinki, dobnu strukturu, ekološke značajke i ponašanje vrsta, njihovu fiziologiju i morfologiju. Tehnički čimbenici odnose se na ljudski faktor te uključuju čimbenike vezane uz ekipu (njena veličina, iskustvo, fizička spremnost, uigranost, motiviranost i sposobnost), opremu (veličina broda, građa i smještaj anoda, održavanje) te organizaciju (odabir lokaliteta, standardizacija lovnog napora).

Do devedesetih godina prošlog stoljeća smatralo se kako je tehnika bezopasna za ribe. Ipak, pokazalo se kako može uzrokovati unutarnje povrede, te je zbog toga i radi dobrobiti osobe koja obavlja sakupljanje potrebno pravilno rukovati uređajem (Reynolds, 1996) (Slika 4). Međutim, usprkos neželjenim posljedicama većina ihtiologa elektroribolov smatra ne samo

najdjelotvornijom, već i najmanje štetnom metodom lova riba. Smatra se kako je izmjenična struja najštetnija za ribe, a istosmjerna najmanje štetna (Snyder, 2003).

Elektroribolov je u ovom istraživanju provodila iskusna ekipa stručnjaka Laboratorija za kralješnjake Zoologijskog zavoda.



Slika 4. Iskusna ekipa stručnjaka uz opremu koja se sastoji od tri glavna dijela (izvora struje, pretvarača i elektroda) vrše elektroribolov

Nakon lova elektroagregatima jedinke su žive prevezene do Zoologijskog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Zagrebu. Prije uzimanja uzoraka tkiva i morfoloških analiza jedinke su usmrćene etil 3 – aminobenzoat metansulfonatom. Sterilnim sam škaricama svakoj jedinci odrezala komadić tkiva prsne peraje, otprilike veličine 1 cm², koji sam zatim spremila u sterilnu Eppendorf epruvetu volumena 2 ml te pohranila u zamrzivač do daljnje analize na temperaturi od -20°C. Jedinke upotrijebljene za morfološke analize bile su, nakon uzimanja uzoraka tkiva peraja, konzervirane tako da su najprije 24 h bile držane u 40 % formaldehidu, a nakon toga čuvane u 70 % etilnom alkoholu. Svaku sam jedinku obilježila kodnim brojem. Taj kod sam obilježila i na Eppendorf epruvetama s tkivom tih jedinki,

kako bi na kraju mogla znati koje sekvence pripadaju kojem morfološkom tipu, odnosno točno kojoj jedinci.

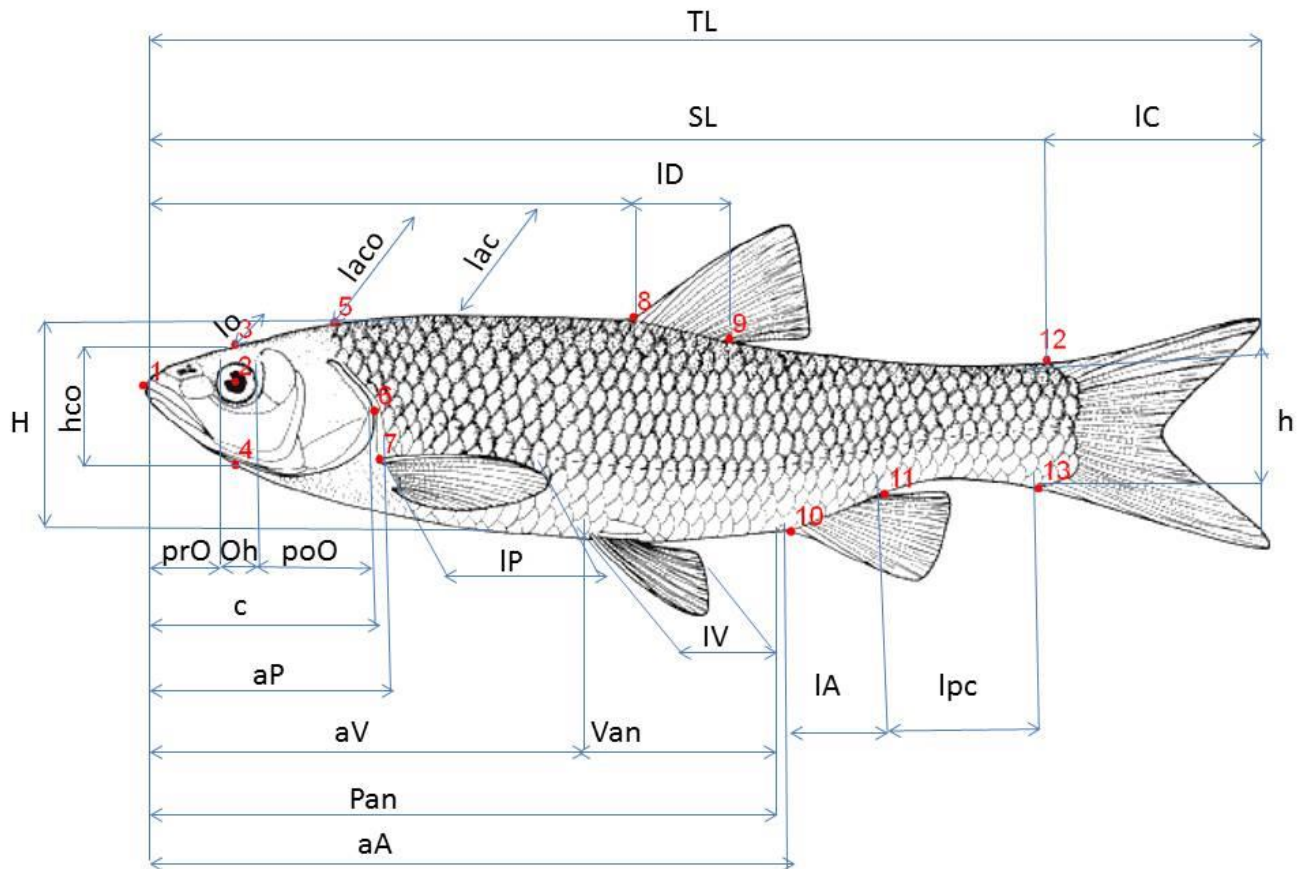
4.2.2. Morfometrijske analize

4.2.2.1. Mjerenje morfometrijskih značajki

Morfometrija riba je jedan od najvidljivijih načina utvrđivanja evolucijske prilagođenosti neke vrste na njen okoliš (Kovač i sur., 1999). Nekada se smatralo kako su varijacije morfoloških značajki isključivo genetske prirode (Heincke, 1898; McQuinn, 1997), no danas se zna da uz genetsku, obuhvaćaju i ekološku komponentu (Cabral i dr. 2003, Foote i dr. 1989, Robinson i Wilson 1996). Morfometrijske analize uključuju mjerenje pojedinih duljina na tijelu riba te njihovu statističku obradu i uspoređivanje. Na taj način one omogućuju opisivanje oblika tijela riba te utvrđivanje razlika između populacija i vrsta. Postoje dvije osnovne metode određivanja morfometrijskih značajki na jedinkama neke vrste, a to su klasična ili tradicionalna metoda te metoda mreže (eng. truss network). Klasičnom metodom mjere se duljine pojedinih dijelova tijela te udaljenosti između određenih dijelova tijela, a metoda mreže temelji na tome da se na tijelu ribe označe zadane točke te se mjere udaljenosti između tih točaka. Na taj način se one zapravo povezuju u mrežu. Međutim, u ihtiološkim se istraživanjima dulje koristi tradicionalna metoda. U taksonomskim se istraživanjima zapravo dobije isti rezultat bez obzira koja metoda koristi, te je čak klasična metoda osjetljivija od metode mreže, s obzirom na to da uključuje veći broj mjera. Iz tog razloga se danas uglavnom više koristi klasična metoda koja se i smatra standardnom metodom proučavanja morfometrije riba (Kottelat i Freyhof 2007).

U ovom je istraživanju korištena klasična metoda morfometrijske analize. Na svakoj su jedinci pomičnom mjerkom izmjerene 24 mjere (Slika 5, Tablica 2). Sve su mjere određivane na tijelu ribe, od točke do točke, nikad preko projekcija ni fotografija. Mjere su zaokruživane na 1 mm, koristeći digitalnu pomičnu mjerku.

Perajna osnova ili baza peraje je područje kojim se peraja pričvršćuje uz tijelo, dok se kao početak peraje smatra točka učvršćenja šipčice smještene najviše anteriorno (prema Kottelat i Freyhof, 2007).



Slika 5. Morfometrijske mjere određivane na vrsti *Alburnus sarmaticus*. Kratice svih oznaka morfometrijskih značajki navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Oznake i nazivi morfometrijskih značajki mjerenih na vrsti *A. sarmaticus*.

OZNAKA	LATINSKI NAZIV	HRVATSKI NAZIV (opis)
TL	<i>Longitudo totalis</i>	ukupna duljina tijela
SL	<i>Longitudo corporis</i>	standardna duljina tijela (od vrha gubice do početka repne peraje)
c	<i>Longitudo capitis</i>	duljina glave
Pan	<i>Longitudo praeanalisis</i>	preanalna duljina (udaljenost od vrha gubice do početka analnog otvora)
aA	<i>Diastantia praeanalisis</i>	preanalna udaljenost (od vrha gubice do početka baze podrepne peraje)
Van	<i>Longitudo ventroanalisis</i>	ventroanalna duljina (udaljenost između početka trbušnih peraja i analnog otvora)
aV	<i>Distantia praeventralis</i>	preventralna udaljenost (od vrha gubice do početka trbušnih peraja)
ad	<i>Distantia praedorsalis</i>	predorzalna udaljenost (od vrha gubice do kraja baze leđne peraje)
lpc	<i>Longitudo pedunculi</i>	duljina repnog drška (od posteriornog ruba baze podrepne peraje do početka repne peraje)
ID	<i>Longitudo basis D</i>	duljina baze leđne peraje
IA	<i>Longitudo basis A</i>	duljina baze podrepne peraje
IC	<i>Longitudo C</i>	duljina repne peraje
IP	<i>Longitudo P</i>	duljina prsne peraje
IV	<i>Longitudo V</i>	duljina trbušne peraje
hco	<i>Altitudo capitis</i>	najveća visina glave (mjerena u razini očiju)
H	<i>Altitudo corporis max.</i>	najveća visina tijela
h	<i>Altitudo corporis min.</i>	najmanja visina tijela, odnosno visina repnog drška
laco	<i>Latitudo capitis</i>	najveća širina glave
lac	<i>Latitudo corporis max.</i>	najveća širina tijela
io	<i>Spatium interorbitale</i>	širina međuočnog prostora
Oh	<i>Diameter oculi</i>	promjer oka
prO	<i>Spatium praeorbitale</i>	predočni prostor (od vrha gubice do anteriornog ruba oka)
poO	<i>Spatium postorbitale</i>	zaočni prostor (od posteriornog ruba oka do kraja operkuluma)

4.2.2.2. Standardizacija morfometrijskih mjera

Na morfometrijske značajke pojedinih riba, velik utjecaj imaju ekološka obilježja staništa, prvenstveno dostupnost hrane. Dok genetski faktori određuju raspon unutar kojeg se mogu nalaziti veličine pojedine vrste, na same dimenzije tijela najveći utjecaj imaju značajke staništa. Stoga se na temelju samih morfometrijskih mjera ne mogu donositi zaključci o srodstvenim odnosima i taksonomiji pojedinih populacija. Zbog toga se morfometrijske mjere standardiziraju, odnosno iskazuju se njihove relativne vrijednosti i na taj se način što više smanji komponenta ekološkog utjecaja na njih. Standardizacija se najčešće provodi na način da se mjere pretvaraju u morfometrijske odnose (Kottelat i Freyhof, 2007). Iako se utjecaj ekoloških faktora na morfometrijske odnose također ne može zanemariti, ipak je znatno smanjen i mnogo bolje odražavaju morfometrijsku varijabilnost između i unutar vrsta. Stoga su znatno pouzdaniji za taksonomska istraživanja.

