

Morfološko i molekularno razlikovanje filogenetskih linija potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758)

Ivić, Lucija

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:217:078787>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Lucija Ivić

**Morfološko i molekularno razlikovanje filogenetskih linija potočne pastrve (*Salmo trutta*
Linnaeus, 1758)**

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 magistra ekologije i zaštite prirode.

Zahvale

Veliko hvala mojoj dragoj mentorici doc.dr.sc. Ivani Buj na velikom strpljenju, dobroti i nesebičnosti i što mi je dala priliku za ovako zanimljiv diplomski rad. Hvala dr.sc. Zoranu Marčiću, doc.dr.sc. Marku Čaleti, Svenu Horvatiću, Romanu Karloviću i Siniši Vajdiću za pomoć pri prikupljanju uzoraka i literature. Veliko hvala Luciji Raguž na društvu i veselju tijekom rada na faksu i nesebičnoj pomoći.

Zahvaljujem se mojoj majci i sestri na podršci, ljubavi, razumijevanju i što su mi omogućile upis još jednog diplomskog. Bile ste i uvijek ćete biti moje lavice.

Hvala mojim prijateljima s faksa i dokolice što se nisu naljutili na mene zbog izbivanja. Najbolji ste.

Hvala Andrijani i Domagoju što su trpili moje cviljenje i prokrastinaciju. Ne znam tko je gore prošao. Obećavam da mi je zadnji.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Morfološko i molekularno razlikovanje filogenetskih linija potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758)

Lucija Ivić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) je slatkovodna riba iz porodice Salmonidae koja predstavlja gospodarski važnu vrstu te je najintenzivnije korištena slatkovodna riba na svijetu. Stoga je kontradiktorno da je njena taksonomija nesređena, kako u Hrvatskoj, tako i u svijetu, te se često naziva „sramotom europske ihtiologije“. Cilj ovog istraživanja bio je: morfološko opisivanje filogenetskih linija, utvrđivanje nukleotidnih pozicija i morfoloških svojstava koje predstavljaju fiksne, pouzdane determinacijske značajke pojedinih filogenetskih linija, te opisivanje morfološke i genske raznolikosti unutar pojedinih filogenetskih linija, a sve u svrhu rješavanja taksonomskog statusa potočne pastrve i na kraju zaštite same vrste. Kako bi se utvrdili srodstveni odnosi među populacijama unutar Hrvatske, provedena je filogenetska rekonstrukcija koja se temeljila na sekvencama gena za citokrom *b* pomoću metode najveće parsimonije, metode najveće vjerojatnosti i metode susjednog povezivanja. Za proučavanje morfologije koristila se deskriptivna statistika, analiza varijance i analiza glavnih komponenti, dok se za analize na molekularnoj razini koristila p-udaljenost i molekularna dijagnostika. Ovim se metodama utvrdilo da na području Hrvatske obitava minimalno 4 filogenetske linije koje se međusobno razlikuju u velikom broju mutacija i nukleotidnih dijagnostičkih mjesta, dok je morfološki dio istraživanja potvrdio da se radi o veoma prilagodljivoj i plastičnoj vrsti s velikim brojem morfotipova.

(54 stranice, 12 slika, 15 tablica, 71 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: pastrva, morfologija, filogenija, linije, citokrom *b*, taksonomija, dijagnostika

Voditelj: dr. sc. Ivana Buj, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Buj, doc.

dr. sc. Duje Lisičić, doc.

dr. sc. Ivana Šola, doc.

Rad prihvaćen: 07.06.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Morphological and molecular differentiation of the brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) phylogenetic lineages

Lucija Ivić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) is a freshwater fish from the Salmonidae family, which is an economically important species and the most intensive used freshwater fish in the world. It is therefore controversial that its taxonomy is disordered, both in Croatia and in the world, and is often termed as "the shame of European ichthyology". The aim of this study was to: morphologically describe the phylogenetic lines, determine the nucleotide positions and the morphological properties that represent fixed, reliable deterministic characteristics of certain phylogenetic lines, and describe the morphological and genetic diversity within certain phylogenetic lines, all in the purpose of resolution of the taxonomic status of brown trout and for the protection of the species. To determine relationships between the populations within Croatia, a phylogenetic reconstruction was used, based on cytochrome *b* gene sequences using the maximum parsimony, maximum likelihood and median joining. Descriptive statistics, analysis of variance and principal component analysis were used for the study of morphology, while p-distance and molecular diagnostics were used for analysis on molecular level. These methods have established that there are at least 4 phylogenetic lines in Croatia that differ in the large number of mutations and nucleotide diagnostic sites, while the morphological part of the study has confirmed that it is a highly adaptable and plastic species with big number of morphotypes.

(54 pages, 12 figures, 15 tables, 71 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: trout, morphology, phylogeny, lineages, cytochrome b, taxonomy, diagnostics

Supervisor: Dr. Ivana Buj, doc.

Reviewers: Dr. Ivana Buj, doc.

Dr. Duje Lisičić, doc.

Dr. Ivana Šola, doc.

Thesis accepted: 07.06.2018.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Opis potočne pastrve (<i>Salmo trutta</i> Linnaeus, 1758) | 1 |
| 1.1.1. Biologija vrste | 1 |
| 1.1.2. Sistematika i filogenija vrste | 3 |
| 1.1.3. Rasprostranjenost vrste i stanište | 6 |
| 1.1.4. Ugroženost i zaštita vrste | 8 |
| 1.2. Primjena morfologije i molekularne filogenije u znanstvenim istraživanjima ribljih populacija | 9 |
| 1.2.1. Morfometrija i meristika kao alati tradicionalne taksonomije | 10 |
| 1.2.2. Primjena molekularnih analiza i molekularne filogenije | 12 |
| 1.3. Cilj istraživanja | 14 |
| 2. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 2.1. Uzorkovanje | 15 |
| 2.2. Područje istraživanja | 16 |
| 2.3. Morfološka mjerenja i statistička obrada podataka | 18 |
| 2.4. Laboratorijski postupci - izolacija DNA, umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje | 20 |
| 2.5. Filogenetska rekonstrukcija | 21 |
| 2.6. Analiza svojti na molekularnoj razini | 23 |
| 3. REZULTATI | 24 |
| 3.1. Morfološko razlikovanje svojti | 24 |
| 3.1.1. Morfometrija | 24 |
| 3.1.2. Meristika i fenologija | 30 |
| 3.2. Filogenetska rekonstrukcija svojti | 32 |
| 3.3. Molekularno razlikovanje svojti | 37 |
| 4. RASPRAVA | 40 |
| 4.1. Filogenija potočne pastrve u Hrvatskoj | 40 |
| 4.2. Dijagnostička svojstva za razlikovanje linija potočne pastrve | 42 |
| 5. ZAKLJUČAK | 45 |
| 6. LITERATURA | 46 |
| 7. ŽIVOTOPIS | 52 |

1. UVOD

1.1. Opis potočne pastrve (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758)

Potočna pastrva (*Salmo trutta*) je slatkovodna vrsta ribe koja se već stoljećima koristi u prehrani i rekreaciji (ribolov) što je čini jednom od najvažnijih europskih slatkovodnih riba, kako u ekološkom tako i u ekonomsko-sociološkom smislu (Suárez i sur. 2001). Globalna raširenost potočne pastrve uzrokovala je njenu izrazitu morfološku i fenotipsku raznolikost, a time i potrebu za opsežnim znanstvenim istraživanjima genetike i evolucije ove vrste (Meraner i sur. 2013; Bernatchez 2001).

1.1.1. Biologija vrste

Poznato je da potočna pastrva dolazi u širokom spektru staništa, te je njena morfologija izuzetno plastična što predstavlja problem kod morfološkog opisivanja vrste (Meraner i sur. 2013; Freyhof 2011). Generalno se za potočnu pastrvu može reći da se radi o slatkovodnoj ribi vretenastog oblika tijela s dva para parnih, tri neparne peraje i jednom masnom perajom – odlikom svih salmonidnih riba. Sve parne i neparne peraje građene su od perajnih šipčica, čiji broj može varirati i između populacija. Jedino masna peraja ne sadrži perajne šipčice, već je građena od adipoznog tkiva (Klemetsen i sur. 2003). U prirodnim staništima, potočne pastrve su tamnije obojene na dorzalnoj strani tijela, a boja varira od maslinasto-zelene, smeđe i sivkaste pa do žute i bijele na svjetlijoj, ventralnoj strani tijela. Na trupu se nalaze mnogobrojne crne točkice, ponekad i crvene (**Slika 1**). Mlade (juvenilne) ribe često na sebi imaju manje točkica od odraslih, ali zato na trupu imaju izražene tamnije vertikalne pruge, koje postepeno nestaju kako riba stari (Klemetsen i sur. 2003).

Spolnu zrelost doseže s 2 do 3 godine starosti. Za vrijeme mrijesta izražen je spolni dimorfizam. Ženkama crveno nabubri spolni otvor, dok se mužjacima protruzijom donje vilice razvije specifičan kukasti „kljun“. Mrijest se odvija od kraja listopada do ožujka. Ženka odabire prigodno mjesto, najčešće kameno dno brzog toka, za odlaganje ikre (Freyhof 2011; Odak 2004).



Slika 1. Realna animacija potočne pastrve (preuzeto s: <https://fineartamerica.com/featured/brown-trout-autochthonous-indigenous-salmo-trutta-morpha-fario-salmo-trutta-fario-urft-valley-art.html> , pristupljeno 30.3.2018.)

Pastrve su teritorijalne životinje, a uspjeh u pronalaženju vlastitog teritorija ima pozitivan učinak na rast same jedinke (Freyhof 2011). Pastrve su predatori koji se hrane različitim organizmima: ribama, ličinkama vodenih kukaca, ikrom drugih riba, kukcima koji padnu na površinu vode, račićima i drugim beskralježnjacima, odnosno onim što uspiju pronaći unutar svog teritorija (Freyhof 2011; Odak 2004).

Neke grupe iz podreda Salmonoidei (u koji pripadaju i pastrve) su anadromne, koje veći dio života provode u morima, te migriraju u slatke vode za vrijeme mrijesta. Kod anadromnih slatkovodnih riba, primarna se metamorfoza događa za vrijeme nizvodnih migracija, a sekundarna tijekom uzvodnih migracija prije samog perioda mrijesta. Kod pripadnika roda *Salmo* dolazi do regresivne metamorfoze, odnosno do gubljenja morfoloških karakteristika nastalih sekundarnom metamorfozom (Odak 2004; Saunders i Schom 1985). Također je primijećeno da mlade jedinke nekih ekotipova taksona *Salmo trutta* (postoje tri tipa – jezerski, potočni i morski) imaju gensku predispoziciju za osmotsku prilagodbu na slanije vode, međutim mehanizam „okidanja“ fiziološke prilagodbe još uvijek nije poznat (Freyhof 2011).

1.1.2. Sistematika i filogenija vrste

Salmo trutta je slatkovodna riba iz porodice Salmonidae (pastrve). Klasifikacija vrste je prikazana u **Tablici 1**. Vrstu je prvi puta opisao poznati švedski zoolog i „otac moderne taksonomije“ (Calisher 2007) Carl Linnaeus 1758. godine, točnije, opisao je morski tip pastrve. Druga dva tipa pastrve je opisao kao različite vrste – *Salmo fario* Linnaeus 1758 (potočni tip) i *Salmo lacustris* Linnaeus 1758 (jezerski tip; Behnke 1986). Trostruki opis iste vrste Carla Linnaeusa bio je tek uvod u ono što će se dešavati s taksonomijom *Salmo trutta* u narednih dva stoljeća. Behnke još 1986. godine navodi kako je do tada opisano više od 50 različitih vrsta, dok danas mnogi autori smatraju da se zapravo radi o jednoj vrsti – *Salmo trutta*.

Tablica 1. Klasifikacija *Salmo trutta* (L., 1758) prema Nelson 2006.

| Sistematska kategorija | Naziv |
|------------------------|---------------------|
| Carstvo | Animalia |
| Koljeno | Chordata |
| Potkoljeno | Vertebrata |
| Međukoljeno | Gnathostomata |
| Nadrazred | Actinopterygii |
| Razred | Teleostei |
| Nadred | Protacanthopterygii |
| Red | Salmoniformes |
| Porodica | Salmonidae |
| Potporodica | Salmoninae |
| Rod | <i>Salmo</i> |
| Vrsta | <i>Salmo trutta</i> |

Jedan od problema je bio to što su znanstvenici koristili isključivo morfologiju i ekologiju životinje kako bi odredili vrstu, jer su tada molekularne metode još uvijek bile nepoznanica. To možda i ne bi bio toliki problem da ova vrsta pastrve nije izuzetno prilagodljiva na različite uvjete okoliša. Ta se plastičnost odražava na morfologiji i može biti jako zbunjujuća taksonomima jer genski različite populacije mogu izgledom nalikovati jedne drugoj, a genski slične populacije se potpuno razlikovati (Wheeler 1992). Jedan od primjera kako se okoliš

odražava na izgled jedinki je istaknut u radu Bernatcheza i suradnika (1992), gdje sekvence mitohondrijske deoksiribonukleinske kiseline (mtDNA) triju različitih ekoloških tipova pastrva nisu pokazale značajne međusobne razlike.

Razvitak molekularnih metoda omogućio je obnavljanje klasifikacije vrsta, među ostalima i roda *Salmo* (Phillips i Oakley 1997). Korištenjem metoda molekularne genetike, uočeno je da pastrve iz određenog geografskog područja imaju zajedničke genske karakteristike (Bernatchez 2001). Iz toga su Bernatchez i suradnici još 1992. godine utvrdili da postoji pet filogenetskih linija potočne pastrve u Europi: atlantska, dunavska, jadranska, mediteranska i *marmoratus* linija. Svaka linija vezana je za jedan od osnovnih riječnih sljevova u Europi i, prema Giuffra i sur. 1996, ima neka zajednička morfološka obilježja. Tako npr. dunavska linija ima jednoliko raspoređene crne i crvene točke po tijelu, dok je za atlantsku liniju karakteristična izrazita crna pigmentacija u prsnom dijelu. Kod jadranske i mediteranske linije, pojavljuju se četiri tamna pojasa (1 na glavi, 2 na trupu i 1 na repu) te sitna crna i crvena pigmentacija. Prisutna je visoka varijabilnost haplotipova čak i unutar linija, s dunavskom linijom kao genetički najraznolikijom, te mediteranskom i *marmoratus* kao najmanje raznolikima, što je moguće povezano s vremenom razdvajanja pojedinih linija. Smatra se da su se linije potočne pastrve pojavile kao posljedica geomorfoloških zbivanja u pleistocenu. Izmjene glacijala i interglacijala utjecale su na razinu mora, u interglacijalima se podizala, a u glacijalima se spuštala povezujući rijeke i omogućavajući ribama migracije iz jedne rijeke u drugu (Bernatchez 2001; Bianco 1990).

Iako istraživanja linija potočnih pastrva nisu stala 1992. već su se aktivno provodila (Apostolidis i sur. 2007; Jug i sur. 2005; Snoj i sur. 2002; Bernatchez 2001), danas još uvijek nije poznato koliko vrsta (podvrsta) i/ili linija postoji, gdje je točno granica linije i/ili vrste (podvrste) i da li je riječ o kompleksu vrsta. Tako prema Vukoviću i Ivanoviću (1971), u Hrvatskoj ne postoje linije potočne pastrve već je riječ o različitim vrstama i formama s različitim determinacijskim svojstvima (**Tablica 2**), dok Kottelat i Freyhof (2007) tvrde da je *Salmo trutta* u Hrvatskoj alohtona vrsta, dok su autohtone *Salmo farioides* (Karaman, 1924) i *Salmo dentex* (Heckel, 1851). Jedan bitan čimbenik je i da su navedene linije (prema Bernatchez i sur. 1992) prepoznate na temelju samo jednog genskog markera, što se smatra da nije dovoljno precizno kako bi se odredila populacijska struktura, srodstvo i porijeklo pastrva (Schenekar i sur. 2014). Te činjenice predstavljaju jedan dosta neobičan paradoks s obzirom da je potočna pastrva jedna od najsukobnijih slatkovodnih riba na svijetu i da je bila među prvim vrstama na kojima su rađena filogeografska istraživanja (Bernatchez 2001, Suárez i sur. 2001). Stoga

ne čudi kada se taksonomija potočne pastrve naziva još i „sramotom europske ihtiologije“ (Kottelat i Freyhof 2007).

Nasuprot mišljenju kako je u Europi prisutna samo vrsta *Salmo trutta* predstavljena s nekoliko linija, neki taksonomi (Kottelat i Freyhof 2007) smatraju da rod *Salmo* broji 29 vrsta, a u Hrvatskoj vjerojatno dolaze: *Salmo obtusirostris* Heckel, 1851, *Salmo (trutta) dentex* Heckel, 1851, *Salmo (trutta) marmoratus* Cuvier, 1829, *Salmo (trutta) visovacensis* Taler, 1950, *Salmo (trutta) zrmanjaensis* Karaman, 1938, *Salmo labrax* Pallas, 1814 i *Salmo farioides* Karaman, 1938 (Ćaleta i sur. 2015).

Tablica 2. Vrste potočnih pastrva u Hrvatskoj i njihova determinacijska svojstva (perajne formule i broj ljustica u bočnoj pruzi) po Vuković i Ivanović 1971. Slova u perajnoj formuli predstavljaju leđnu (D), podrepnu (A), trbušne (V), prsne (P) i repnu peraju (C). Rimskim brojevima su naznačene tvrde perajne šipčice, a arapskim meke perajne šipčice.

| Naziv vrste (<i>lat.</i>) | Naziv vrste (<i>hrv.</i>) | Perajna formula | Broj ljustica u bočnoj pruzi |
|----------------------------------|-----------------------------|---|------------------------------|
| <i>Salmo trutta</i> | / | D III+8-11, A II-III+8-9, V I+8, P I+12-13 | 118-120 |
| <i>Salmo trutta m. fario</i> | potočna pastrva | D III-IV+9-11, A II-IV+7-9, V 7-9 | 110-140 |
| <i>Salmo trutta m. lacustris</i> | jezerska pastrva | D III+8-11, V I+8, A III+7-9, P I+12-13, C 19 | 120 |
| <i>Salmo farioides</i> | primorska potočna pastrva | D IV+10-11, A IV+8-9, V II+8, P I+12-13, C 19 | 99-128 |
| <i>Salmo marmoratus</i> | glavatica | D IV+11, A III-IV+8, V II+8, P I+14, C 19 | 120-125 |

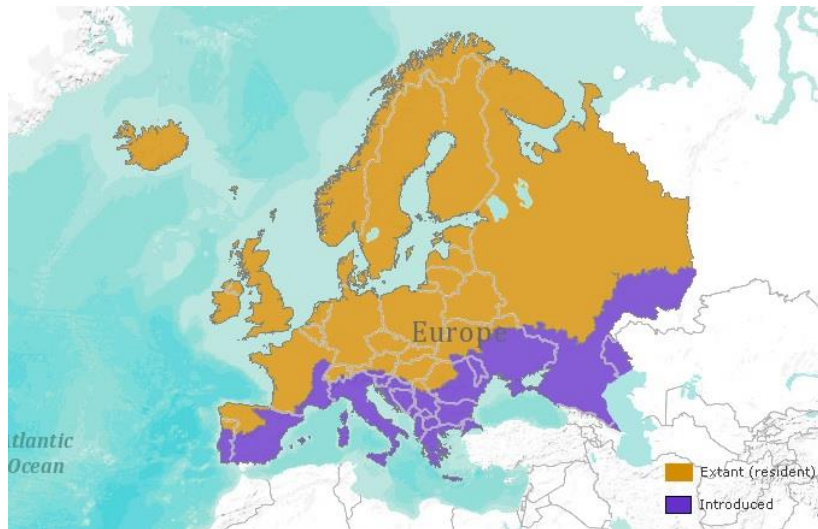
1.1.3. Rasprostranjenost vrste i stanište

Potočna pastrva je široko rasprostranjena slatkovodna vrsta ribe. Njezin areal obuhvaća široko područje od sjeverne Norveške i sjeveroistočne Rusije, na jugu do planinskog lanca Atlas u sjevernoj Africi, od Islanda do Afganistana, čineći kompleksni mozaik fenotipske raznolikosti (Bernatchez 2001; Suárez i sur. 2001). Areal ove vrste je dodatno proširen (**Tablica 3**), kako bi se zadovoljile ekonomske i rekreacijske potrebe ljudske populacije kao što su hrana ili sportski ribolov.

Tablica 3. Popis zemalja u kojima je potočna pastrva autohtona i u koje je unešena (Freyhof 2011)

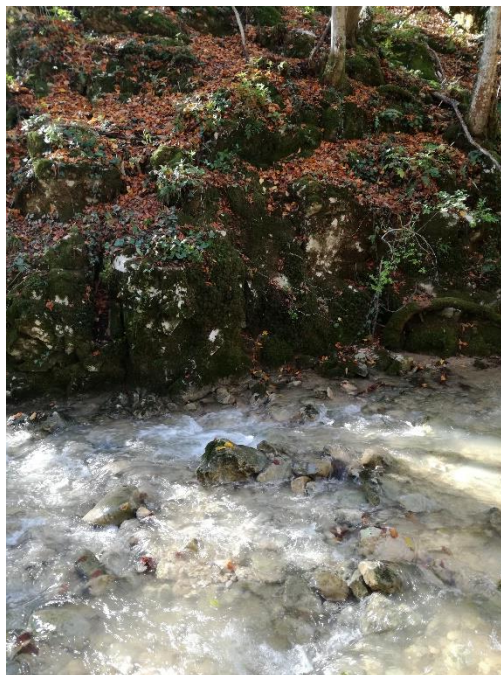
| Autohtone | Unešene |
|--|---|
| Andora, Austrija, Bjelorusija, Belgija, Češka, Danska, Estonija, Farski otoci, Finska, Francuska, Guernsey, Hrvatska, Island, Irska, Isle of Man, Jersey, Latvija, Liechtenstein, Litva, Luksemburg, Mađarska, Nizozemska, Norveška, Njemačka, Poljska, Portugal, Rumunjska, Rusija, Srbija, Slovačka, Slovenija, Španjolska, Švedska, Švicarska, Ukrajina, Ujedinjeno Kraljevstvo | Italija, sjeverna i južna Amerika, južna i istočna Afrika, Pakistan, Indija, Nepal, Japan, Novi Zeland i Australija |

Ihtiolozi su i danas još uvijek podijeljeni oko toga da li postoje linije vrste *Salmo trutta* ili su te linije zapravo različite vrste, a taj problem nesređene taksonomije potočne pastrve odražava se i na razumijevanje rasprostranjenosti iste. Iz tog razloga je jako teško naći referentnu kartu koja će prikazivati točnu rasprostranjenost potočne pastrve. Na **Slici 2.** prikazana je rasprostranjenost *Salmo trutta* ili rasprostranjenost atlantske linije, za koju autor smatra da je *Salmo trutta* sensu stricto (Freyhof 2011; Kottelat i Freyhof 2007).



Slika 2. Rasprostranjenost vrste *Salmo trutta* (ili atlantske linije) u Europi. Žutom bojom označen je areal u kojem je vrsta rezidentna, dok je ljubičastom bojom označen areal u koji je vrsta unešena (preuzeto s: <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=19861>, pristupljeno 2.4.2018.).

Potočna pastrva naseljava brze, hladne i kisikom bogate tokove kamenitog i šljunkovitog tla (**Slika 3**) kako bi se mogle mrijestiti (Freyhof 2011; Odak 2004). Temperatura vode je ograničavajući ekološki faktor – pastrva živi jedino u vodama temperature između 4°C i 18°C, stoga se takve brze i hladne tokove po longitudinalnoj podjeli riječnih sastava naziva još i zonom pastrve (Georgiev 2011).



Slika 3. Prikaz riječnog toka koji predstavlja zonu pastrve u Parku prirode Žumberak - Samoborsko gorje i ujedno stanište potočne pastrve (foto: Lucija Ivić).