Iz izmjerenih mjera za svaku je jedinku određeno 25 morfometrijskih odnosa ili omjera: omjer standardne duljine i ukupne duljine tijela (SL/TL); omjeri duljine glave, preanalne duljine, preanalne udaljenosti, preventralne, prepektoralne i predorzalne udaljenosti, duljine repnog drška, ventroanalne duljine, duljina baza leđne i podrepne peraje, duljina repne, prsne i trbušne peraje, najveće širine glave, najveće širine tijela te najveće i najmanje visine tijela sa standardnom duljinom (c/SL, Pan/SL, aA/SL, aV/SL, aP/SL, aD/SL, lpc/SL, Van/SL, ID/SL, IA/SL, IC/SL, IP/SL, IV/SL, laco/SL, lac/SL, H/SL i h/SL); omjeri širine međuočnog prostora, promjera oka, predočnog i zaočnog prostora s duljinom glave (io/c, Oh/c, prO/c, poO/c); omjeri visine glave i najmanje visine tijela s najvećom visinom tijela (hco/H i h/H); te omjer visine i duljine repnog drška (h/lpc).

4.2.2.3. STATISTIČKA OBRADA MORFOMETRIJSKIH ZNAČAJKI

Statistička obrada morfometrijskih podataka obuhvaćala je deskriptivnu statistiku morfometrijskih mjera i odnosa, te usporedbu morfometrijskih odnosa između populacija i

vrsta. Za usporedbu je korištena analiza varijance (ANOVA) te jedna multivarijantna analiza – analiza glavnih komponentata (PCA). Sve statističke analize izvršene su pomoću programa Statistica 13.3., osim deskriptivne statistike za koju je korišten program Microsoft Office Excel 2010.

Deskriptivnom statistikom prikupljeni podaci su uređeni i opisani. Za svaku populaciju je posebno računata aritmetička sredina te najmanje i najveće vrijednosti nestandardiziranih morfometrijskih značajki.

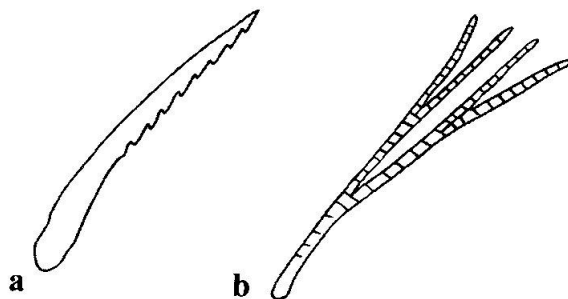
Analiza varijance (ANOVA) upotrebljava se onda kada se želi utvrditi postoje li razlike između nekoliko aritmetičkih sredina (Petz, 1997). U ovom istraživanju analizom varijance su uspoređeni morfometrijski odnosi svih populacija. Kao post hoc analiza proveden je Fisherov LSD test, kako bi se utvrdilo koje se populacije međusobno statistički značajno razlikuju.

Metodom glavnih komponentata (PCA) uspoređene su sve jedinke iz svih populacija na temelju svih standardiziranih morfometrijskih značajki. Metoda PCA omogućuje projicirati originalni vektorski prostor od mnogo varijabli na manje dimenzionalni prostor te iz njega dobiti novi set osi, tzv. faktorske osi. U takvom faktorskom prostoru svaka točka predstavlja pojedinu jedinku, prikazanu na temelju njenih morfometrijskih značajki (Kolesarić i Petz, 2003). Jedinke koje su blizu u koordinatnom sustavu slične su po svom tjelesnom obliku. Osim toga, može se vidjeti postoji li grupiranje i koje jedinke se grupiraju.

4.2.3. Merističke analize

Merističke značajke su strukture na tijelu riba koje se serijski ponavljaju, a nastaju kao posljedica serijske homologije, odnosno unutrašnjeg ponavljanja dijelova tijela (Boschung i Mayden, 2004). Brojevi bodlji i šipčica se smatraju najkorisnijim taksonomskim značajkama (Boschung i Mayden, 2004). Broj razgranatih šipčica u leđnoj i podreпноj peraju ima veliku važnost pri taksonomskom određivanju mnogih skupina riba. Šipčice koje se broje u merističkim istraživanjima zapravo predstavljaju vanjski kostur riba zrakoperki, točnije perajne šipčice

(*lepidotrichia*). Vanjski kostur je vezan za unutrašnji kostur. Kod zrakoperki se on sastoji od dva niza perajnih potpora: proksimalnih i distalnih (*pterygiophora proxima et distalia*). Perajne potpore neparnih peraja utaknute su u tijelu između trnastih nastavaka kralješaka, a izvana strše samo perajne šipčice. Perajne potpore parnih peraja pričvršćuju se na oplećje, odnosno kukovlje. Perajne šipčice se mogu podijeliti na meke i tvrde (Slika 6). Meke se sastoje od lijevih i desnih dijelova i obično su segmentirane i razgranate (Kottelat i Freyhof 2007). Tvrde šipčice nisu segmentirane ni razgranate, te često predstavljaju bodlje. Prave bodlje su neparne, nikad nisu razgranate niti segmentirane strukture. Obično su tvrde i zašiljene. Kod nekih vrsta (npr. kod mnogih šaranki) anteriorne šipčice u nekim perajama stopljene su u nesegmentirane, tvrde i nesavitljive "bodlje", koje su katkad nazubljene na anteriornoj i/ili posteriornoj strani (Boschung i Mayden, 2004; Kottelat i Freyhof, 2007).



Slika 6. Crtež tvrde perajne šipčice pretvorene u nazubljenu bodlju (a) i meke, segmentirane i razgranate perajne šipčice (b). Izvor: Kottelat i Freyhof, 2007

Merističke analize su, kao i morfometrijske, provedene na jedinkama konzerviranim u etilnom alkoholu. Na svakoj je jedinci određen broj nerazgranatih i razgranatih šipčica u svim perajama (neparnima: leđnoj, podrepnoj i repnoj; te parnima: prsnima i trbušnjima). Perajne šipčice u parnim perajama brojene su na lijevoj strani tijela riba, kao što se to standardno čini (Boschung i Mayden, 2004). Nerazgranate (tvrde) šipčice označene su rimskim brojevima, dok su razgranate (meke) šipčice označene arapskim brojevima. Posljednje dvije razgranate šipčice u

leđnoj i podreпноj peraji velike pliske nastavljaju se na jednu distalnu perajnu potporu te se označuju kao "1¹/₂" (prema Kottelat i Freyhof, 2007). Prve tvrde šipčice neparnih peraja često su skrivene pod kožom pa da bismo ih otkrili, bilo je potrebno pincetom lagano pokidati kožu i izvući ih. Međutim, one se vrlo rijetko koriste u taksonomskim istraživanjima.

Osim broja šipčica u perajama, meristička istraživanja uključivala su također i brojenje nekih drugih struktura koje se serijski ponavljaju, a to su: broj ljustica u bočnoj pruzi, kao i broj ljustica u okomitom redu iznad i ispod bočne pruge, te broj ždrijelnih zubi (Kottelat i Freyhof, 2007).

4.3. METODE MOLEKULARNE GENETIKE

4.3.1. Izolacija DNA

Ukupna genomska DNA je izolirana iz komadića tkiva peraje jedinki sa svih lokaliteta uključenih u istraživanje. Za tu je svrhu koristila sam DNeasy Blod & Tissue Kit (Qiagen), a postupak izolacije slijedio je protokol proizvođača. U Eppendorf epruvetu od 2 ml na komadić tkiva dodala sam 180 µl otopine ATL i 20 µl proteinaze K. Potom sam sve stavila u vodenu kupelj na inkubaciju preko noći na 56°C da se tkivo potpuno razloži odnosno da dođe do lize tkiva. Sljedeći sam dan sadržaj epruvete promiješala vorteksiranjem, te mu pridodala 200 µl otopine AL (otopina za lizu) uz 200 µl 100%-tnog etanola. Sadržaj epruvete prebacila sam u posebnu kolonu (DNeasy Mini spin column) koja je uložena u epruvetu od 2 ml za skupljanje uzorka. S tri centrifugiranja (prvo i drugo na 6000 okretaja u minuti, a treće na 14000 okretaja u minuti; sve pri sobnoj temperaturi) te uz dodatak otopina za ispiranje (otopina AW1 dodana između prva dva centrifugiranja, a AW2 između drugog i trećeg centrifugiranja) uzorak sam isprala. Pritom je DNK bila vezana na silika membrani DNeasy Mini spin kolonica. Nakon svakog centrifugiranja zamijenila sam epruvetu za skupljanje. Dodatkom pufera AE i centrifugiranjem pri 8.000 okretaja u minuti došlo je do elucije DNA koju sam skupila u Eppendorf epruvetu od 2 ml i označila kodnim brojem uzorka.

4.3.2. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (PCR, eng. Polymerase Chain Reaction) je metoda umnažanja određenog odsječka molekule DNK u uvjetima *in vitro*. Dok se replikacija DNA *in vivo* odvija u strogo kontroliranim i reguliranim staničnim procesima, u reakciji PCR određeni odsječak DNK umnaža se "nekontrolirano", a od jedne kopije DNA se u reakciji PCR može dobiti vrlo veliki broj kopija (ovisno o broju ciklusa) (Ambriović-Ristov i sur., 2007).

Reakcija PCR je provedena pomoću uređaja za PCR (Eppendorf Mastercycler Nexus GX2), u kojega su stavljene epruvete za PCR s reakcijskim smjesama. Reakcijska smjesa za jednu reakciju sadržavala je 12,5 µl mješavine za PCR (HotStarTaq Master Mix, Qiagen), po 2 µl svake početnice koncentracije 10 pmol/µl, 2 µl vode oslobođene RNA-ze te 4 µl DNK kalupa. Mješavina za PCR (HotStarTaq Master Mix) te voda bez RNA-ze dio su HotStarTaq Master Mix Kit-a (Qiagen), mješavina sadrži DNK polimerazu, pufer koji sprječava nastanak nespecifičnih produkata umnožavanja te sva četiri deoksiribonukleozid – 5' – trifosfata (dATP, dGTP, dTTP i dCTP).

Reakcija PCR sastoji se od tri osnovna dijela:

1. denaturacije dvolančane DNA u dva jednolančana lanca;
2. sparivanja početnica;
3. produljivanja DNA.