1.1.4. Ugroženost i zaštita vrste

Novo stoljeće i nove industrije donijele su mnogo predosti za čovječanstvo, ali s tim su došle i razne opasnosti, ponajviše za okoliš. Osim zagađenja, čovjek na razne načine mijenja okoliš i živi svijet – prevelikim iskorištavanjem resursa, izmjenama okoliša, unosom stranih i invazivnih vrsta ali i unosom domestificiranih jedinki u divlje populacije. Sve to utječe na genetiku i evoluciju populacija divljih vrsta, te na demografski pad istih (Allendorf i sur. 2008; Coltman i sur. 2003; Hutchings 2000). Jedno od najugroženijih staništa su zasigurno slatke vode i životinje koje žive u njima, uključujući i ribe čije iskorištavanje u komercijalne i rekreativne svrhe znanstvenici već godinama prate (Coleman i sur. 2004). RIBE koje čovjek koristi u velikim količinama se najčešće uzgajaju u ribogojilištima. Iako su ribogojilišta važna u održivoj ekonomiji, mogu imati negativan učinak na evolucijski potencijal i genetički integritet populacija, kako onih što se uzgajaju, tako i divljih populacija (Laikre i sur. 2010). Istraživanja više autora (Cristie i sur. 2012; Araki i sur. 2008; Araki i sur. 2007; McGinnity i sur. 2003) pokazala su da ribe iz uzgoja koje su puštene u divljinu imaju manji fitness (sposobnost životinje da opstane i podigne mlade; Hadžiselimović i Maslić 1999) od riba iz divljih populacija, jer na ribe iz uzgoja nije djelovala prirodna selekcija već su na njihovu selekciju djelovali ljudi (Araki i sur. 2008). Potočna pastrva spada u komercijalno i rekreativno važne vrste slatkovodnih riba (Suárez i sur. 2001) koje se uzgajaju u ribogojilištima ali i kojima se približavaju brojni prirodni vodotoci, što direktno i indirektno može utjecati na strukturu populacija i ugroziti je. Potencijalno veći problem moglo bi uzrokovati globalno zagrijavanje Zemlje jer toplija voda sadrži manje kisika, a pošto je potočna pastrva prilagođena na hladne, dobro oksigenirane vode, zagrijavanje bi moglo uzrokovati ljetne pomore pastrva. To bi utjecalo i na genetičku raznolikost i na gustoću vrste koje se povećavaju pri nižim temperaturama (Splendiani i sur. 2016). Potočna pastrva je važan predator beskraljeznjaka i jako važan dio slatkovodnog ekosustava, te bi bilo kakva promjena u njenim populacijama imala velik utjecaj na sveukupnu hranidbenu mrežu (Meissner i Muotka 2006).

Prema IUCN-ovom Crvenom popisu, *Salmo trutta* se smatra najmanje zabrinjavajućom vrstom (LC – least concern), dok se u Republici Hrvatskoj tek izrađuje akcijski plan očuvanja vrste i procjenjuje rizik od izumiranja pojedinih populacija (Freyhof 2011; <http://www.haop.hr/hr>). Međutim, tu se opet upliće pitanje taksonomije. Taksonomija vrste nije sređena, nije poznato da li se neke linije mogu smatrati zasebnim vrstama ili samo linijama ili čak podvrstama, te da li su onda te linije/vrste/podvrste ugrožene ili nisu, pošto su areali nekih linija/vrsta/podvrsta

jako mali. U **Tablici 4** navedeni su pripadnici roda *Salmo* u Hrvatskoj i njihov kriterij odabira (kriterij koji je vrsta zadovoljila kako bi se proglasila prioritetnom – važnom za zaštitu).

Iznimno je važno da se provedu iscrpna znanstvena istraživanja koja će obuhvaćati nove molekularne metode i morfologiju, tako da se može utvrditi točan konzervacijski status ove vrste i da se može adekvatno zaštititi.

Tablica 4. Popis vrsta za koje je potrebno donošenje akcijskog plana očuvanja vrste, s kriterijima odabira; rod *Salmo*. Značenje kratica: CR – kritično ugrožena vrsta, EN – ugrožena vrsta, VU – osjetljiva vrsta (<http://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/planovi-upravljanja-i-mjere-ocuvanja-6>, pristupljeno 5.4.2018.)

| Hrvatski naziv | Latinski naziv | Kriterij odabira |
|--------------------|---------------------------|------------------|
| zubatak | <i>Salmo dentex</i> | CR |
| primorska pastrva | <i>Salmo farioides</i> | EN |
| glavatica | <i>Salmo marmoratus</i> | CR |
| visovačka pastrva | <i>Salmo visovacensis</i> | EN, endem |
| zrmanjska pastrva | <i>Salmo zrmanjensis</i> | CR |
| potočna pastrva | <i>Salmo trutta</i> | VU |
| crnomorska pastrva | <i>Salmo labrax</i> | VU |

1.2. Primjena morfologije i molekularne filogenije u znanstvenim istraživanjima ribljih populacija

Znanstvenici iz raznih polja biologije koji se počinju baviti ihtiologijom, često se obeshrabre kada doznaju da je taksonomija riba kompleksna tema. Uz to, u svijetu je prisutno relativno malo ihtiologa-taksonoma, pa je i samo pronalaženje stručne osobe često teško. Jedan od razloga za takvo loše stanje u taksonomiji je zaigurno činjenica da se taksonomija teško može komercijalizirati, pa taksonomi ne dobivaju potrebna sredstva za izradu znanstvenih radova, a time i gube interes studenata i mladih ljudi koji bi se možda i bavili taksonomijom. Često se mogu čuti komentari kako će taksonomija kao disciplina izumrijeti prije nekih ugroženih vrsta, stoga se ovakvo stanje taksonomije naziva i „taksonomska zapreka“ (Keat-Chuan i sur. 2017).

S druge strane, razvitak molekularnih, računalnih i statističkih tehnika doveo je do općeg mišljenja kako se vrste mogu vrlo lako opisati pomoću nukleotidnih slijedova, softverskih i matematički izračuna, a da taksonomija kao disciplina nije više potrebna (Keat-Chuan i sur. 2017). Prisutno je sve više znanstvenika koji nikad nisu stupili u slatkovodno stanište i promatrali životinje, a povode se tom zamisli i objavljuju stručne studije i znanstvene radove vezane za ribe (Ebach i Holdrege 2005). Zbog nedostatka terenskog iskustva, nisu ni svjesni nekih karakteristika riba, poput fenotipskih polimorfizama, spolnog dimorfizma ili promjenjenih ponašanja uslijed specijacije (Waugh 2007). Nepoznavanje ovih karakteristika može dovesti do opisivanja krive vrste, a na kraju i do općeg kaosa u taksonomiji riba (Keat-Chuan i sur. 2017).

Ponekad je vrste i podvrste istog roda izuzetno teško međusobno morfološki razlikovati, kao što je to bio slučaj s dvije podvrste jegulja. Ali kada su autori rada (Sugeha i Suharti 2009) proveli molekularne analize, te su se dvije podvrste jasno odvojile. Ovo je samo jedan od mnogo primjera kako kombinacija morfološkog i molekularnog pristupa može pomoći u razumijevanju taksonomije i raznolikosti riba, te kako je budućnost taksonomije upravo integracija klasične taksonomije i modernih tehnika – integrativna taksonomija (Keat-Chuan i sur. 2017).

1.2.1. Morfometrija i meristika kao alati tradicionalne taksonomije

Morfologija riba je povijesno bila najvažniji, primarni izvor informacija za taksonomska i evolucijska istraživanja (Strauss i Bond 1990). Još od vremena kada je čovjek tek učio loviti ribu, vrste su se određivale pomoću jednostavnih anatomskih odlika, a taj se jednostavni pristup još uvijek zadržao, bez obzira na prisutnost i vrijednost genetičkih, fizioloških, bihevioralnih i ekoloških podataka, prvenstveno zbog praktičnosti, brzine i ekonomičnosti metode (Keat-Chuan i sur. 2017; Strauss i Bond 1990). Svaka vrsta ima svoj karakteristični oblik, veličinu, položaj peraja, pigmentaciju i druga vanjska obilježja koja pomažu u njenom prepoznavanju, identifikaciji i klasifikaciji. Uz to, postoje i unutarnja važna obilježja koja se mogu prepoznati sekcijom ribe (Strauss i Bond 1990).

Morfometrija je kvantitativna analiza forme (oblika) tijela i dijelova tijela koja se izražava u milimetrima (mm). Morfometrijske mjere najčešće se uzimaju pomoću metalnih mjerki ili ravnala, a u novije vrijeme sve se više koriste računalne tehnike digitaliziranih točki (2D ili 3D) što skraćuje vrijeme mjerenja. Ova analiza je relativno jednostavna, no postoji nekoliko

problema. Ribe ponekad mogu biti abnormalne ili deformirane zbog položaja u kojem se promatra, na što je ova analiza osjetljiva. Na rezultate mjerenja može utjecati i medij u kojem je očuvana riba, te vrijeme koje je provela u istom. Kod ove analize izuzetno je važno da sva mjerenja izvodi ista osoba, kako različite tehnike mjerenja ne bi dovele do devijacija rezultata (Strauss i Bond 1990).

Meristička obilježja čine dijelovi tijela, primarno šipčice u perajama ribe i ljuske, koja su se u evolucijskoj povijesti razvijale sa segmentacijom tijela. Druga obilježja (pigmentacija, glavene pore, otoliti, ždrijelni zubi...) se također mogu uzimati u obzir iako nemaju direktne veze s razvitkom miomera. Brojiva obilježja variraju unutar i između vrsta stoga su korisna u opisivanju i određivanju vrsta riba (Strauss i Bond 1990). Postoje dva osnovna tipa perjanih šipčica – tvrde šipčice i meke šipčice. Tvrde šipčice su tvrde i nerazgranate, te su smještene u anteriornom dijelu neparnih peraja i označavaju se rimskim brojevima (npr. I, II, III...). Meke šipčice predstavljaju uzdužnu potporu perajama i obično su razgranate, te se označavaju arapskim brojevima (npr. 1, 2, 3...). Broj i vrsta perajnih šipčica čine perajnu formulu, kao kombinaciju rimskih i arapskih brojeva (Keat-Chuan i sur. 2017; Strauss i Bond 1990). Ljuske također mogu igrati važnu ulogu u određivanju vrsta riba, čak iako su u bliskom srodstvu. Najčešće se proučavaju ljuske bočne pruge; ili samo ljuske koje su perforirane ili sve od početka do kraja bočne pruge (Keat-Chuan i sur. 2017; Strauss i Bond 1990). Jedno od najzanimljivijih morfoloških obilježja riba je pigmentacija, a može se koristiti i kao taksonomsko obilježje. Boja tijela je zanimljiva tema u kontekstu ribe kao biološkog indikatora jer ribe, kao i druge životinje, ne mogu same sintetizirati pigmente već ih moraju pojesti u obliku hrane, što može ukazati na navike hranjenja, značajke staništa i prisutnost kukaca bogatih pigmentima (Keat-Chuan i sur. 2017). Sva meristička obilježja podložna su promjenama jer većinom ovise o vanjskim, okolišnim faktorima poput temperature ili prehrane. Kod istraživanja meristike, u obzir treba uzeti i subjektivnost istraživača (Strauss i Bond 1990).

1.2.2. Primjena molekularnih analiza i molekularne filogenije

Kao što je već navedeno, ponekad se dogodi da morfologija životinje nije dovoljna kako bi se odredila vrsta. Tada znanstvenici uvode termine kao što su „podvrsta“, „linija“ ili „varijacija“, koji mogu biti subjektivni i zbunjujući (Keat-Chuan i sur. 2017). Za ribe je karakteristična pojava plastičnosti unutar jedinki iste vrste, tako primjerice obojenje može ovisiti o prehrani, staništu i godišnjem dobu. Ovakve pojave i situacije dovele su do sve većeg korištenja molekularnih analiza u ihtiološkim istraživanjima (Keat-Chuan i sur. 2017).

Svaki organizam oblikuje jedinstveni set bioloških osobina koje povećavaju njegov fitnes i preživljavanje u okolišu, a kako bi se što bolje prilagodio na moguće promjene u okolišu podložan je genetičkom driftu, mutacijama ili varijacijama. Ti prirodni fenomeni omogućili su otkrivanje vrsne i individualne jedinstvenosti na molekularnoj razini (Sanger i sur. 1977). Sve molekularne metode ovise o DNA markeru ili analizi proteinske sekvence i sve se metode temelje na hipotezi kako svi pripadnici iste vrste imaju specifičnu DNA koja se razlikuje od DNA drugih vrsta. Ta specifična DNA je ovisna o promjenama u vremenu i prostoru, tako da se određene, manje promjene DNA mogu zbivati i kod jedinki iste vrste (Keat-Chuan i sur. 2017). Genom riba sadrži približno milijun nukleotidnih parova (Stepien i Kocher 1997), čija bi analiza bila preduga i preopširna, zbog čega se razvila potreba razvika analiza određenih manjih odsječaka, osobito mitohondrijskih gena (Keat-Chuan i sur. 2017). Mitohondrijska DNA (mtDNA) koja je manja od sveukupne genomske DNA, brzo evoluira i obično se prenosi samo majčinskom linijom bez rekombinacija, te se pokazala idealnim izborom za filogenetska istraživanja viših životinja (Emerson i Hewitt 2005). Najčešće korišteni genski markeri u filogenetskim istraživanjima su mitohondrijski geni za citokrom *b* (*cyt b*), kontrolna regija (CR), 12S rRNA i citokrom oksidaza I/II (CO I/II) (Patwardhan 2014). Od svih genskih markera, citokrom *b* pokazao se najkorisnijim genskim markerom korištenim za otkrivanje filogenetskih veza između bliskih taksonomskih jedinica, te se vrlo često koristi u istraživanjima strukture i porijekla ribljih populacija (Buj i sur. 2017a; Buj i sur. 2014; Schenekar i sur. 2014). U novije vrijeme se pokazalo da je za filogenetska istraživanja ipak bolje koristiti više genskih markera jer postoji mogućnost donošenja krivih zaključaka zbog pojava poput hibridizacije, horizontalnog prijenosa gena i utjecaja prirodne selekcije, koje često nisu vidljive u slučaju korištenja jednog markera (Bermingham i Moritz 1998). Kako bi se što točnije prikazala filogenetska povijest neke vrste, potrebno je analizirati niz različitih sekvenci, i one s višom i one s nižom stopom mutacije (Emerson i Hewitt 2005).

Molekularna filogenija (filogenetika, molekularna sistematika) je znanstvena disciplina koja opisuje i rekonstruira genske veze među vrstama i višim sistematskim kategorijama. Filogenija je prikaz evolucijske povijesti nekog organizma (Lipscomb 1998). U filogenetskim istraživanjima se, radi što veće preciznosti, koriste sekvence koje sporo evoluiraju za dalju filogenetsku prošlost, dok se za bližu koriste varijabilniji markeri (Hewitt 2001). Obično se u filogenetskim istraživanjima izrađuju filogenetska stabla i mreže od haplotipskih sekvenci korištenjem filogenetskih metoda (metoda najveće parsimonije, metoda najveće vjerojatnosti, metoda susjednog povezivanja...) kako bi se ilustrirali odnosi među organizama i redosljed specijacijskih događaja kojima su od ranih predaka nastali današnji potomci. Preciznosti stabala ovise o tome koliko taksonomske jedinice s kojima se radi odgovaraju povijesti grananja linija, pod uvjetom da nema protoka gena i da preci više nisu prisutni u recentnoj raznolikosti. Ukoliko ti uvjeti nisu zadovoljeni, haplotipske sekvence se slažu u filogenetsku mrežu (Emerson i Hewitt 2005). Filogenetska mreža se od stabla razlikuje u tome što dopušta poprečne veze između vrsta koje su u direktnom srodstvu, te se na taj način ne isključuje rekombinacija, hibridizacija i lateralni prijenos gena, što se filogenetskim stablima ne može prikazati (Nakhleh i sur. 2005; Posada i Crandall 2001).

1.3. Cilj istraživanja

Osnovni ciljevi ovog diplomskog rada su:

- Morfološko opisivanje filogenetskih linija potočne pastrve prisutnih u Hrvatskoj
- Utvrđivanje nukleotidnih pozicija koje predstavljaju fiksne razlike između filogenetskih linija potočne pastrve
- Opisivanje morfološke i genske raznolikosti unutar pojedine filogenetske linije
- Identifikacija morfoloških svojstava koja predstavljaju pouzdane determinacijske značajke

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pridonijet će razumijevanju evolucije i sistematike potočne pastrve, te razvoju konzervacijskih strategija za zaštitu ove vrste u Republici Hrvatskoj, ali i u ostalim zemljama gdje se ova vrsta pojavljuje.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorkovanje

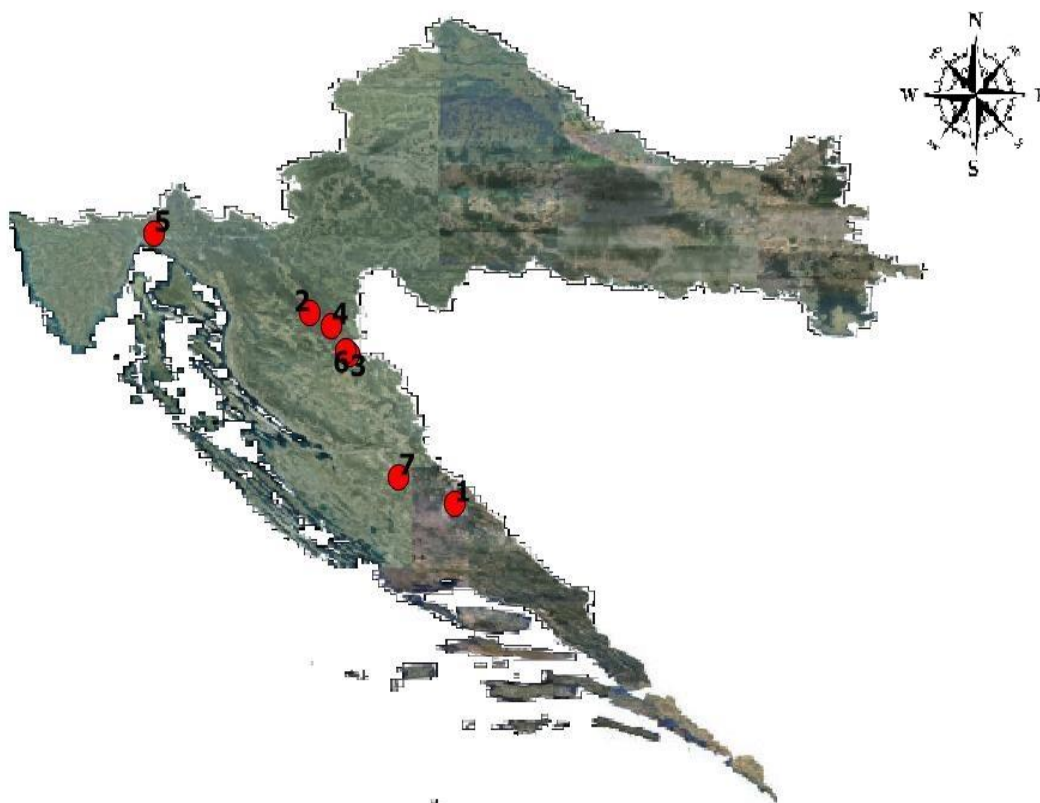
Uzorkovanje jedinki izvodilo se u potocima i rijekama pomoću leđnog elektroagregata (**Slika 4**) marke Hans Grassl model IG-200-1. Metoda elektroribolova je odabrana primarno zbog minimalnog utjecaja na jedinke i populacije, te zbog neselektivnosti. Naime, nakon kratkotrajne paralize mišića uzrokovane električnom strujom, ribe su se vrlo brzo oporavile bez ikakvih trajnih posljedica. Ovom je metodom djelotvoran lov većih, ali i manjih jedinki zbog čega je moguće utvrditi prisutnost različiti starosnih kategorija, te uzorkovati čak i vrlo male jedinke na mjestima gdje, zbog ekoloških razloga, veće jedinke nisu prisutne. Nakon ulova jedinkama je odrezan komadić desne prsne peraje koji je zatim pohranjen u označenu epruveticu s 95% etanolom. Po povratku s terena uzorci su premješteni u zamrzivač i čuvani na temperturi od - 20 °C, kako ne bi došlo do razgradnje deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Jedinke su prenesene u Zagreb na Biološki odsjek, te eutanizirane kako bi se mogla proučiti morfologija. Broj uzoraka uzetih na pojedinom lokalitetu ovisio je o uspješnosti lova (u korelaciji s gustoćom populacija), ali i pretpostavljenoj važnosti područja za nativnu pastrvu.



Slika 4. Lov pomoću leđnog agregata (foto: Lucija Ivić)

2.2. Područje istraživanja

Ovo istraživanje obuhvatilo je 7 lokaliteta diljem Hrvatske (**Slika 5**) kako bi se dobila što potpunija slika o taksonomskom statusu i rasprostranjenosti autohtonih potočnih pastrva, te kako bi se pokušali obuhvatiti vodotoci u kojima obitavaju različite linije pastrva.



Slika 5. Karta područja istraživanja s postajama uzorkovanja označenima crvenom bojom i brojevima (1-Cetina; 2-Lička Jesenica; 3-Matica korenička; 4-Plitvica; 5-Rječina; 6-Vrelo koreničko; 7-Zrmanja)

Sve istraživane rijeke su krške rijeke. Oko ovih rijeka, česta je pojava krškog polja, koja mogu poplaviti. Pri određivanju lokacija za uzorkovanje, posebno se pazilo da se uzorci skupljaju na mjestima za koja je veća vjerojatnost da su dom samo autohtonim vrstama pastrva. Broj uzoraka po lokalitetima prikazan je u **Tablici 5**.

1. Cetina: Cetina je rijeka jadranskog slijeva koja prolazi Splitsko-dalmatinskom županijom i ulijeva se u more kod Omiša. Izvire 7 km sjeverno od Vrlike u podnožju planine Dinare i ima više izvora. Na njezinom toku se nalazi 5 hidrocentrala i jedna crpna stanica (www.visitsinj.com/hr/Vodic/47/rijeka-cetina, pristupljeno 5.4.2018.).

2. Lička Jesenica: Rijeka Jesenica izvire ispod Male Kapele i teče 3 km do sela Lička Jesenica. Ima oko 4 km toka, od kojeg 1 km ljeti presuši. Rijeka je u gornjem toku plitka i produbljuje se prema donjem dijelu toka. Na tom se lokalitetu nalazi veliko slapište te je rijeka ujezerena iznad umjetnog praga (Buj i sur. 2017b; www.saborsko.hr/rijeka-jesenica/, pristupljeno 5.4.2018.).
3. Matica korenička: Matica korenička je kompleks malih rječica i potoka u blizini Plitvičkih jezera. Ova rijeka ponire podno planine Plješivice, polako teče kroz dolinu, na nekim mjestima široka i preko 3 m. Različita dubina na pojedinim dijelovima, ali uglavnom je prilično plitko, dno je šljunkovito (Buj i sur. 2017b).
4. Plitvica: Rijeka Plitvica je lijeva pritoka Korane, dugačka 9 km; izvire zapadno od Plitvice Sela kod Rodić-Poljane na Maloj Kapeli; na njenom ušću nalazi se 78 m visoki vodopad. Plitvica je velik potok, bogat vodom i brzog protoka (Buj i sur. 2017b; Njegač i Pejnović 2012).
5. Rječina: Rječina je duga oko 19 km, izvire iz pećine ispod strme litice brda Kičēja. Najveći pritoci su joj Sušica, Lužac, Zala, Zahumčica, Golubinka, Ričinica i Borovšćica no oni su uglavnom bujice i veći dio godine suhi (www.jelenje.hr, pristupljeno 5.4.2018.).
6. Vrelo koreničko: Radi se o vrelu (izvoru) Rijeke koreničke (Njegač i Pejnović 2012).
7. Zrmanja: Izvire ispod planine Poštak u južnom dijelu Like, a ulijeva se u Novigradsko more 12 kilometara od Obrovca. Najznačajniji pritok je rječica Krupa (Njegač i Pejnović 2012).

Tablica 5. Broj uzoraka po lokalitetu.

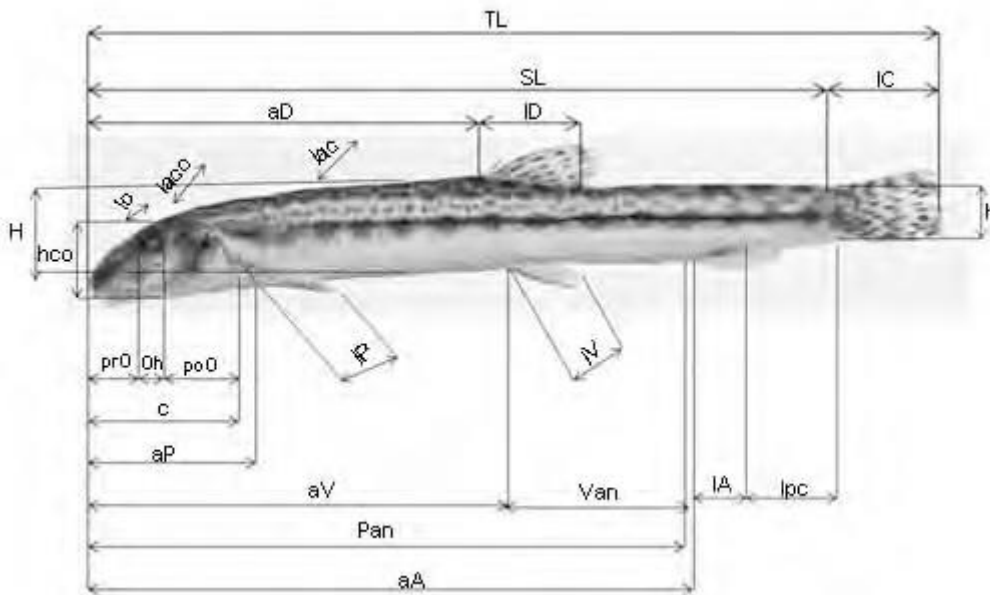
| Lokalitet | Broj uzoraka |
|------------------|---------------------|
| Cetina | 9 |
| Lička Jesenica | 17 |
| Matica korenička | 23 |
| Plitvica | 7 |
| Rječina | 5 |
| Vrelo koreničko | 13 |
| Zrmanja | 3 |

2.3. Morfološka mjerenja i statistička obrada podataka

Istraživanje morfologije potočnih pastrva odvijalo se u prostorijama Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Ribe su konzervirane u formalinu, a zatim čuvane u 95% etanolu. Morfometrijska mjerenja sam vršila pomoću metalne digitalne pomične mjerke, a kako bi se izbjegle devijacije u rezultatima, sva sam mjerenja obavila osobno s istom mjerkom. Svakoj jedinci izmjerile su se 24 mjere prikazane u **Tablici 6** i na **Slici 6**.