Kontinuiranim ponavljanjem denaturacije, sparivanja i produljivanja u svakom ciklusu, količina umnožene DNA eksponencionalno raste do broja od 2^n kopija odsječaka DNK, gdje je n broj ciklusa (Ambriović Ristov i sur., 2007).

Raznim istraživanjima različitih kralješnjaka dokazana je prikladnost citokrom b (cyt *b*) gena za genetska istraživanja (npr. Tsigenopoulos i Berrebi, 2000; Castresana, 2001; Farias i sur., 2001; Tobe i sur., 2010). Smatra se najkorisnijim markerom za utvrđivanje filogenetskih odnosa

između srodnih svojti (Castresana, 2001; Patwardhan i sur., 2014). Cyt *b* je dio mitohondrijske DNA čija je stopa razvoja višestruko veća od tipične nuklearne DNA (Awise, 1986) pružajući veći broj parsimonskih informativnih mjesta i niži indeks konzistencije u mitohondrijskim genima.

Stoga je za ovo istraživanje reakcija PCR bila posebno prilagođena za umnožavanje gena za cyt *b* kao što slijedi:

REAKCIJA PCR ZA CYT *b*:

1. FAZA AKTIVACIJE DNK POLIMERAZE: 95°C, 15 min

2. CIKLUSI UMNOŽAVANJA DNK: 35 ciklusa, a svaki se sastoji od:

A) DENATURACIJA: 94°C, 30 s

B) SPARIVANJE: 50°C, 30 s

C) PRODULJIVANJE: 72°C, 90 s

3. ZAVRŠNO PRODULJIVANJE: 72°C, 7 min

4.3.3. Pročišćavanje produkata reakcije PCR

Kako bi se uklonile početnice, nukleotidi, enzimi te sve ostale nečistoće iz smjese PCR-produkata provedeno je njihovo pročišćavanje koristeći QIAquick PCR Purification - Kit (Qiagen), prema protokolu proizvođača. Postupak se temelji na vezanju DNA uz silika membranu u puferu visoke slanosti, te njeno otpuštanje u puferu niske slanosti ili u vodi. Otopina za vezanje DNA (pufer PBI) dodana je u epruvetu s PCR-produktima, te je zatim ta mješavina prebačena u posebnu epruvetu (*QIAquick column*) unutar koje se nalazi silika membrana. Za vezanje DNA, mješavine u epruvetama bile su centrifugirane pri 13000 okretaja u minuti. Za ispiranje je u epruvetu dodana otopina PE, nakon čega je ponovno primijenjeno centrifugiranje pri istoj sili, ali dva puta. Nakon posljednjeg centrifugiranja QIAquick epruveta je prebačena u Eppendorf epruvetu od 1,5 ml. Zatim je u sredinu silika membrane dodano 50 µl otopine EB (otopina za eluciju) te su epruvete bile centrifugirane.

4.3.4. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu korištena je kao metoda provjere kvalitete DNA nakon izolacije, nakon reakcije PCR i nakon pročišćavanja produkata PCR. To je standardna metoda za analizu DNA, odnosno njenu identifikaciju, razdvajanje, određivanje količine, a ponekad i pročišćavanje (Ambriović-Ristov i sur., 2007).

Elektroforeza je provedena u agaroznom gelu, napravljenom tako da je 1%-tna otopina agaroze u TAE puferu bila ulivena u kalup s češljicom i ohlađena. Nakon vađenja češlja, u jažice u agaroznom gelu nanošeno je po 4 μ l DNA koncentracije 100 pmol/ μ l uz 1 μ l standardne boje (Coral Load, Qiagen), dok je kao standard za određivanje duljine DNA odsječaka korištena λ DNA, koja je nanošena u zasebnu jažicu. Elektroforeza je trajala 30 minuta, pri naponu od 120 V, a pritom je gel bio uronjen u TAE pufer. Zatim je gel obojen u otopini etidijeva bromida (20 minuta), nakon čega je DNA u gelu vizualizirana pomoću UV transiluminatora. Ako je DNA bila odgovarajuće kvalitete, koncentracije i duljine (za *cyt b* PCR-produkte duljina je bila oko 1140 parova baza), nastavljeno je sa sljedećim korakom, dok su pročišćeni produkti PCR reakcije nakon analize na agaroznom gelu bili poslani na sekvenciranje.

4.3.5. Sekvenciranje

Sekvenciranje, odnosno određivanje sljedova nukleotida DNA, izvršeno je u Macrogen servisu Europa. Za sekvenciranje gena *cyt b* korištene su početnice L-Cyp (5' GAY TTG AAR AAC CAY CGT TG) i H-Cyp (5' CCT AGC TTT GGG AGY TAGG 3') kako bi obostranim sekvenciranjem dobila cjelokupnu duljinu odabranog genskog markera. Početnice su sintetizirane u VBC Genomics Bioscience - Research GmbH, Beč, Austrija, te su nakon razrjeđivanja, u koncentraciji od 10 pmol/ μ l, zajedno sa PCR-produktima poslani u Macrogen servis, u Seul.

4.3.6. Analiza sekvenci

Za sravnjivanje sekvenci korišten je program BioEdit Sequence Alignment Editor, verzija 7.0.5.3. (Hall, 1999), a sve su sekvence provjerene vizualno. Sekvence loših kvaliteta ili nesigurnog slijeda nukleotida odbačene su iz daljnjih analiza. Nakon sravnjivanja dobiven je set od 11 *cyt b* sekvenci duljine 1140 parova baza (bp). Dobivene su sekvence potom filogenetski analizirane u programu MEGA, verzija 6.06 (Tamura i sur., 2013) pomoću metoda najveće parsimonije (MP, od engleskog naziva *maximum parsimony*) i najveće vjerojatnosti (ML, od engleskog naziva *maximum likelihood*).

U filogenetske analize uključene su i sekvence preuzete iz banke gena (*Alburnus neretvae* (4), *Alburnus albidus* (2), *Alburnus sarmaticus* (2), *Alburnus belvica* (1), *Alburnus alburnus* (2) i *Alburnus arborella* (4)). Vanjsku grupu (eng. out group) činile su vrste *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) i *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758) kao što je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Popis sekvenci iz banke gena. Kodno ime sekvence je naziv pod kojim je pojedina sekvenca analizirana u ovom istraživanju, te kojim je označena u filogenetskim stablima, a sadrži ime vrste kojoj haplotip pripada i redni broj.

kodno ime sekvence	rijeka/jezero	država	pristupni broj u banci gena	referenca
<i>Alburnus neretvae</i> 1	Neretva	Hrvatska	GU479868	Buj i sur. 2010
<i>Alburnus neretvae</i> 2	Neretva	Hrvatska	GU479870	Buj i sur. 2010
<i>Alburnus neretvae</i> 3	Neretva	Hrvatska	GU479869	Buj i sur. 2010
<i>Alburnus neretvae</i> 4	Neretva	Hrvatska	GU479867	Buj i sur. 2010
<i>Alburnus albidus</i>		Italija	KJ463893	Milana i sur. 2014 neobjavljeno
<i>Alburnus albidus</i>		Italija	KJ463887	Milana i sur. 2014 neobjavljeno
<i>Alburnus sarmaticus</i> GB 1	Južni Bug	Ukrajina	AY838935	Bogutskaya i sur. 2006
<i>Alburnus sarmaticus</i> GB2	Mondsee jezero	Austrija	AY026394	Berrebi i sur. 2001
<i>Alburnus belvica</i>	Prespansko jezero		AF090746	Doadrio i sur. 1998
<i>Alburnus alburnus</i> 1	Saône	Francuska	AB239593	Hanzawa i sur. 2005
<i>Alburnus alburnus</i> 2	Rhone	Francuska	Y10443	Bouvet i sur. 1997
<i>Alburnus arborella</i> 1	Zrmanja	Hrvatska	GU479871	Buj i sur. 2010
<i>Alburnus arborella</i> 2	Zrmanja	Hrvatska	GU479872	Buj i sur. 2010
<i>Alburnus arborella</i> 3	Zrmanja	Hrvatska	GU479873	Buj i sur. 2010
<i>Alburnus arborella</i> 4	Zrmanja	Hrvatska	GU479874	Buj i sur. 2010

- Metoda najveće parsimonije

Metodom najveće parsimonije (eng. *maximum parsimony*) (Mount, 2001) se određuje evolucijsko stablo za koje je potreban najmanji broj koraka potrebnih za prikazivanje uočenih razlika u sekvencama. Iz tog razloga se ona često naziva i metoda minimalne evolucije (eng. *minimum evolution method*) (Mount, 2001). Izračunava se najmanji broj nukleotidnih supstitucija kojima se objašnjava cjelokupni evolucijski proces (Nei, 1996). Parsimonijsko stablo se opisuje indeksom konzistencije (CI), indeksom retencije (RI) i indeksom homoplazije (HI). Ova metoda jedna je od najpopularnijih za izradu filogenetskih rekonstrukcija (Nakhleh i sur., 2005).

- Metoda najveće vjerojatnosti

Metoda najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*) (Mount, 2001) se upotrebljava u filogenetskim istraživanjima za nalaženje optimalnog seta parametara za stablo te optimalnog modela koji najbolje opisuje postojeće podatke. Filogenetsko stablo opisuje topologiju evolucijskih odnosa između sekvenci, a set grana različite duljine predstavlja koliko se evolucijskih događaja odigralo u različitim dijelovima stabla. Model sadržava set parametara koji opisuju evolucijske promjene, kao npr. stopu tranzicijskih mutacija. U filogenetskim analizama, evolucijsko stablo, odnosno njegov oblik, grane i drugi parametri evolucijskog modela čine hipoteze. ML vrednuje hipoteze (stabla i parametre) selektiranjem onih koji imaju najveću vjerojatnost.

Konstrukcija filogenetskog stabla je proces u kojemu su točnost, pouzdanost i računalna brzina bitni faktori. Niti jedna metoda neće dati točno stablo već najbolje moguće na osnovu unesenih podataka i u skladu sa svojim ograničenjima. Stoga je korisno koristiti najmanje dvije metode za bilo kakvu filogenetsku analizu kako bi se provjerila dosljednost dobivenih rezultata (Xiong, 2006).

- Statistička testiranja filogenetskih stabala–određivanje podržanosti

Statistički testovi za filogenetska stabla se mogu podijeliti u dvije grupe: testovi pouzdanosti dobivenog stabla i testovi razlika u topologiji između dva ili više različitih stabala dobivenih iz istog seta podataka; odnosno provodi se testiranje modela (Nei, 1996). Analiza podržanosti (*bootstrapping*) spada u najjednostavniji test za filogenetska stabla. Ovom se metodom testira da li cijeli set podataka podupire stablo ili je dobiveno stablo krajnji izabranik između većega broja gotovo jednakih alternativnih stabala. To se postiže uzimanjem nasumičnih poduzoraka iz seta podataka, izradom stabala na osnovi svakog od ovih nasumičnih poduzoraka i izračunavanjem učestalosti s kojom se različiti dijelovi stabla reproduciraju u svakom od nasumičnih poduzoraka (Baldauf, 2003). U ovom istraživanju podržanost stabla određena je uz 1000 ponavljanja. Test je rezultirao velikim postotkom podrške, što znači da je relativno dobro i mnogo karaktera podržava taj čvor stabla. Postotci od 70 % pa na više se smatraju umjerenom podrškom od strane znanstvenika (Hillis i Bull 1993).