Tablica 6. Oznake i nazivi morfometrijskih značajki mjerenih na pastrvama

| Oznaka | Latinski naziv | Hrvatski naziv |
|--------|---------------------------------|------------------------------|
| TL | <i>Longitudo totalis</i> | ukupna duljina tijela |
| SL | <i>Longitudo corporis</i> | standardna duljina tijela |
| Lc | <i>Longitudo capitis</i> | duljina glave |
| pan | <i>Longitudo praeanalisis</i> | preanalna duljina |
| pA | <i>Distantia praeanalisis</i> | preanalna udaljenost |
| Van | <i>Longitudo ventroanalisis</i> | ventroanalna duljina |
| pV | <i>Distantia praeventralis</i> | preventralna udaljenost |
| pP | <i>Distantia praepectoralis</i> | prepektoralna udaljenost |
| pD | <i>Distantis predorsalis</i> | predorzalna udaljenost |
| lpC | <i>Longitudo pedunculi</i> | duljina repnog drška |
| 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 |
| H | <i>Altitudo corporis max.</i> | najveća visina tijela |
| h | <i>Altitudo corporis min.</i> | najmanja visina tijela |
| 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 |
| poO | <i>Spatium postorbitale</i> | zaočni prostor |



Slika 6. Prikaz morfometrijskih mjera koje su se koristile u istraživanju

Standardizaciju morfometrijskih mjera provela sam na dva načina – pomoću alometrijskih transformacija i korištenjem omjera. Varijaciju veličina riba sam otklonila alometrijskom transformacijom pomoću formule

$$M_{adj} = M (SL_s / SL_0)^b,$$

(Elliott i sur. 1995) gdje je M_{adj} standardizirana mjera, M je izmjenjena mjera, SL_s je srednja vrijednost standardiziranih jedinki s pojedinog lokaliteta, SL_0 standardizirana duljina jedinke, a b nagib krivulje linearne regresije od $\log M$ na $\log SL_0$.

Izračunala sam i morfometrijske omjere tako da sam uzimala određenu mjeru jedinke u omjer s SL , L_c i H , kako bih vidjela postoje li razlike i kako bih rezultate mogla usporediti s radovima drugih autora.

Statističke analize i usporedbe među populacijama izvodila sam pomoću deskriptivne statistike, analize glavnih komponenti (PCA) i analize varijance (ANOVA) u računalnom programu STATISTICA 13. Te sam analize provela i na prilagođenim morfometrijskim mjerama i na omjerima. Nakon PCA i ANOVA analiza, napravila sam *post hoc* Fisher LSD test, kako bih mogla točno odrediti koje populacije se međusobno razlikuju i po kojim mjerama.

Osim morfometrijskih, određivala sam i vanjske merističke mjere – broj šipčica u trbušnim i prsnim perajama, broj šipčica u leđnoj, repnoj i podrepnoj peraji, broj ljustica u bočnoj pruzi, te broj pigmentiranih točkica na tijelu i na perajama.

2.4. Laboratorijski postupci - izolacija DNA, umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR), sekvenciranje

Ukupnu genomsku DNA izolirala sam iz uzoraka tkiva peraje pomoću *DNeasy Blood and Tissue* kompleta za izolaciju (QIAGEN), prema protokolu proizvođača. Uzorcima tkiva u epruveticama dodala sam 180 μ L pufera ATL, 20 μ L protein kinaze, sadržaj epruvetice promiješala sam *vortex* mješalicom te ih ostavila 24 h u vodenoj kupelji na 56°C. Sljedeći dan uzorke sam izvadila iz kupelji, promiješala ih *vortex* mješalicom, te im dodala 200 μ L pufera AL i 200 μ L etanola (96%). Sadržaj epruvetice prebacila sam u epruvetice s membranom (*pipet spin column*) te centrifugirala na 8000 okretaja u minuti (rpm) 1 minutu. Membrane sam potom prebacila u nove epruvetice, dodala sam 500 μ L pufera AW1 i ponovila centrifugiranje pri istim uvjetima. Membrane sam ponovno prebacila u nove epruvetice, dodala sam 500 μ L pufera AW2 te sam sadržaj centrifugirala na 14 000 rpm 3 minute. Posljednji put sam membrane prebacila u nove epruvetice, dodala 150 μ L pufera AE, za čije je elucijsko djelovanje potrebno pričekati minutu, potom sam sadržaj centrifugirala na 8 000 rpm 1 minutu. Uzorcima sam pridružila imena te ih pohranila u zamrzivač.

Za lančane reakcije polimerazom (PCR) koristila sam komplet kemikalija *HotStarTaq Plus Master Mix Kit* (QIAGEN) te početnice, sintetizirane u servisima *Eurofins Genomics* i *Macrogen Europe*. Analizirani genski marker je gen za citokrom *b* (*cyt b*), on je kodirajući gen unutar mitohondrijske DNA (mtDNA). Kako bi se dobili čitavi geni ili što veći odsječci gena koji mogu vjerno odraziti raznolikost među populacijama i taksonomskim jedinicama, protokol za PCR reakciju sam optimizirala, te sam koristila početnice za koje se utvrdilo da daju najbolje produkte (Buj i sur. 2017b). Protokoli PCR reakcija i početnice za PCR navedeni su u **Tablici 7**.

Tablica 7. Laboratorijski protokol i početnice za analizirani genski marker citokrom *b* (*cyt b*; Buj i sur. 2017b)

| gen | <i>cyt b</i> |
|------------------|--|
| PCR uvjeti | 10 min 95,0°C 35x00:45 92,0°C 01:30 48,0°C 01:45 72,0°C 7 min 72,0°C |
| početnice za PCR | H-cyp: CCTAGCTTTGGGAGYTAGG L-cyp: GAYTTGAARAACCACGTTG |

Kvalitetu dobivenih PCR produkata provjerila sam metodom elektroforeze na agaroznom gelu. Gel sam pripremila od 1 g agaroze i 100 mL pufera TAE (1%). Pufer TAE je po svom sastavu tris (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Uzorci sam nanijela na gel te sam provela elektroforezu na 120 volti (V), 30 minuta. Gel sam potom prebacila u otopinu etidijevog bromida te fotografirala pod ultraljubičastim osvjetljenjem. Pročišćavanje i sekvenciranje PCR produkata provedeno je u servisu *Macrogen Europe*. Za sravnjivanje sekvenci koristila sam računalni program BioEdit 7.2.5 (Hall 1999), a kromatograme svih sekvenci vizualno sam provjerila prilikom sravnjivanja.

2.5. Filogenetska rekonstrukcija

Za utvrđivanje srodstvenih odnosa među pastrvama u Hrvatskoj i njihovog položaja unutar filogenetskog stabla roda *Salmo*, provedena je filogenetska rekonstrukcija korištenjem metode najveće parsimonije (MP), metode najveće vjerojatnosti (ML) i metode susjednog povezivanja (MJ). Prve dvije metode rezultiraju filogenetskim stablima, dok MJ metoda daje filogenetsku mrežu što je osobito pogodno za blisko srodne jedinice, među čijim populacijama je moguć horizontalan prijenos gena. Analize MP i ML provela sam pomoću programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) i MEGA 6.06 (Tamura i sur. 2007). Sve MP i ML analize provedene su pod heurističkim modelom uz 100 ponavljanja, uz nasumičan redosljed unošenja taksa, preklapanje grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem (TBR, od engleskog izraza *tree bisection-reconnection*). Tom sam metodom tražila stablo najkraće topologije preraspodjeljivanjem grana na način da se prvotni kladogram podijeli na više manjih potkladograma, koji se zatim

preslaguju u nova stabla. Sva mjesta kodona, kao i sve nukleotidne supstitucije, imala su jednaku težinu. Podržanost grananja utvrdila sam analizom samopodržanja (BS, od engleskog *Bootstrap analysis*), uz 1 000 BS ponavljanja i 10 replika dodatnih sekvenci.

U istraživanju sam prikupila 77 jedinki iz različitih populacija i na svim jedinkama sam provela izolaciju ukupne DNA i PCR, međutim samo 13 jedinki je dalo rezultate. Stoga sam za filogenetsku rekonstrukciju koristila izolate jedinki s istog vodotoka iz prijašnjih istraživanja, iz područja za koje je dokazano da prebiva jedna od potrebnih filogenetskih linija ali i iz Banke gena (**Tablica 8**). Za ukorijenjenje stabala sam koristila sekvence vrste *Thymallus thymallus*, Linnaeus 1758, koja pripada u istu porodicu, ali različit rod od analiziranih sekvenci najbliži rodu *Salmo* (Crete-Lafreniere i sur. 2012) i *Salmo obtusirostris*, Heckel 1851, koja pripada u isti rod. Dodani haplotipovi su omogućili lakšu usporedbu podataka i izgradnju potpunijih filogenetskih stabala.

MJ analiza provedena je pomoću računalnog programa Network 4.5.1.6. (Fluxus Technology Ltd.) i temeljila se na haplotipovima i sekvencama iz ovog istraživanja, predstavnicima do sada utvrđenih linija iz Hrvatske, te je uključivala sekvence iz geografski udaljenijih populacija. Njen osnovni cilj bio potvrda filogenetskog položaja pastrva u Hrvatskoj, ako se u obzir uzima i horizontalni prijenos gena. Vrsta *Thymallus thymallus* se koristila za ukorijenjenje (engleski, *outgroup*).

Tablica 8. Sekvence potočne pastrve iz Banke gena (preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, pristupljeno 22.4.2018.) koje su uključene u filogenetsku rekonstrukciju

| Ime sekvence | Pristupni kod | Referenca |
|--------------|---------------|------------------------|
| AND4 | KF985666 | Schenekar i sur. 2014. |
| AND5 | KF985667 | Schenekar i sur. 2014. |
| CZR011 | KF985670 | Schenekar i sur. 2014. |
| CZR015 | KF985674 | Schenekar i sur. 2014. |
| DLZ012 | KF985676 | Schenekar i sur. 2014. |
| DLZ015 | KF985678 | Schenekar i sur. 2014. |
| HaH011 | KF985679 | Schenekar i sur. 2014. |
| HaH015 | KF985683 | Schenekar i sur. 2014. |
| KK1019 | KF985686 | Schenekar i sur. 2014. |
| KK3004 | KF985690 | Schenekar i sur. 2014. |
| KK7005 | KF985694 | Schenekar i sur. 2014. |

Tablica 8. Nastavak

| | | |
|--------|----------|------------------------|
| KK7014 | KF985701 | Schenekar i sur. 2014. |
| KK7028 | KF985706 | Schenekar i sur. 2014. |
| LB014 | KF985707 | Schenekar i sur. 2014. |
| LB015 | KF985708 | Schenekar i sur. 2014. |
| LB023 | KF985716 | Schenekar i sur. 2014. |
| LOH315 | KF985719 | Schenekar i sur. 2014. |
| LOH328 | KF985731 | Schenekar i sur. 2014. |
| LOH350 | KF985738 | Schenekar i sur. 2014. |

2.6. Analiza svojti na molekularnoj razini

Kako bi mogla utvrditi razlike među linijama i populacijama na razini nukleotida, koristila sam program SITES. Određivala sam dijagnostička mjesta (određena baza na određenom nukleotidnom mjestu, specifično za liniju), p-udaljenost (postotak udaljenosti između linija), fiksne razlike (razlike u nukleotidima između linija) i zajedničke polimorfizme (mutacije baza koje su se odvale u zajedničkom pretku i prenose se na potomke, odraz sestrinskih linija). Analize sam vršila na pastrvama skupljenim ovim istraživanjem i drugim predstavnicima linija iz Hrvatske.