5 REZULTATI

5.1 Morfometrija

Morfometrijske analize su izvršene na ukupno 25 uzoraka vrste *A. sarmaticus* prikupljenih na rijekama Kupa, Dobra i Mrežnica. U istraživanje je uključeno i 20 jedinki *A. alburnus* prikupljenih u rijeci Dunav. Deskriptivnom statistikom utvrđene su maksimalne (maks), minimalne (min) i srednje vrijednosti (mean) mjera za sve populacije. Dužine su izražene u milimetrima (mm). Najveću duljinu tijela imala je populacija *A. sarmaticus* iz rijeke Dobre (TL mean = 154; SL mean = 124,5). Populacija *A. sarmaticus* iz rijeke Mrežnice (TL mean = 131,93, SL mean = 106,86) bila je nešto veća od populacije *A. alburnus* iz rijeke Dunav (TL mean = 126,55, SL mean = 126,55). Najmanju duljinu tijela imala je populacija *A. sarmaticus* iz rijeke Kupe (TL mean = 110,87, SL = 88,5). U tablici 4 su prikazane srednje vrijednosti morfometrijskih mjera.

Tablica 4. Tablica srednjih vrijednosti morfometrijskih mjera

	SRKU	SRDO	SRMR	ALDU
TL	110,875	154	131,93	126,55
SL	88,5	124,5	106,86	102,65
Lc	21,875	26,75	25,14	22,4
pan	56,125	78	68,14	61,3
pA	58,625	80,5	70,14	63,95
Van	14,875	24,25	19,43	17,4
pV	41,25	54,5	49,14	44,1
pD	49,75	71,5	59,43	56,25
lpC	13,125	17,25	14,57	13,6
ID	8,875	13,75	10,71	11,1
IA	15,125	22,5	17,93	18,95

Tablica 4. Nastavak.

IC	19,125	27,25	24,57	23,35
IP	16,625	24,75	19,78	19,6
IV	13,25	19,75	15,43	14,8
hco	11,625	15,25	13,86	12,25
H	18	31,5	23,64	22,6
h	6,625	10,75	8,71	8,55
laco	9,75	12,25	11,14	9,5
lac	7,625	14,5	11,42	9,6
io	6,125	8,25	7,36	6,35
Oh	6	6,75	6,43	5,9
prO	6,25	7,25	6,78	5,25
poO	9,125	11,75	11,07	10,75

* TL – ukupna duljina tijela, SL – standardna duljina tijela, c – duljina glave, Pan, preanalna duljina, aA – preanalna udaljenost, Van – ventroanalna udaljenost, aV – preventralna udaljenost, ad – predorzalna udaljenost, lpc – duljina repnom drška, ID – duljina baze leđne peraje, IA – duljina baze podrepne peraje, IC – duljina repne peraje, IP – duljina prsne peraje, IV – duljina trbušne peraje, hco – najveća visina glave, H . najveća visina tijela, h – najmanja visina tijela, laco – najveća širina glave, lac – najveća širina tijela, io – širina međuočnog prostora, Oh – promjer oka, prO – predočni prostor, poO – zaočni prostor

Po srednjim vrijednostima morfometrijskih omjera, naočigled se može primijetiti da se niti jedna populacija značajno ne razlikuje od druge kao što je prikazano u tablici 5.

Tablica 5. Tablica vrijednosti morfometrijskih omjera.

	SRKU			SRDO			SRMR			ALDU		
	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean
SL/TL	0,766	0,84	0,802	0,788	0,826	0,809	0,733	0,891	0,809	0,778	0,864	0,811
Lc/SL	0,238	0,261	0,247	0,204	0,222	0,214	0,209	0,259	0,235	0,196	0,242	0,219
pan/SL	0,603	0,661	0,632	0,621	0,632	0,626	0,579	0,679	0,636	0,56	0,624	0,597

Tablica 5. Nastavak.

pA/SL	0,619	0,686	0,659	0,643	0,650	0,647	0,591	0,688	0,655	0,584	0,651	0,623
pV/SL	0,429	0,493	0,466	0,429	0,449	0,438	0,412	0,491	0,459	0,4	0,453	0,430
pD/SL	0,524	0,593	0,560	0,563	0,588	0,573	0,5	0,605	0,556	0,482	0,6	0,549
lpc/SL	0,133	0,167	0,148	0,135	0,417	0,138	0,104	0,165	0,137	0,112	0,147	0,132
Van/SL	0,151	0,192	0,166	0,190	0,199	0,195	0,157	0,193	0,181	0,141	0,2	0,169
ID/SL	0,079	0,108	0,100	0,105	0,118	0,110	0,061	0,129	0,102	0,086	0,129	0,108
IA/SL	0,159	0,185	0,170	0,159	0,191	0,181	0,140	0,2	0,169	0,160	0,209	0,185
IC/SL	0,190	0,261	0,215	0,190	0,243	0,219	0,123	0,341	0,233	0,148	0,269	0,228
Lp/SL	0,175	0,213	0,187	0,175	0,214	0,200	0,158	0,213	0,186	0,167	0,208	0,191
IV/SL	0,119	0,167	0,148	0,119	0,169	0,159	0,132	0,186	0,146	0,130	0,172	0,144
hco/H	0,56	0,8	0,655	0,56	0,565	0,492	0,552	0,625	0,586	0,5	0,591	0,542
h/H	0,33	0,417	0,371	0,333	0,387	0,344	0,345	0,4	0,370	0,333	0,409	0,378
laco/laco	0,636	0,9	0,785	0,636	1,286	1,172	0,917	1,182	1,030	0,889	1,111	1,012
io/laco	0,385	1	0,651	0,385	1,333	0,997	0,5	1	0,771	0,545	0,833	0,673
io/Lc	0,25	0,313	0,279	0,25	0,345	0,307	0,25	0,333	0,292	0,24	0,318	0,284
Oh/Lc	0,233	0,313	0,278	0,233	0,286	0,255	0,227	0,28	0,256	0,217	0,318	0,264
prO/Lc	0,25	0,333	0,286	0,25	0,310	0,272	0,211	0,321	0,267	0,2	0,273	0,234
poO/Lc	0,375	0,647	0,413	0,375	0,476	0,442	0,393	0,5	0,443	0,409	0,55	0,479
laco/SL	0,096	0,133	0,110	0,096	0,103	0,098	0,091	0,115	0,104	0,077	0,105	0,093
laco/Lc	0,389	0,55	0,448	0,389	0,483	0,459	0,406	0,483	0,442	0,353	0,474	0,424
laco/hco	0,667	1	0,845	0,667	0,824	0,801	0,733	0,867	0,803	0,667	0,909	0,775
Lc/hco	1,667	2	1,885	1,667	1,867	1,750	1,688	2	1,819	1,583	2,090	1,833
lac/H	0,4	0,467	0,425	0,4	0,484	0,458	0,438	0,556	0,483	0,353	0,478	0,425
lac/SL	0,075	0,093	0,086	0,075	0,132	0,115	0,096	0,118	0,107	0,077	0,105	0,094
H/SL	0,161	0,231	0,202	0,161	0,279	0,251	0,202	0,232	0,221	0,194	0,245	0,221
h/SL	0,065	0,083	0,075	0,065	0,095	0,086	0,073	0,088	0,082	0,065	0,095	0,083
h/lpc	0,455	0,556	0,506	0,455	0,706	0,623	0,5	0,833	0,604	0,467	0,818	0,635

* SL/TL - omjer standardne duljine i ukupne duljine tijela; Lc/SL - omjer duljine glave i standardne duljine tijela; Pan/SL - omjer preanalne duljine i standardne duljine tijela; pA/SL - omjer preanalne udaljenosti i standardne duljine tijela; pV/SL - omjer preventralne udaljenosti i standardne duljine tijela; pD/SL - omjer predorzalne udaljenosti i i standardne duljine tijela; lpc/SL - omjer duljine repnog drška i standardne duljine tijela; Van/SL - omjer ventroanalne duljine i standardne duljine tijela; ID/SL - omjer duljine baze leđne peraje i standardne duljine tijela; IA/SL - omjer duljine baze podrepne peraje i standardne duljine tijela; IC/SL - omjer duljine repne peraje i standardne duljine tijela; LP/SL - omjer duljine prsne peraje i standardne duljine tijela; IV/SL - omjer duljine trbušne peraje i standardne duljine tijela; hco/H - omjer visine glave i najveće visine tijela; h/H - omjer najmanje visine tijela i najveće visine

tijela; lac/laco - omjer najveće širine tijela i najveće širine glave; io/laco - omjer širine međuočnog prostora i najveće širine glave; io/Lc - omjer širine međuočnog prostora i duljine glave; Oh/Lc - omjer promjera oka i duljine glave; prO/Lc - omjer duljine predočnog prostora i duljine glave; poO/Lc - omjer zaočnog prostora i duljine glave; laco/SL - omjer najveće širine glave i standardne duljine tijela; laco/Lc - omjer najveće širine glave i duljine glave; laco/hco - omjer najveće širine glave i najveće visine glave; Lc/hco - omjer duljine glave i najveće visine glave; lac/H - omjer najveće širine tijela i najveće visine tijela; lac/SL - omjer najveće širine tijela i standardne duljine; H/SL - omjer najveće visine tijela i standardne duljine; h/SL - omjer najmanje visine tijela i standardne duljine; h/lpc - omjer najmanje visine tijela i duljine repnog drška

5.2 Meristika

5.2.1 Šipčice u perajama

U tablici 6 se nalaze podaci o broju tvrdih i mekih (segmentiranih) šipčica parnih i neparnih peraja za sve 4 populacije. Broj šipčica se razlikovao među populacijama.

Tablica 6. Broj tvrdih i mekih šipčica u perajama istraživanih populacija roda *Alburnus*. Nerazgranate (tvrde) šipčice označene su rimskim brojevima, a razgranate (meke) šipčice arapskim brojevima. Posljednje dvije razgranate šipčice u leđnoj i podrepnoj peraji velike pliske nastavljaju se na jednu distalnu perajnu potporu te se označuju kao "1½"

vrsta	lokacija	podrepna	repna	trbušna	prsna	leđna
<i>A. sarmaticus</i>	Kupa	I(12½-15½)	14-16	I(7-9)	I(9-14)	I6(½)-8(½)
<i>A. sarmaticus</i>	Dobra	I(14½-16½)	15-17	I(7-8)	I(12-13)	I7(½)-8(½)
<i>A. sarmaticus</i>	Mrežnica	I(13½-16½)	14-17	I(8-9)	I(11-13)	I6(½)-8(½)
<i>A. alburnus</i>	Dunav	I(15½-19½)	14-18	I(6-8)	I(10-13)	I6(½)-7(½)

* slovima su označene: (A) podrepna, (D) leđna, (C) repna, (P) prsna, (V) trbušna peraja

5.2.2 Ljuske

U tablici 7 prikazan je broj ljusaka istraživanih populacija *A. sarmaticus* i *A. alburnus*.