3. REZULTATI

3.1. Morfološko razlikovanje svojti

3.1.1. Morfometrija

Morfometrijska mjerenja su provedena na 77 jedinki unutar 7 populacija. Deskriptivna statistika morfometrijskih mjerenja je prikazana u **Tablici 9**. Zanimljivo je za istaknuti da se populacija iz Zrmanje pokazala kao najmanja, a iz Cetine kao najveća po svim mjerama.

Tablica 9. Prikaz deskriptivne statistike s istaknutim minimumom (min), maksimumom (max), srednjom vrijednosti (\bar{x}) mjera i populacijama. Veličine su izražene u milimetrima (mm).

| Mjera | | Populacija | | | | | | |
|-------|-----------|------------|-------------------|---------------------|----------|---------|--------------------|---------|
| | | Cetina | Lička Jesenica | Matica korenička | Plitvica | Rječina | Vrelo koreničko | Zrmanja |
| TL | min | 153,52 | 92,13 | 90,16 | 114,67 | 166,00 | 61,56 | 72,94 |
| | max | 390,00 | 170,00 | 262,00 | 190,00 | 298,00 | 151,39 | 80,70 |
| | \bar{x} | 257,50 | 127,02 | 183,24 | 140,95 | 207,60 | 105,03 | 77,17 |
| SL | min | 127,75 | 77,50 | 75,34 | 97,06 | 139,00 | 52,07 | 57,86 |
| | max | 340,00 | 170,00 | 228,00 | 161,00 | 253,00 | 123,79 | 64,03 |
| | \bar{x} | 222,64 | 105,63 | 154,54 | 119,10 | 175,00 | 87,02 | 61,36 |
| Lc | min | 35,22 | 22,14 | 21,52 | 28,21 | 35,51 | 15,55 | 17,04 |
| | max | 79,63 | 51,15 | 59,77 | 43,52 | 68,29 | 37,75 | 18,51 |
| | \bar{x} | 56,97 | 30,34 | 43,59 | 33,21 | 46,19 | 26,47 | 17,55 |
| pan | min | 94,68 | 56,61 | 52,00 | 70,29 | 89,70 | 36,22 | 44,10 |
| | max | 260,00 | 120,06 | 164,00 | 115,94 | 186,00 | 92,78 | 48,08 |
| | \bar{x} | 165,00 | 78,04 | 109,84 | 85,33 | 123,75 | 62,86 | 45,47 |
| pA | min | 96,07 | 59,01 | 56,07 | 74,17 | 93,84 | 38,30 | 45,99 |
| | max | 270,00 | 127,18 | 166,00 | 121,96 | 193,00 | 97,75 | 52,75 |
| | \bar{x} | 172,49 | 81,68 | 115,27 | 88,88 | 128,77 | 66,37 | 48,91 |
| Van | min | 22,27 | 13,66 | 8,86 | 15,79 | 20,56 | 5,33 | 9,03 |
| | max | 66,58 | 31,44 | 44,62 | 28,22 | 44,50 | 19,72 | 9,66 |
| | \bar{x} | 41,76 | 19,44 | 25,15 | 20,13 | 29,47 | 12,02 | 9,39 |

Tablica 9. Nastavak

| | | | | | | | | |
|-------------|-----------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|
| pV | min | 74,59 | 43,25 | 41,82 | 55,56 | 68,88 | 28,75 | 33,83 |
| | max | 190,00 | 95,38 | 121,63 | 94,05 | 124,09 | 72,66 | 37,92 |
| | \bar{x} | 123,53 | 59,79 | 85,58 | 66,48 | 90,93 | 49,78 | 35,62 |
| pP | min | 31,16 | 18,57 | 16,30 | 22,87 | 32,52 | 13,01 | 15,10 |
| | max | 69,79 | 43,79 | 53,02 | 40,90 | 61,13 | 32,04 | 16,37 |
| | \bar{x} | 49,71 | 25,60 | 37,49 | 27,86 | 41,95 | 22,30 | 15,64 |
| pD | min | 61,27 | 36,99 | 37,69 | 46,80 | 62,96 | 25,49 | 30,16 |
| | max | 149,15 | 81,79 | 114,44 | 74,98 | 124,27 | 61,88 | 31,76 |
| | \bar{x} | 101,60 | 51,45 | 75,41 | 56,20 | 82,33 | 43,27 | 31,03 |
| lpC | min | 17,10 | 9,83 | 10,25 | 13,45 | 20,65 | 7,80 | 7,90 |
| | max | 45,62 | 27,31 | 37,37 | 23,24 | 32,22 | 19,90 | 9,84 |
| | \bar{x} | 30,55 | 14,62 | 22,26 | 18,07 | 25,60 | 13,19 | 8,59 |
| ID | min | 4,85 | 10,99 | 8,95 | 12,66 | 19,39 | 3,96 | 7,65 |
| | max | 40,96 | 24,65 | 27,78 | 20,33 | 40,29 | 17,24 | 8,64 |
| | \bar{x} | 24,40 | 15,60 | 19,61 | 14,43 | 26,42 | 10,55 | 8,00 |
| IA | min | 10,65 | 7,22 | 5,13 | 6,82 | 11,39 | 2,82 | 4,36 |
| | max | 31,22 | 14,80 | 22,94 | 16,00 | 22,72 | 9,57 | 4,97 |
| | \bar{x} | 19,61 | 10,08 | 13,33 | 9,56 | 14,84 | 6,39 | 4,68 |
| IC | min | 25,66 | 14,66 | 11,41 | 17,25 | 25,12 | 10,77 | 12,87 |
| | max | 56,19 | 30,94 | 41,43 | 27,48 | 45,51 | 27,22 | 13,87 |
| | \bar{x} | 40,21 | 20,25 | 28,87 | 20,92 | 33,12 | 17,84 | 13,42 |
| IP | min | 26,79 | 15,11 | 16,25 | 19,70 | 25,17 | 11,21 | 13,30 |
| | max | 50,36 | 32,26 | 39,65 | 29,87 | 40,83 | 24,50 | 14,19 |
| | \bar{x} | 36,97 | 20,76 | 30,00 | 23,03 | 30,83 | 18,08 | 13,89 |
| IV | min | 19,54 | 11,64 | 11,72 | 13,78 | 19,52 | 7,66 | 8,95 |
| | max | 36,66 | 23,75 | 34,95 | 21,90 | 35,59 | 18,58 | 19,47 |
| | \bar{x} | 29,46 | 15,73 | 23,42 | 16,67 | 25,04 | 13,23 | 12,61 |
| hco | min | 19,01 | 11,47 | 12,36 | 13,88 | 16,76 | 7,97 | 9,04 |
| | max | 37,74 | 29,20 | 32,24 | 22,72 | 32,78 | 19,51 | 10,51 |
| | \bar{x} | 28,58 | 15,48 | 22,70 | 16,66 | 23,73 | 13,75 | 9,78 |
| H | min | 36,60 | 20,05 | 19,73 | 22,00 | 30,03 | 11,75 | 13,01 |
| | max | 80,15 | 41,78 | 55,01 | 36,76 | 53,25 | 35,85 | 16,31 |
| | \bar{x} | 56,58 | 26,54 | 39,09 | 27,51 | 40,15 | 23,06 | 15,15 |
| h | min | 14,70 | 7,57 | 7,17 | 8,46 | 13,37 | 4,49 | 5,32 |
| | max | 33,69 | 18,10 | 19,63 | 15,33 | 24,27 | 13,74 | 6,27 |
| | \bar{x} | 23,84 | 11,04 | 14,63 | 10,85 | 17,25 | 8,81 | 5,82 |
| laco | min | 18,11 | 10,00 | 9,25 | 12,49 | 16,84 | 6,91 | 7,99 |
| | max | 40,79 | 24,51 | 31,65 | 22,28 | 35,76 | 19,02 | 8,49 |
| | \bar{x} | 29,18 | 14,81 | 22,37 | 15,47 | 22,46 | 12,67 | 8,25 |
| lac | min | 19,93 | 11,96 | 9,25 | 12,82 | 18,23 | 6,56 | 8,11 |
| | max | 43,48 | 22,72 | 31,05 | 21,94 | 37,00 | 19,71 | 8,67 |
| | \bar{x} | 30,43 | 15,60 | 22,56 | 16,17 | 23,33 | 13,17 | 8,47 |
| io | min | 9,67 | 6,27 | 4,88 | 7,63 | 9,42 | 3,12 | 3,89 |
| | max | 24,51 | 13,94 | 17,88 | 13,21 | 20,86 | 11,04 | 4,56 |
| | \bar{x} | 17,50 | 9,37 | 12,74 | 9,49 | 13,60 | 6,71 | 4,23 |
| Oh | min | 7,89 | 6,50 | 5,81 | 6,42 | 8,45 | 4,58 | 4,55 |
| | max | 13,59 | 11,01 | 12,61 | 10,55 | 12,21 | 9,30 | 5,70 |
| | \bar{x} | 10,68 | 7,88 | 9,74 | 8,34 | 10,06 | 6,62 | 5,03 |
| prO | min | 9,46 | 3,96 | 4,26 | 6,56 | 9,55 | 3,28 | 3,29 |
| | max | 22,36 | 15,15 | 16,68 | 11,86 | 19,87 | 9,34 | 3,87 |
| | \bar{x} | 15,54 | 7,19 | 11,63 | 8,12 | 12,45 | 6,10 | 3,63 |

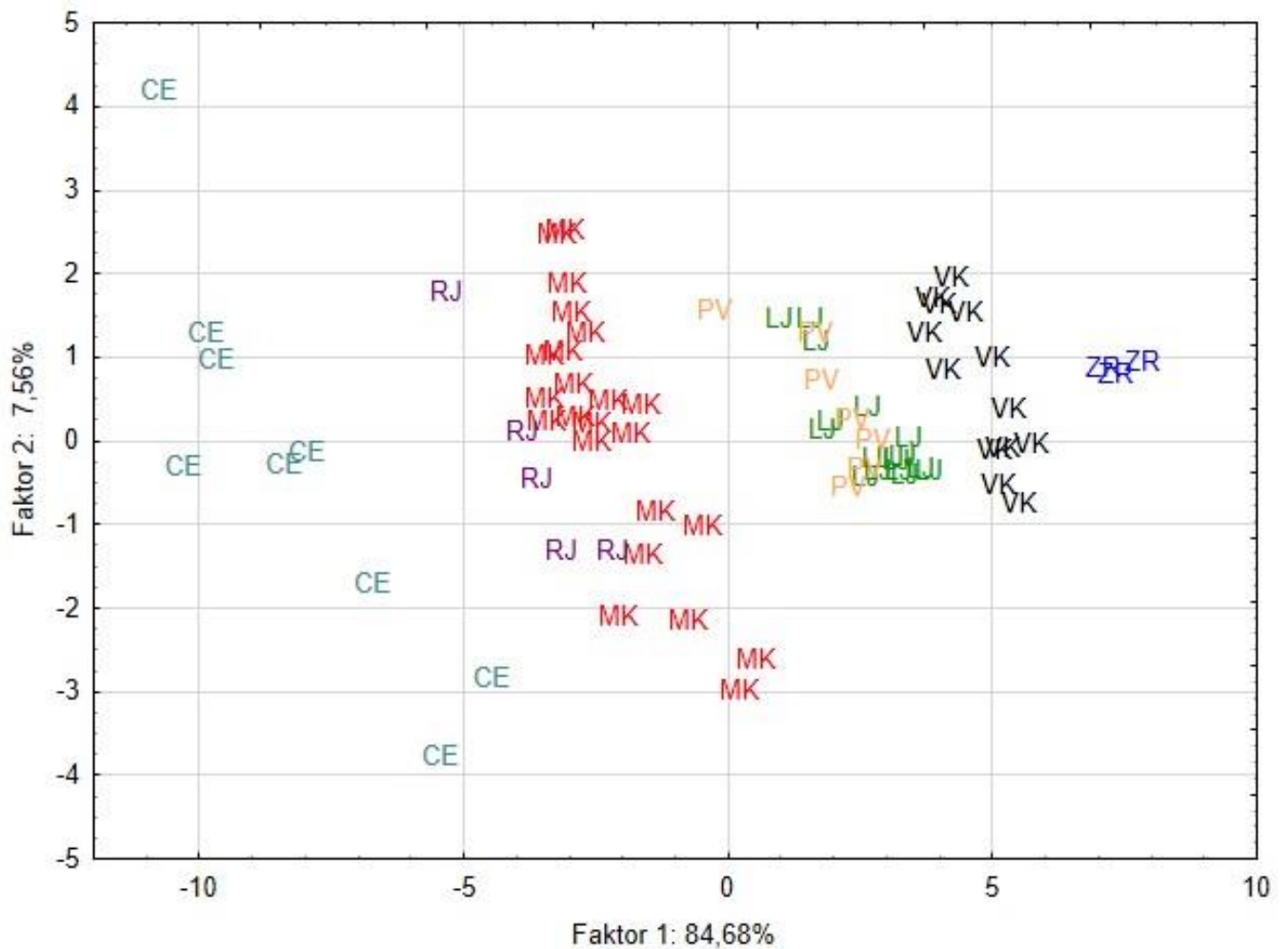
Tablica 9. Nastavak

| | | | | | | | | |
|------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| poO | min | 18,37 | 11,27 | 10,94 | 14,57 | 17,51 | 8,38 | 8,91 |
| | max | 46,40 | 27,60 | 34,54 | 23,80 | 38,50 | 20,54 | 10,16 |
| | \bar{x} | 32,19 | 16,05 | 23,58 | 17,51 | 25,46 | 13,93 | 9,67 |

Analiza varijanci (ANOVA) je provedena na prilagođenim morfometrijskim mjerama i pokazala je da se sve populacije međusobno razlikuju po svim varijablama (mjerama) i to s iznosom $p=0,0000$ na razini statističke značajnosti $p<0,05$.

Post hoc Fisher LSD test je ukazao na sličnosti i razlike među populacijama, i na koje se točno varijable te sličnosti i razlike odnose. Morfometrijski najbližijim populacijama su se pokazale plitvička i populacija iz Ličke Jesenice po svim mjerama, osim zaočnog prostora i duljine repnog drška. Veliku sličnost su pokazale populacije Rječine i Matice koreničke (sve mjere osim duljine repnog drška, duljine leđne peraje, duljine repne peraje, zaočnog prostora, najmanje visine tijela i ventroanalne duljine), dok su populacije iz Ličke Jesenice i Vrela koreničkog, Zrmanje i Vrela koreničkog, te Vrela koreničkog i Plitvice pokazale sličnost ali u puno manje mjera. Zanimljivo je bilo za primjetiti da niti jedna populacija nije pokazala sličnost za mjeru zaočnog prostora.

Provedena je i analiza glavnih komponenti (PCA; **Slika 7**) koja je zapravo i grafički potvrdila rezultate dobivene *post hoc* testovima. Najbližijima su se pokazale populacije iz Plitvice i Ličke Jesenice, te iz Rječine i Matice koreničke. Na Faktor 1 su, kao mjere, najviše utjecale duljina glave i najveća visina glave, dok su na Faktor 2 najviše utjecale duljina leđne i podrepne peraje, te su ta dva faktora zajedno obuhvatili preko 90% prvotne varijabilnosti.



Slika 7. Grafički prikaz rezultata PCA analize prilagođenih morfometrijskih mjera. Na osi x prikazan je iznos Faktora 1, a na osi y iznos Faktora 2. Različito obojena slova predstavljaju različite populacije – Cetina (CE; tirkizno), Rječina(RJ; ljubičasto), Matica korenička (MK; crveno), Plitvica (PV; žuto), Lička Jesenica (LJ; zeleno), Vrelo koreničko (VK; crno), Zrmanja (ZR; plavo).

Analiza varijanci provedena na omjerima je također prikazala mnogo razlika među populacijama (osim jednog omjera) na razini statističke značajnosti $p < 0,05$. P-vrijednosti su ipak bile raznovrsnije nego kod ANOVE provedene na morfometrijskim mjerama i prikazane su u **Tablici 10**.

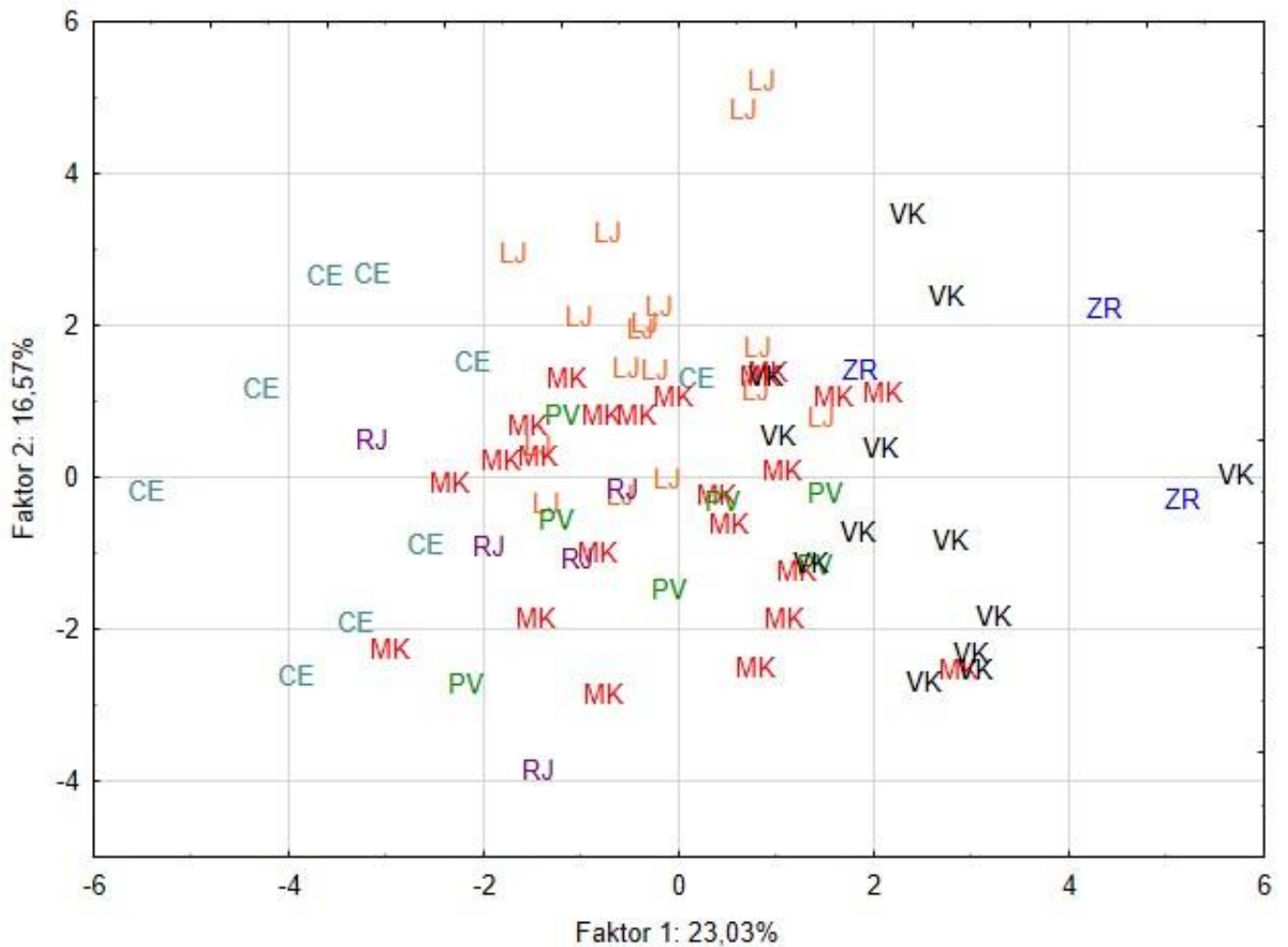
Tablica 10. Prikaz omjera i pripadajućih p-vrijednosti. P-vrijednosti koje su se pokazale statistički značajne istaknute su crvenim brojkama, dok je statistički neznačajna p-vrijednost istaknuta crnim brojkama.

| Omjer | p-vrijednost |
|---------|--------------|
| pan/SL | 0,0389 |
| pA/SL | 0,0194 |
| Van/SL | 0,0000 |
| pV/SL | 0,0012 |
| pP/SL | 0,0003 |
| pD/SL | 0,0197 |
| IpC/SL | 0,1299 |
| ID/SL | 0,0000 |
| IA/SL | 0,0000 |
| IC/SL | 0,0067 |
| IP/SL | 0,0000 |
| IV/SL | 0,0004 |
| hco/H | 0,0003 |
| h/H | 0,0000 |
| laco/SL | 0,0279 |
| lac/SL | 0,0366 |
| io/Lc | 0,0000 |
| Oh/Lc | 0,0000 |
| prO/Lc | 0,0000 |
| poO/Lc | 0,0176 |

Post hoc Fisher LSD test je ukazao na sličnosti i razlike među populacijama i na koje se točno omjere te sličnosti i razlike odnose. U ovoj analizi su se koristile stvarne, neprilagođene mjere kako bi se izračunali omjeri. Nije bio primjećen konkretni obrazac sličnosti ili razlika za populacije, kao što je to bilo kod morfometrijskih mjera, stoga se ne može povući strogi zaključak. Ipak, primjećeni su neki ekstremi, kada populacije u nekim omjerima u potpunosti odskaču od drugih, odnosno razlikuju se, npr. Lička Jesenica se razlikuje od svih ostalih populacija u omjeru duljine podrepne peraje i standardne duljine tijela, Rječina u omjeru preventralne udaljenosti i standardne duljine tijela, Zrmanja u omjeru duljine trbušne peraje i standardne duljine tijela, Cetina u omjerima najveće visine glave i najveće visine tijela, te promjera oka i duljine glave.

Provedena analiza glavnih komponenti (PCA; **Slika 8**) također nije prikazala određeni obrazac i grafički je potvrdila rezultate ANOVE. Populacije se nisu grupirale već su nehomogeno izmješane jedna s drugom. PCA je opet provedena s dva faktora korelacije, međutim zajedno su obuhvatili oko 40% prvotne varijabilnosti. Na Faktor 1 najviše su utjecali omjeri duljine prsne peraje i standardne duljine tijela, promjer oka i duljine glave, te širina međuočnog

prostora i duljine glave, dok su na Faktor 2 najviše utjecali omjeri preanalne udaljenosti, preanalne duljine i ventroanalne duljine sa standardnom duljinom tijela.



Slika 8. Grafički prikaz dobiven PCA analizom omjera. Na osi x prikazan je iznos Faktora 1, a na osi y iznos Faktora 2. Različito obojena slova predstavljaju različite populacije – Cetina (CE; tirkizno), Rječina (RJ; ljubičasto), Matica korenička (MK; crveno), Plitvica (PV; žuto), Lička Jesenica (LJ; zeleno), Vrelo koreničko (VK; crno), Zrmanja (ZR; plavo).

3.1.2. Meristika i fenologija

Meristika i fenologija su proučene na svih 77 jedinki iz različitih populacija. U obzir su se uzimale vanjske merističke i fenološke karakteristike riba. U **Tablici 11** i u **Tablici 12** prikazani su rezultati ove analize, i to kao rasponi za svaku populaciju.

Tablica 11. Merističke karakteristike populacija. Proučavane karakteristike su broj ljuski na bočnoj prugi (LL), broj šipčica u podreпноj (A), repnoj (C), trbušnim (V), prsnim (P) i u leđnoj (D) peraji.

| Populacija | LL | A | C | V | P | D |
|---------------------|---------|-------------|-----------|-------|---------|--------|
| Cetina | 104-120 | 8-9(1/2)+II | I+16-17+I | 8-9+I | 11-12+I | 9-10+I |
| Lička Jesenica | 95-122 | 8-9(1/2)+II | I+16+I | 8-9+I | 11-12+I | 9-10+I |
| Matica korenička | 101-129 | 8-9(1/2)+II | I+16+I | 8-9+I | 11-12+I | 9-10+I |
| Plitvica | 106-137 | 8-9(1/2)+II | I+16+I | 8+I | 12+I | 9-10+I |
| Rječina | 101-112 | 8-9(1/2)+II | I+16+I | 8-9+I | 12+I | 10+I |
| Vrelo koreničko | 104-127 | 9(1/2)+II | I+16-17+I | 8-9+I | 12+I | 9-10+I |
| Zrmanja | 103-117 | 8-9+I | I+15-16+I | 8-9+I | 11-12+I | 9-10+I |

Merističke karakteristike se nisu bitno razlikovale od populacije do populacije, jedino se populacija iz Zrmanje pokazala neznatno drukčijom od ostalih i to zbog nedostatka druge tvrde šipčice i rudimentarnog ostatka (1/2) na analnoj peraji, te populacija iz Plitvice, s najviše ljusaka u bočnoj pruzi.