Populacija *A. sarmaticus* iz rijeke Kupe izdvaja se kao populacija s najvećim brojem ljusaka u bočnoj pruzi. Slijedi je populacija *A. sarmaticus* iz Mrežnice kod koje je zabilježen i najveći raspon ljusaka. S druge strane, populacija *A. alburnus* iz Dunava broji najmanje ljusaka u bočnoj pruzi, a ujedno ima i najmanji raspon istih.

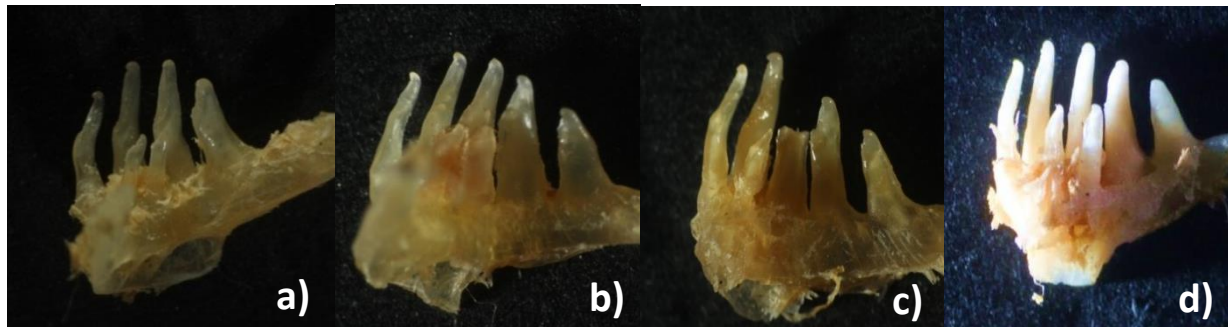
Populacije iz Kupe i Mrežnice imale su najveći broj ljusaka iznad bočne pruge, a populacija *A. alburnus* iz Dunava najmanji. Broj ljusaka ispod bočne pruge bio je prilično ujednačen među populacijama.

Tablica 7. Broj ljusaka istraživanih populacija brojan po dužini bočne pruge, iznad bočne pruge i ispod bočne pruge.

vrsta	lokacija	bočna pruga/med	iznad	ispod
<i>A. sarmaticus</i>	Kupa	52-62 (58)	7½ - 11½ (9.5)	2½ - 4½ (3.5)
<i>A. sarmaticus</i>	Dobra	44-53 (48.5)	7½ - 8½ (8)	3½ (3.5)
<i>A. sarmaticus</i>	Mrežnica	45-65 (55.5)	6½ - 9½ (9.5)	3½ - 4½ (3.5)
<i>A. alburnus</i>	Dunav	39 – 47 (42)	4½ - 8½ (7.5)	2½ - 4½ (3.5)

5.2.3 Ždrijelni zubi

Analizom ždrijelnih zubi dobiven je uvid u osnovni oblik i broj zubi preobraženih škržnih lukova. Kod svih populacija zubi su se nalazili u dva reda i morfološki su bili vrlo slični. Populacija *A. sarmaticus* iz Kupe imala je formulu 4-2. Populacija iz Dobre imala je također formulu 4-2, ali i 5-2. Populacija *A. sarmaticus* iz Mrežnice ukazala je na variranje ždrijelnih zubi od formule 5-1 do 4-2. Kod vrste *A. alburnus* iz Dunava, uočena je formula 4-2 te 5-2 (Slika 7).



Slika 7. Ždrijelni zubi istraživanih populacija: a) *A. sarmaticus* (Kupa), b) *A. sarmaticus* (Dobra), c) *A. sarmaticus* (Mrežnica), d) *A. alburnus* (Dunav)

5.3 Statističke analize omjera

5.3.1 ANOVA – morfometrijski omjeri

Analiza varijance morfometrijskih omjera pokazala je da postoji razlika između uzoraka jedinki svih populacija u 18 omjera. Razlika nije pronađena u 12 omjera kao što je prikazano u tablici 7.

Tablica 7. Alfa-vrijednosti dobivene analizom varijance (ANOVA-om) kojom su uspoređeni morfometrijski odnosi svih populacija. Statistički značajne razlike ($\alpha < 0,05$) su zatamnjene.

SL/TL	0,902724
Lc/SL	0,000002
pan/SL	0,000127
pA/SL	0,000377
pV/SL	0,000026
pD/SL	0,415376
lpc/SL	0,019134
Van/SL	0,000795
ID/SL	0,306015
IA/SL	0,005724
IC/SL	0,757866
IP/SL	0,254327
IV/SL	0,189331
hco/H	0,000000
h/H	0,115084
lac/laco	0,000000

Tablica 7. Nastavak.

io/laco	0,003242
io/Lc	0,184676
Oh/Lc	0,093669
prO/Lc	0,000126
poO/Lc	0,000278
laco/SL	0,000014
laco/Lc	0,132286
laco/hco	0,088341
Lc/hco	0,282339
lac/H	0,000012
lac/SL	0,000000
H/Sl	0,000119
h/Sl	0,009955
h/lpc	0,001864

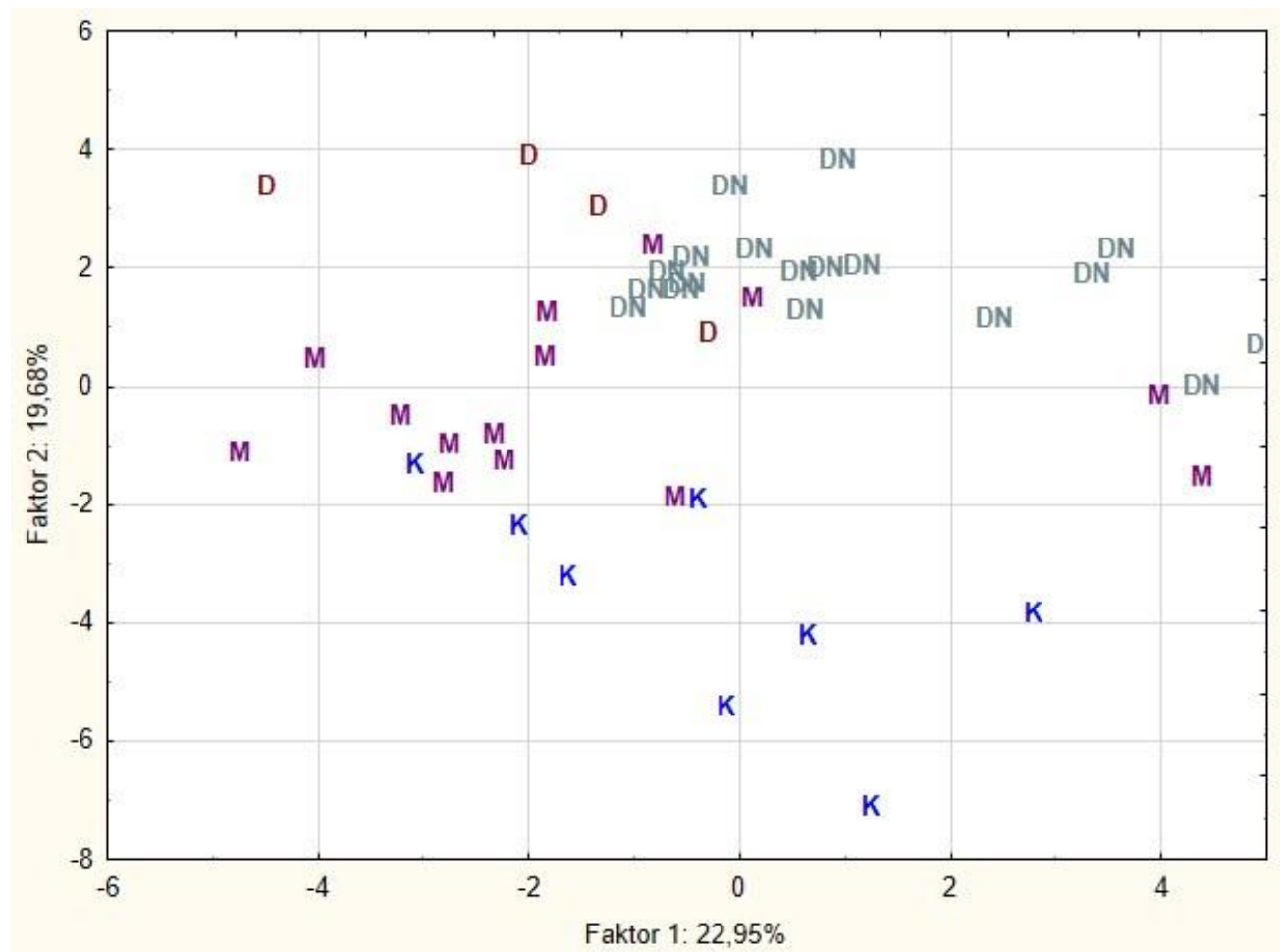
* SL/TL - omjer standardne duljine i ukupne duljine tijela; Lc/SL - omjer duljine glave i standardne duljine tijela; Pan/SL - omjer preanalne duljine i standardne duljine tijela; pA/SL - omjer preanalne udaljenosti i standardne duljine tijela; pV/SL - omjer preventralne udaljenosti i standardne duljine tijela; pD/SL - omjer predorzalne udaljenosti i i standardne duljine tijela; lpc/SL - omjer duljine repnog drška i standardne duljine tijela; Van/SL - omjer ventroanalne duljine i standardne duljine tijela; ID/SL - omjer duljine baze leđne peraje i standardne duljine tijela; IA/SL - omjer duljine baze podrepne peraje i standardne duljine tijela; IC/SL - omjer duljine repne peraje i standardne duljine tijela; IP/SL - omjer duljine prsne peraje i standardne duljine tijela; IV/SL - omjer duljine trbušne peraje i standardne duljine tijela; hco/H - omjer visine glave i najveće visine tijela; h/H - omjer najmanje visine tijela i najveće visine tijela; lac/laco - omjer najveće širine tijela i najveće širine glave; io/laco - omjer širine međuočnog prostora i najveće širine glave; io/Lc - omjer širine međuočnog prostora i duljine glave; Oh/Lc - omjer promjera oka i duljine glave; prO/Lc - omjer duljine predočnog prostora i duljine glave; poO/Lc - omjer zaočnog prostora i duljine glave; laco/SL - omjer najveće širine glave i standardne duljine tijela; laco/Lc - omjer najveće širine glave i duljine glave; laco/hco - omjer najveće širine glave i najveće visine glave; Lc/hco - omjer duljine glave i najveće visine glave; lac/H - omjer najveće širine tijela i najveće visine tijela; lac/SL - omjer najveće širine tijela i standardne duljine; H/SL - omjer najveće visine tijela i standardne duljine; h/SL - omjer najmanje visine tijela i standardne duljine; h/lpc - omjer najmanje visine tijela i duljine repnog drška

Kako bi se utvrdilo između kojih omjera postoji značajna razlika, provedena je post hoc usporedba primjenjujući Fisherov LSD test. Po omjeru Lc/SL, Kupa se statistički značajno razlikovala od svih populacija. Populacija *A. alburnus* iz rijeke Dunav, statistički se razlikovala po omjeru pan/SL i prO/Lc od ostalih populacija. Ista populacija se statistički značajno razlikovala i po omjeru pA/SL od populacije iz Kupe i Mrežnice. Omjerom pV/SL, populacija iz Kupe se razlikovala od populacija iz Dobre i Dunava. Po istom omjeru se razlikovala i populacija iz Dunava od one iz Mrežnice. Gledajući odnos lpc/SL, izdvojila se Kupa koja se statistički značajno razlikovala od populacija iz Dunava i Mrežnice. Odnos Van/SL bio je prilično neujednačen među populacijama. Populacija iz Kupe razlikovala se od populacije iz Dobre i Mrežnice. Dobra se također razlikovala od Dunava, kao i Dunav od Mrežnice. Populacija *A. alburnus* iz Dunava, statistički se značajno razlikovala od populacija iz Kupe i Mrežnice po odnosu IA/SL. Odnos IV/SL kao i h/H se razlikovao između populacije iz Dobre i Dunava. Po odnosu hco/H, sve su se populacije statistički značajno razlikovale. Po odnosu lac/laco, sve su se populacije razlikovale osim Mrežnice i Dunava. Populacija iz Dobre se izdvojila od svih populacija po odnosu io/laco. Gledajući odnos Oh/Lc, razlikovale su se populacije iz Kupe i Mrežnice. Odnos poO/Lc, nije bi bio ujednačen između populacija iz Dunava i Kupe, kao i Dunava i Mrežnice. Populacija *A. sarmaticus* iz rijeke Kupe, statistički se značajno razlikovala po odnosu laco/SL od populacija iz Dobre i Dunava. Po istom omjeru razlikovale su se i populacije iz Mrežnice i Dunava. Populacija iz Kupe se razlikovala od populacija iz Dunava po odnosu laco/hco, a Mrežnice od Kupe i Dunava po odnosu lac/H. Odnos lac/SL, razlikovao se među svim populacijama osim između Kupe i Mrežnice, kao i odnos H/Sl koji je se nije razlikovao samo između Dunava i Mrežnice. Populacija iz Kupe se statistički značajno razlikovala od ostalih populacija po odnosu h/Sl i h/lpc.

5.3.2 Analiza glavnih komponenata morfometrijskih omjera

Metodom analize glavnih komponenata (PCA) uspoređene su jedinke sa svih lokacija istraživanja s obzirom na sve morfometrijske odnose. Na slici 8 nalazi se grafički prikaz analize PCA za sve populacije na temelju svih omjera, gdje se na osi x nalazi faktor 1, a na osi y faktor 2. Faktor 1 obuhvaća približno 22,95% ukupne varijabilnosti, a najviše je određen odnosima

pan/SL, pA/SL i Pd/SL. Sve populacije zauzimaju dosta veliki prostor na grafu. Najvećim dijelom grafa se proteže populacija iz Mrežnice. Iako ne postoji značajnije izdvajanje između populacija, populacija iz Kupe se ipak blago izdvaja po omjerima od ostalih. Vidljivo je također i preklapanje populacija iz Dobre, Mrežnice i Dunava, a jednim dijelom i Kupe i Mrežnice.



Slika 8. Projekcija svih standardiziranih omjera istraživanih populacija na ravninu određenu faktorima 1 i 2 PCA-analize. Faktor 1 obuhvaća 22,95% ukupne varijabilnosti. Faktor 2 obuhvaća 19,68% ukupne varijabilnosti. Legenda: K – Kupa (*A. sarmaticus*), D – Dobra (*A. sarmaticus*), M – Mrežnica (*A. sarmaticus*), DN – Dunav (*A. alburnus*).

5.4 Filogenetska analiza

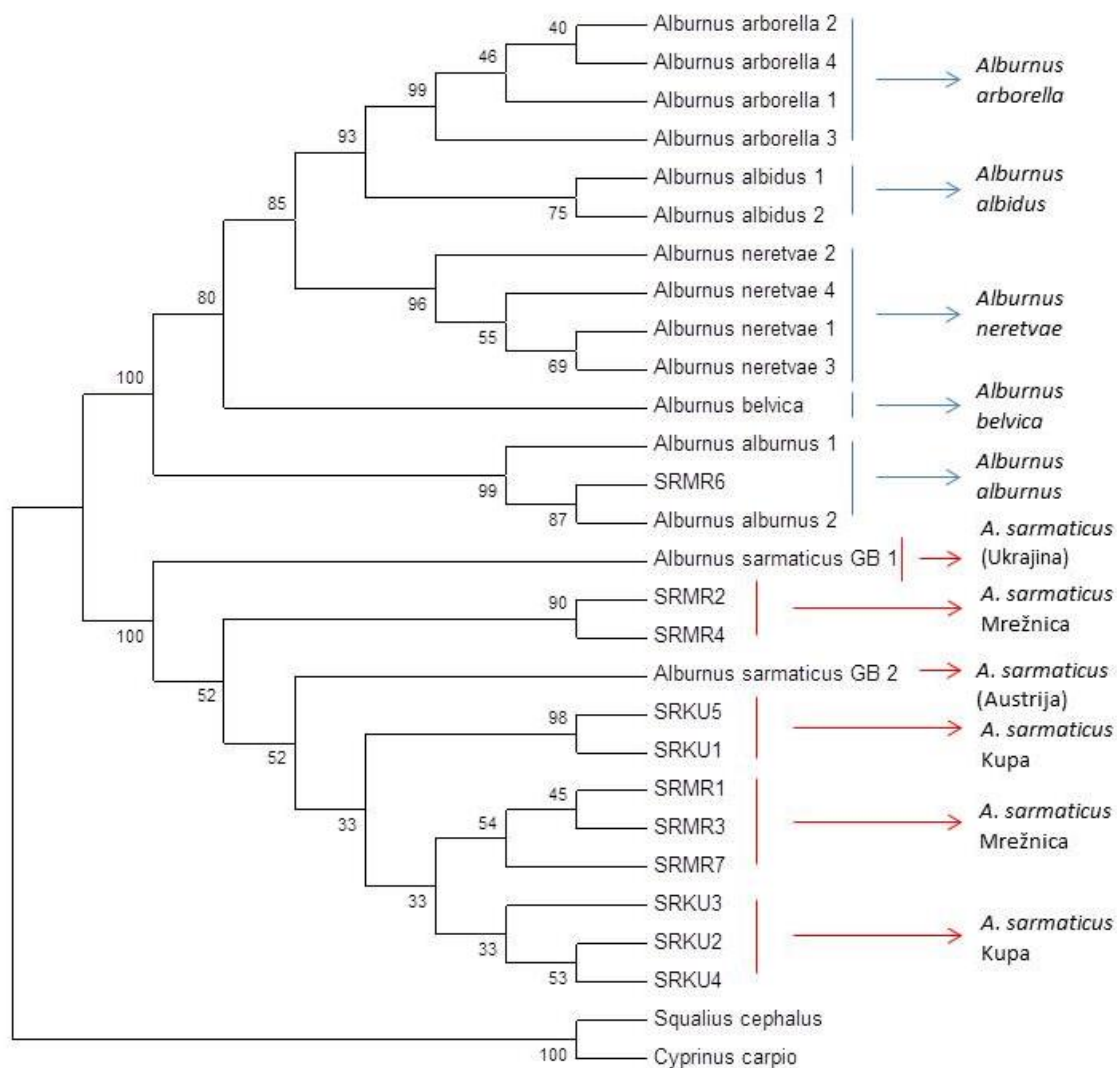
5.4.1 DNA polimorfizam istraživanih populacija

Među 11 sekvenci gena za *cyt b* ukupno je pronađeno 7 polimorfni mjesta i 7 mutacija. Raznolikost pronađenih 6 haplotipova (h) iznosi 0.889. Nukleotidna raznolikost (π) iznosi 0.00234, a prosječan broj razlika nukleotida (k) je 2.667.

Unutar 6 sekvenci gena za *cyt b* za populaciju iz rijeke Mrežnice pronađena su 3 polimorfna mjesta i 3 mutacije. Otkrivena su 2 haplotipa (h) s raznolikošću od 0.600. Nukleotidna raznolikost (π) iznosi 0.00158, dok prosječan broj razlika nukleotida (k) iznosi 1.800.

Među 5 sekvenci gena za *cyt b* populacije iz rijeke Kupe pronađeno je 5 polimorfni mjesta i 5 mutacija. Raznolikost pronađena 4 haplotipa (h) iznosi 0.900. Nukleotidna raznolikost (π) iznosi 0.00246, a prosječan broj razlika nukleotida (k) je 2.800.

5.4.2 Rezultati filogenetske rekonstrukcije metodom maksimalne parsimonije (MP)

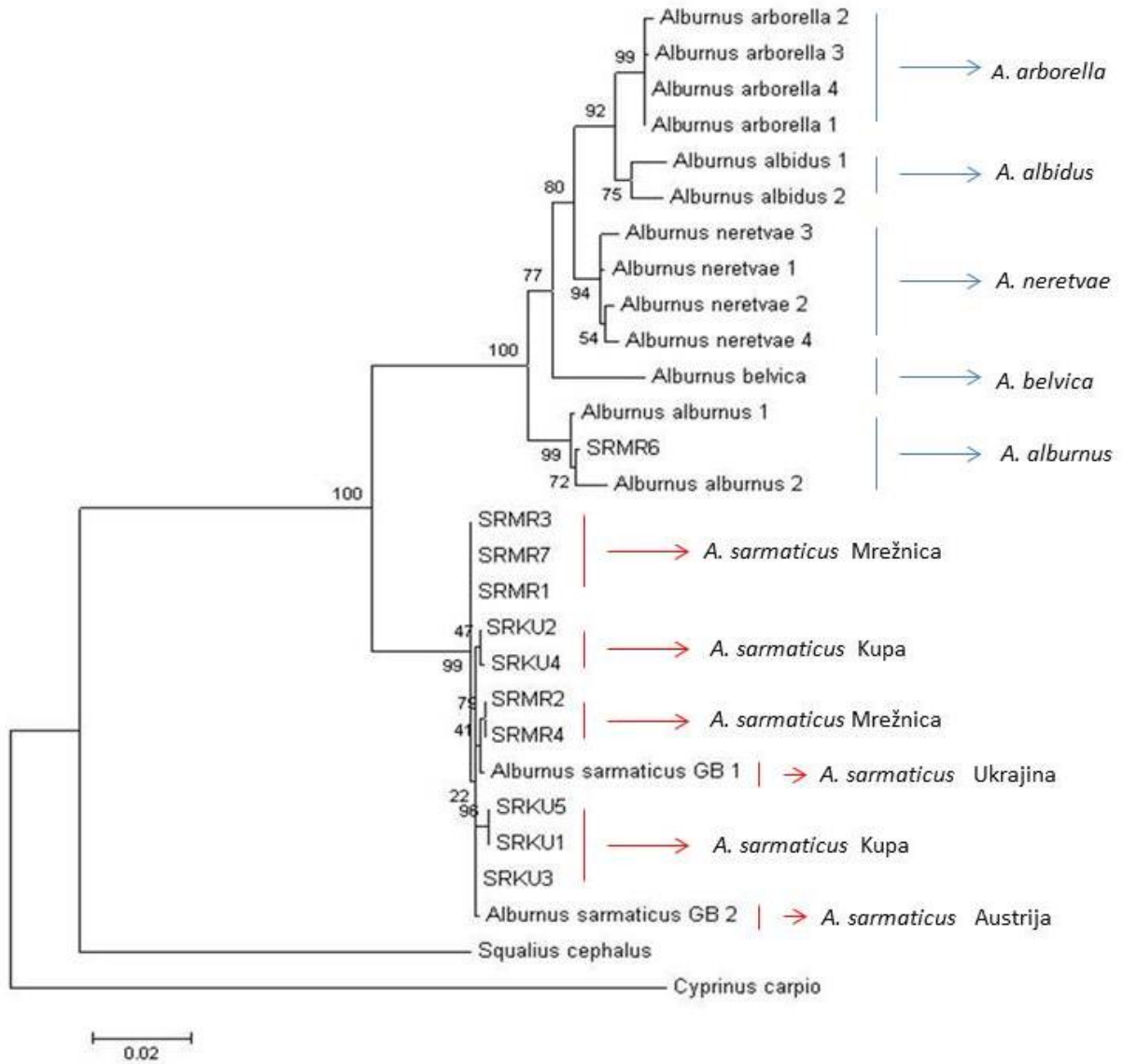


— Uklje

— *Alburnus sarmaticus*

Slika 10. Filogenetsko stablo haplotipova dobiveno metodom maksimalne parsimonije. Brojevi pokraj čvorova prikazuju vrijednosti podržanosti.

5.4.3 Rezultati filogenetske rekonstrukcije metodom najveće vjerojatnosti (ML)



— Uklje — *Alburnus sarmaticus*

Slika 11. Filogenetsko stablo haplotipova dobiveno metodom maksimalne vjerojatnosti. Brojevi pokraj čvorova prikazuju vrijednosti podržanosti.

Na slikama 10 i 11 prikazani su filogrami dobiveni metodom najveće parsimonije i metodom najveće vjerojatnosti. Na oba filograma se vidi jasna podjela između uklija *A. arborella*, *A. albidus*, *A. neretvae*, *A. belvica* i *A. alburnus* čije su sekvence izvađene iz banke gena, te grupe *A. sarmaticus* (Kupa i Mrežnica) koja je predmet ovog istraživanja. Duljina filogenetskog stabla dobivenog metodom najveće parsimonije iznosi 432, indeks konzistencije (CI) = 0.675889; indeks retencije (RI) = 0.904983. ML analizom dobiveno je stablo čija logaritamska vrijednost (-lnL) iznosi 3618.03. Stabla dobivena MP i ML analizom, rezultiraju sličnom topologijom, odnosno ukazuju na isto, te vrlo dobrom podržanosti vanjskih grananja.

6 RASPRAVA

Rod *Alburnus*, pripadnik porodice Cyprinidae, uključuje 43 vrste koje su široko rasprostranjene duž Europe i sjevernog dijela zapadne Azije. Međutim, do sada je u Hrvatskoj provedeno vrlo malo istraživanja vezanih uz ovaj rod, a o stanju populacije *A. sarmaticus* se ne zna gotovo ništa. Ovaj rad je prvo istraživanje o morfologiji i genetici ove vrste u Hrvatskoj. Stoga je cilj ovog istraživanja bio: opisati morfološke i genetičke karakteristike populacija vrsta *A. sarmaticus* u Hrvatskoj, utvrditi filogenetski položaj i srodstvene odnose populacije velike pliske u Hrvatskoj u odnosu na srodne vrste. Zatim, usporediti rezultate dobivene morfometrijskim i filogenetskim metodama s literaturnim podacima iste vrste u drugim područjima te odrediti razinu interpopulacijske i intrapopulacijske raznolikosti u genetskim i morfološkim značajkama. U ovo istraživanje uključene su jedinke *A. sarmaticus* s triju različitih rijeka – Kupe, Dobre i Mrežnice. Također, radi usporedbe je u istraživanje uključena i vrsta *A. alburnus* prikupljena u rijeci Dunav. Donošenje zaključaka o taksonomiji nije dovoljno samo temeljiti na morfologiji, već je potrebno uzeti u obzir i genetiku.

6.1 Morfometrija

Najveća ukupna duljina tijela zabilježena je kod jedinki iz rijeke Dobre, a najmanja kod jedinki iz Kupe. Situacija ostaje nepromjenjena i kod standardne duljine. Prema ovim rezultatima, moglo bi se pretpostaviti da jedinke iz rijeke Dobre imaju nešto povoljnije ekološke uvjete te bolje iskorištavaju resurse, a sukladno tome imaju i veću duljinu. Ipak, uzorkovanje ovih populacija odvijalo se kroz dosta dugo vremensko razdoblje unutar 11 godina kao i u različite mjesece. Stoga, postoji mogućnost da su različita starosna struktura i stanišni uvjeti tokom vremena uzorkovanja rezultirali razlikama u duljini tijela. Prema Kottelat i Freyhof (2007), maksimalna standardna duljina tijela vrste *A. sarmaticus* može dostići 250 mm. U ovom istraživanju, najveća standardna duljina zabilježena kod jedinke iz rijeke Dobre, iznosila je 136 mm.

Jedan od razloga bi možda mogao biti posljedica izlivanja polikloriranih bifenila (PBC) iz bivše tvornice kondenzatora u Sloveniji. Ovaj incident otkriven je 1983. godine. Moguće da je do zagađenja došlo preko rijeke Krupe, koja se ulijeva u Lahinju koja je glavni pritok rijeke Kupe. Jednom ispušteni u okoliš, ovi se spojevi vrlo teško razgrađuju i opstaju duže vrijeme u prirodi progresivno se nagomilavajući (Kmetič i sur., 2012). Posebice u masnim tkivima pojedinih pripadnika ekološkog lanca prehrane (Sobek i sur.,2010). Iako još nema dokaza da je ovaj incident direktno utjecao na rast riba, možda im je bio smanjen izbor prehrane što je pridonijelo smanjenom rastu. S druge strane, razlici u duljinama ovih populacija može pridonijeti razlika u kemizmu vode (otopljeni kisik, temperatura, amonijak i sl.) kao i sastav zajednica organizama.

Analizom varijance (ANOVA-om) su uspoređeni morfometrijski odnosi svih populacija te je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u 18 omjera. Po omjerima se najviše razlikovala populacija iz Kupe od ostalih populacija, dok su se populacije iz Mrežnice i Dobre razlikovale u svega 5 omjera. Razlog tome bi mogao biti isto klimatsko područje ovih dviju rijeka. Rezultati analize varijance su u skladu s rezultatima dobivenim deskriptivnom statistikom u kojima se također populacija iz Kupe izdvajala. Najveća razlika je uočena među populacijama *A. sarmaticus* iz Kupe i *A. alburnus* iz Dunava. Razlikovale su se u 16 od 30 omjera. S obzirom da je *A. alburnus* druga vrsta, ovaj rezultat je bio i očekivan.

Analizom glavnih komponenata projiciran je graf na kojemu se može uočiti da sve populacije zauzimaju dosta veliki prostor na grafu što upućuje na interpopulacijsku raznolikost. Najvećim dijelom grafa se proteže populacija iz Mrežnice što bi moglo ukazati na to da je po morfometrijskim omjerima najraznolikija skupina. Iako ne postoji značajnije izdvajanje između populacija, populacija iz Kupe se ipak pomalo izdvaja po omjerima od ostalih što bi moglo uputiti na to da je ona najrazličitija od istraživanih populacija. Ovo ujedno potvrđuje i rezultate deskriptivne statistike. Vidljivo je također i preklapanje populacija čemu vjerojatno pridonose ekološki čimbenici i geografska blizina istraživanog područja. Najviše se preklapaju jedinke iz Dobre, Mrežnice i Dunava što je potvrdio i Fisherov LSD test.

6.2 Meristika

Za vrstu *A. sarmaticus* u literaturi je naveden samo broj šipčica u podreproj peraji, a prema Freyhof i Kottelat (2007) iznosi 15-17½ mekih razgranatih šipčica. Od 8 jedinki *A. sarmaticus* iz rijeke Kupe dvije jedinke su imale 12½ razgranatih šipčica, dvije 13½, dvije 14½ i dvije 15½. Broj šipčica populacije iz Kupe bio je manji od literaturnih podataka. Stoga, postoji mogućnost da su jedinke iz ove populacije doživjele stres u prošlosti. Povod stresu je vjerojatno ekološka katastrofa navedena u prethodnom poglavlju. Broj šipčica u podreproj peraji kod 11 od 15 jedinki *A. sarmaticus* iz rijeke Mrežnice odgovarao je literaturnim podacima.

Literatura Kottelat i Freyhof (2007) navodi da se broj ljustica bočne pruge kreće od 56-63 (+4-5). Populacija *A. sarmaticus* iz Kupe je uglavnom bila u skladu s literaturnim podacima, dok je populacija iz Dobre imala nešto manji broj ljustica u bočnoj pruzi nego što je navedeno u literaturi. Populacija iz Mrežnice imala je najveći raspon ljustica bočne pruge. Ljustice ribama osiguravaju zaštitu i omogućuju djelotvorno kretanje vode preko tijela, a da pritom omogućuju ribi slobodno kretanje. Uz to, ako jedinke imaju više ljustica, može biti da im je trebala bolja zaštita od predatora. Stoga, manjem broju ljustica populacije iz Dobre su pridonijeli povoljniji ekološki uvjeti, kao što je i prethodno navedeno jer su ujedno i najveće duljine. Bez obzira, treba napomenuti da su uzorci duže vrijeme čuvani u alkoholu pa točnost rezultata ne možemo uzeti kao apsolutnu. Osim toga, dolazilo je i do oštećenja i deformacija uslijed skladištenja što je zasigurno pridonijelo varijabilnosti. Ljustice su dosta osjetljive i podložne promjenama.

6.3 Filogenija

Filogenetska stabla proizašla metodom najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti, ukazali su na podjelu između vrsta *A. sarmaticus* i drugih vrsta roda *Alburnus*. Dakle, nakon odvajanja od zajedničkog pretka, imale su odvojene tijekove evolucije. Iz oba stabla, može se uočiti kako populacije velike pliske tvore sestrinsku grupu u odnosu na ostale istraživane vrste, što znači da su udaljenije od ostalih vrsta nego što su ostale istraživane vrste međusobno. Sve

sekvence *A. sarmaticus*, osim jedne sekvence iz Mrežnice, uklopile su se u monofiletsku grupu što vodi k tome da imaju zajedničkog pretka. U istu liniju su se uklopile i vrste *A. sarmaticus* iz Ukrajine i Austrije. Ove vrste su ranije pripadale rodu *Chalcalburnus*. Filogenetski rezultati u ovom istraživanju navode na mogućnost da su navedene vrste iste kao i istraživane vrste u Hrvatskoj. Stoga bi trebalo daljnjim istraživanjima preispitati taksonomiju. Od velikih pliski, jedino se izdvojila sekvenca iz Mrežnice (SRMR6). Ovu pojavu bi mogla objasniti potencijalna hibridizacija s vrstom *A. alburnus*.

Ukupan uzorak istraživanih populacija *A. sarmaticus* ukazao je na visoku razinu genske raznolikosti iz koje proizlazi i visoka raznolikost haplotipova i velik broj mutacija koje su se nakupile bez ometanja. Zahvaljujući tome, vrste se uspješno bore s promjenama u okolišu. Genskoj raznolikosti ukupnog uzorka istraživanih populacija puno više je pridonijela populacija iz Kupe nego iz Mrežnice. Raznolikost haplotipova populacije iz Kupe iznosila je visokih 0.900. Također je uočen i veliki broj mutacija. Ovo bi moglo voditi k tome da je ova populacija proživljavala više stresa kroz prošlost i da su se mutacije javljale kao prilagodba stresu kako bi preživjela nepovoljne uvjete.

Bez obzira na dobivene rezultate, filogenetske analize su se provodile na malom broju sekvenci. Stoga su svakako nužna daljnja istraživanja.

7 ZAKLJUČAK

- Standardne duljine populacija *A. sarmaticus* iznosile su: Kupa – 88,5 mm; Dobra – 124,5 mm; Mrežnica – 106,86 mm. Literaturni podaci navode da može dostići do 250 mm
- Analiza varijance morfometrijskih omjera pokazala je da postoji razlika između uzoraka jedinki svih populacija u 18 od 30 omjera
- Analizom glavnih komponenta (PCA) uočeno je blago izdvajanje populacija iz Kupe i preklapanje populacija iz Dobre, Mrežnice i Dunava
- Ukupni uzorak istraživanih populacija *A. sarmaticus* imao je visoku razinu genske raznolikosti
- Genskoj raznolikosti više je pridonijela populacija *A. sarmaticus* iz Kupe nego iz Mrežnice
- U filogenetska stabla dobivena metodom najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti, u istu liniju kao i istraživane velike pliske iz Hrvatske, uklopile su se velike pliske iz Ukrajine i Austrije
- Filogenetske analize su se radile na malom broju sekvenci, stoga su nužna daljnja istraživanja

8 LITERATURA

1. Ambriović-Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Hranilović, D., Herak Bosnar, M., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija D. (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
2. Avise, J. C., Kessler, L. G., Saunders, N. C. (1986): Genetic Variation and Geographic Differentiation in Mitochondrial DNA of the Horseshoe Crab, LIMULUS POLYPHEMUS. 112: 613-27.
3. Berra, T., (2001): Freshwater fish distribution. Academic Press, San Diego, California, USA. 604.
4. Billard, R., Cosson, Fierville, F., Brun, R., Rouault T. and Williot, P. (1999): Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa. Journal of Applied Ichthyology, 15: 199–203.
5. Bogutskaya, N.G. (1997). Contribution to the knowledge of leuciscine fishes of Asia Minor. Part 2. An annotated check-list of leuciscine fishes (Leuciscinae, Cyprinidae) of Turkey with descriptions of a new species and two new subspecies. Mitt. Hamb. Zool. Mus. Inst. 94: 161-186.
6. Boschung, H. T., Mayden, R. L. (2004): *Fishes of Alabama*. Washington, D.C.: Smithsonian Books.
7. Briolay, J, Galtier, N, Brito, RM, Bouvet, Y. (1998): Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. Molecular Phylogenetic and Evolution. Pages 100 – 108.
8. Buj I., Vukić J., Šanda R., Perea S., Čaleta M., Marčić Z., Bogut I., Povž M. i Mrakovčić M. (2010): Morphological comparison of bleaks (*Alburnus*, Cyprinidae) from the Adriatic Basin with the description of a new species. Folia zoologica, 59: 129 – 141.

9. Cabral, H.N., Marques, J.F., Rego, A.L., Catarino, A.I., Figueiredo, J. i García, J. (2003): Genetic and morphological variation of *Synaptura lusitanica* Capello, 1868, along the Portuguese coast. *Journal of Sea Research*, 50: 167-175.
10. Castresana, J. (2001): Cytochrome *b* phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 465-71.
11. Cowx, I. G., Collares-Pereira, M. J. (2002): Freshwater fish conservation: options for the future. In Collares-Pereira, M. J., M. Coelho & I. Cowx. *Conservation of Freshwater Fishes: Options for the Future*. Oxford, Blackwell Science: 443-452.
12. 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.
13. Descy, J., Empain, A. (1984): *Ecology of European rivers*, Blackwell Scientific Publications. Oxford: 1-23.
14. Dimovski, A. and Grupce R. (1975): Morfometriški karakteristiki na *Alburnus alburnus macedonicus* Kar. (Pisces: Cyprinidae) od Dojranskoto Ezero i nivna promena za vreme na rastot. *Ann. Fac. Sci. Univer. Skopje. Ser. Biol.* 27/28: 267-279.
15. Farias, I. P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H., Meyer, A. (2001): The cytochrome *b* gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53: 89-103.
16. Foote, C.J., Wood, C.C. i Withler, R.E. (1989): Biochemical genetic comparison of sockeye salmon and kokane, the anadromus and nonanadromus forms of *Oncorhynchus nerka*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46: 149-158.
17. Freyhof, J. and M. Kottelat, (2007). Review of the *Alburnus mento* species group with description of two new species (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 18: 213-225.

18. Freyhof, J., Lieckfeldt, D., Bogutskaya, N.G., Pitra, C. i Ludwig, A. (2006): Phylogenetic position of the Dalmatian genus *Phoxinellus* and description of the newly proposed genus *Delminichthys* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 38: 416-425.
19. 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: 95-98.
20. Heincke, D.F., (1898): Naturgesichte des herring. *Abhandlungen Doutsch Seefisch Verein*, 2: 128-233.
21. Hillis, D.M., Bull J.J. (1993): An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42: 182 – 192.
22. Hršak, V., Leko, K., Trenc, N., Podavec Vukelić V., Duplić, A., Čivić, K., Žeger, Pleše, I., Božičević, S., Alegro, A., Hruševar, D., Posavec, K. (2010): Stručna podloga za zaštitu poriječja rijeke Mrežnice. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
23. Kluge, A.G., Farris J. S., (1969): "Quantitative Phyletics and the Evolution of Anurans". *Systematic Zoology*, 18: 1–32.
24. Kolz, A.L., Reynolds, J.B. (1989): Electrofishing, a power related phenomenon. U.S. Fish and Wildlife Service Fish and Wildlife Technical Report 22, Washington DC, 24 str.
25. Kottelat, M. (1998): European freshwater fishes, *Environmental Biology of Fishes*. 116–116.
26. Kottelat, M., Freyhof, J. (2007): Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany.
27. Kováč V., Copp G.H. i Francis M.P. (1999): Morphometra of the stone loach, *Barbatula barbatula*: do mensural characters reflect the species' life history thresholds. *Environmental Biology of Fishes*, 56: 105-115.
28. Mau, B., Newton, M., Larget, B., (1999): Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte carlo methods. *Biometrics*, 55: 1-12.

29. McQuinn, I.H. (1997): Metapopulations and Atlantic herring. *Reviews in Fish biology and Fisheries*, 7: 297-329.
30. Mount, D.W. (2001): *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 564.
31. Nei, M. (1996): Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu Rev Genet* 30: 371-403.
32. Nelson J.S. (2006): *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey. 602 str.
33. Patwardhan, A., Ray, S. and Roy, A. (2014): Molecular Markers in Phylogenetic Studies—A Review. *Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2: 1-9.
34. Petz, B. (1997): *Osnovne statističke metode za nematematičare*. Naklada Slap, Jastrebarsko.
35. Reynolds J. B. (1996): Electrofishing. U Murphy B. R. I Willis W. D. (ur.): *Fisheries Techniques*, 2nd edition. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland: 221 – 253.
36. Saitoh, K., Sado, T., Mayden, R.L., Hanzawa, N., Nakamura, K., Nishida, M. and Miya, M. (2006): Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): the first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 63: 826-841.
37. Snyder, D.E. (2003): Invited overview: conclusions from a review of electrofishing and its harmful effects on fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13: 445-453.
38. Sobek, A., McLachlan, M.S., Borgå, K., Asplund, L., Lundstedt-Enkel, K., Polder, A., Gustafsson, Ö. (2010): A comparison of PCB bioaccumulation factors between an arctic and a temperate marine food web, *Science of the Total Environment*, 408: 2753-2760.
39. Tamura K., Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-9.

40. Tobe, S., Kitchener, A., Adrian M. T. (2010): Reconstructing Mammalian Phylogenies: A Detailed Comparison of the Cytochrome *b* and Cytochrome Oxidase Subunit I Mitochondrial Genes. PLoS ONE 5: e14156.
41. Tsigenopoulos C. S., Berrebi, P. (2000): Molecular phylogeny of north mediterranean freshwater barbs (genus *Barbus*: cyprinidae) inferred from cytochrome *b* sequences: biogeographic and systematic implications. Molecular Phylogenetic and Evolution, 14: 165-79.
42. Vuković, T., i Ivanović, B. (1971): Slatkovodne ribe Jugoslavije. Zemaljski muzej BiH, Sarajevo: 134-135.
43. West-Eberhard M.J. (2003): Developmental Plasticity and Evolution. Oxford Univ. Press.353-376.
44. Zalewski M. i Cowx I.G. (1990): Factors affecting the efficiency of electric fishing. U Cowx I.G. i Lamarque P. (urednici): Fishing with electricity: applications in freshwater fisheries management. Fishing News Books, Oxford, UK: 89-111.
45. Zardoya, R., Doadrio, I. (1998): Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical pattern of European cyprinids. Journal of Molecular Evolution 49: 227-237.

Internetski izvori:

<http://www.fishbase.org> (preuzeto: 20.09.2017)

www.gorskikotar.hr (preuzeto: 15.02.2018)

<http://www.iucnredlist.org/> (preuzeto 20.09.2017)

<http://www.marinespecies.org/index.php> (preuzeto 01.10.2017)

9 ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime: Rebecca Konjuh

Datum rođenja: 02.11.1991

Email adresa: rebecca.konjuh1991@gmail.com

RADNO ISKUSTVO

01/04/2017 – 01/10/2017 – Prodajni agent u putničkoj agenciji

01/12/2015 – 15/03/2017 – Promotor u gradskim ljekarnama

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

09/2015–danas -Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički, Zagreb (Hrvatska),

Ms studij: Ekologija i zaštita prirode, more

2012 – 2015 - Univ. bacc. ing. aquacult.. (Inženjer akvakulture)

Sveučilište u Dubrovniku, Odjel za akvakulturu; Dubrovnik (Hrvatska)

2006 – 2010 – Turistička i ugostiteljska škola, Dubrovnik (Hrvatska)

1998 – 2006 – Osnovna škola Marina Getaldića, Dubrovnik (Hrvatska)

ZNANJA I VJEŠTINE

Materinski jezik: hrvatski

Strani jezici: engleski jezik – aktivno u govoru i pismu, B2;

talijanski jezik – aktivno u govoru i pismu, B2

Računalne vještine: Microsoft Office, Microsoft Excel, Rstudio

Vozačka dozvola: B kategorija