Tablica 12. Fenološke karakteristike populacija.

| Populacija | Fenologija |
|------------------|--|
| Cetina | <ul style="list-style-type: none"> • Leđna peraja: 5-17 crnih točaka • Glava: 7-57 crnih točaka • Tijelo: 24-290 crnih točaka; 9-50 narančastih točaka |
| Lička Jesenica | <ul style="list-style-type: none"> • Leđna peraja: 1-19 crnih točaka; 2-11 narančastih točaka • Glava: 2-25 crnih točaka • Tijelo: 7-59 crnih točaka; 8-80 narančastih točaka |
| Matica korenička | <ul style="list-style-type: none"> • Leđna peraja: 2-34 crnih točaka; 3-16 narančastih točaka • Glava: 6-36 crnih točaka • Tijelo: 7-140 crnih točaka; 26-88 narančastih točaka |
| Plitvica | <ul style="list-style-type: none"> • Leđna peraja: 12-20 crnih točaka; 3-7 narančastih točaka • Glava: 11-35 crnih točaka • Tijelo: 22-125 crnih točaka; 31-57 narančastih točaka |
| Rječina | <ul style="list-style-type: none"> • Leđna peraja: 2-28 crnih točaka; 2-7 narančastih točaka • Glava: 7-37 crnih točaka • Tijelo: 49-108 crnih točaka; 26-84 narančastih točaka |
| Vrelo koreničko | <ul style="list-style-type: none"> • Leđna peraja: 4-20 crnih točaka; 1-7 narančastih točaka • Glava: 2-17 crnih točaka • Tijelo: 6-81 crnih točaka; 13-54 narančastih točaka |
| Zrmanja | <ul style="list-style-type: none"> • Leđna peraja: 0-7 crnih točaka • Glava: 1-12 crnih točaka • Tijelo: 43-87 crnih točaka; 4-12 narančastih točaka |

Fenološkom analizom također nisu utvrđene značajne razlike među populacijama, ali je utvrđena iznimna intrapopulacijska varijabilnost. Jedina razlika vrijedna spomena je bila u prisutnosti narančastih točki u leđnoj peraji kod svih populacija osim Cetine i Zrmanje, te izrazita crna pjegavost populacije iz Cetine.

3.2. Filogenetska rekonstrukcija svojti

Filogenetska rekonstrukcija temeljena je na sekvencama gena za citokrom *b* (*cyt b*) dugim 1141 parova baza, od kojih je 936 konstantnih i 205 varijabilnih. Parsimonijski značajnih mjesta je 34, dok je ostalih 171 varijabilnih mjesta neinformativno (nisu nositelji filogenetskog signala). Analize su provedene na 13 sekvenci potočne pastrve iz područja istraživanja, a radi lakše usporedbe i izgradnje filogenetskih stabala i mreža, uključene su i sekvence gena za *cyt b* potočnih pastrva s drugih lokaliteta iz prethodno provedenih istraživanja u Hrvatskoj i Banke gena. Za ukorjenjenje stabala koristila se vrsta *Thymallus thymallus*.

Ukupno su utvrđena 33 različita haplotipa roda *Salmo*, a dobivena stabla pokazuju jednaku topologiju. Također je vidljiva izrazita struktuiranost svojte *Salmo trutta* postojanjem nekoliko evolucijski odvojenih linija. Gen za citokrom *b* je pokazao da potočne pastrve Hrvatske spadaju u 4 nezavisne evolucijske linije.

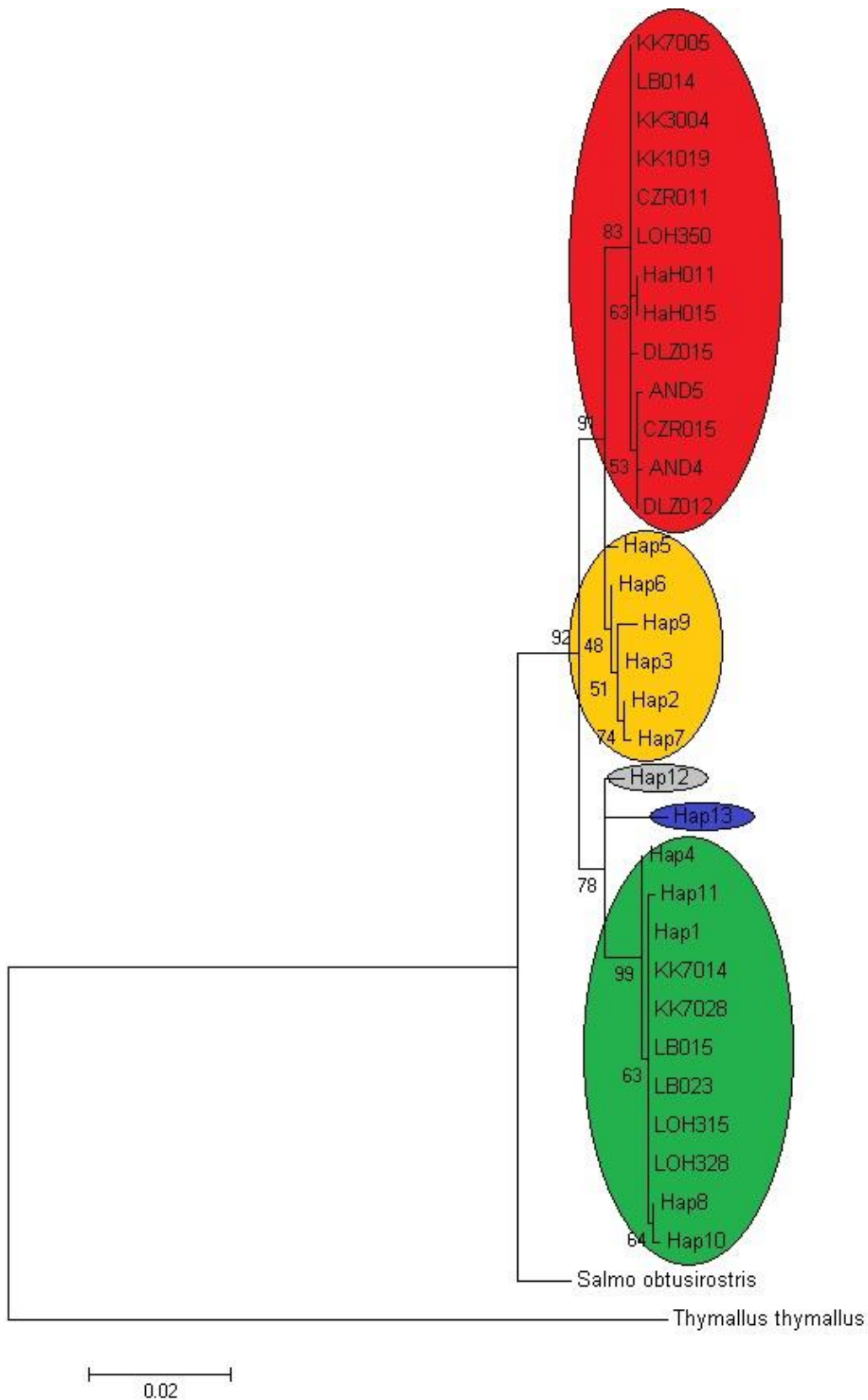
Prvoj liniji pripadaju dva haplotipa s područja istraživanja, tri s područja Republike Hrvatske iz prethodnih istraživanja i šest austrijskih haplotipova dunavskog slijeva iz Banke gena. Ova linija se tradicionalno nazivala dunavskom linijom, međutim primjereniji je naziv dinarsko-dunavska linija jer su istraživanja pokazala da ima širu rasprostranjenost no što se prije smatralo, te je osobito raznolika u dinarskom području (Buj i sur. 2017b). Ovo je istraživanje pokazalo kako pastrve dinarsko-dunavske linije obitavaju u Plitvici, Ličkoj Jesenici i Matici koreničkoj, a u prethodnim istraživanjima uočena je u Dobri, Ševerovoj pećini i Krasulji, u Hrvatskoj.

Ostatak haplotipova iz ovog istraživanja pripala su plitvičkoj liniji, najvjerojatnije liniji autohtonij za šire područje Plitvičkih jezera. Ova linija se topologijom stabala pokazala drukčijom od ostalih linija potočne pastrve, odnosno, utvrđen je njen sestrinski položaj u odnosu na atlantsku liniju. Plitvička linija u ovom istraživanju pronađena je samo u Matici koreničkoj, dok se po prethodnim istraživanjima može naći još u Rijeci koreničkoj, Lovincu i Dobri.

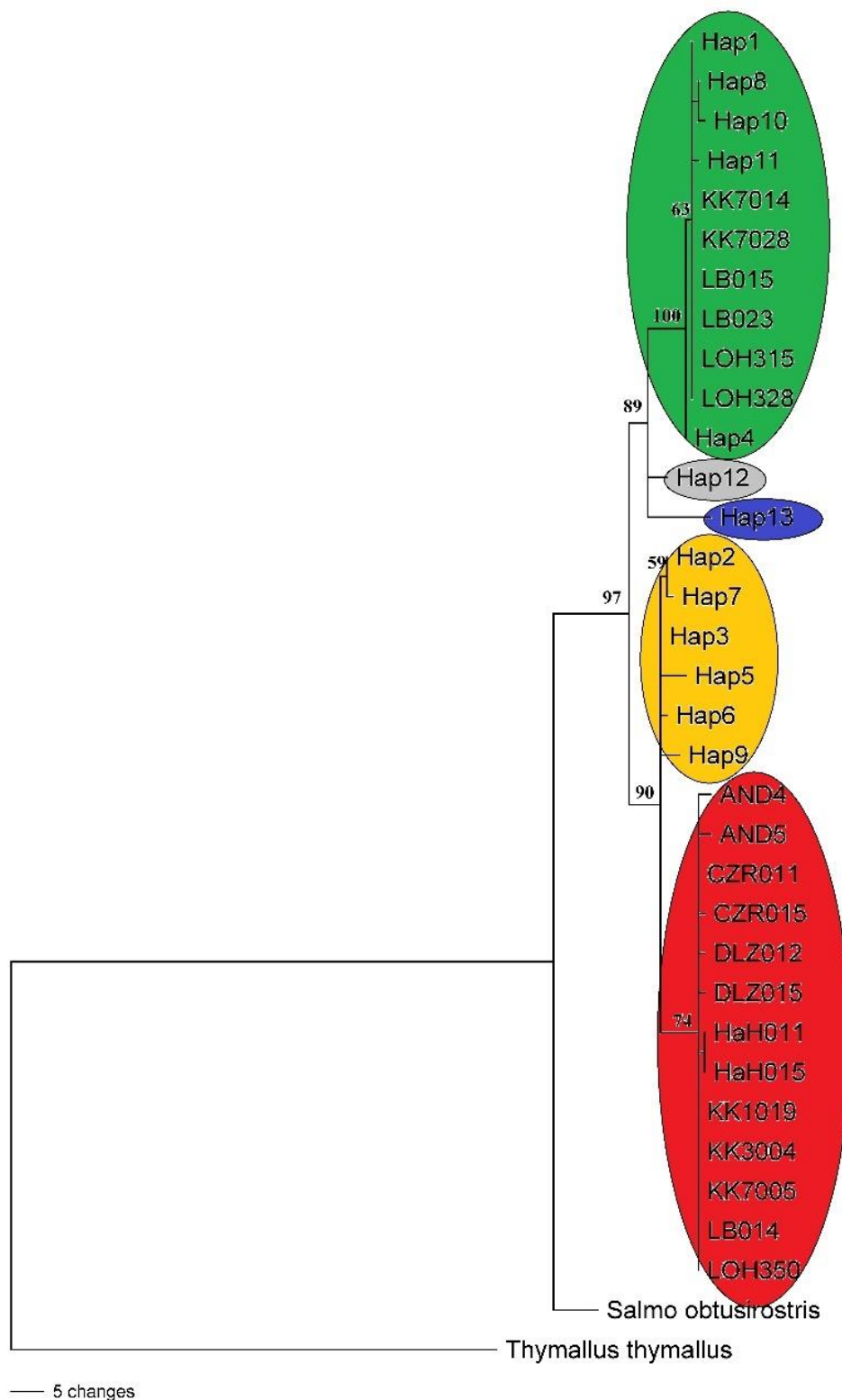
Atlantska linija nije pronađena ovim, ali ni prethodnim istraživanjima u Hrvatskoj. Ovoj liniji pripali su haplotipovi s područja Austrije iz istraživanja Schenekara i suradnika iz 2014. godine. Iz oba prikazana stabla (**Slika 9** i **Slika 10**) jasno je vidljiva izdvojenost atlantske linije i njezin položaj kao sestrinska plitvičkoj liniji.

Jadranska linija također nije pronađena ovim istraživanjem, ali po prethodnim istraživanjima pojavljuje se u Paškom polju pored rijeke Cetine. Iako su obrađivani uzorci i s Cetine i sa Zrmanje, njihovo sekvenciranje nije uspjelo, pa nije mogla biti potvrđena pripadnost linijama, dok je morfološka analiza provedena.

Za liniju *marmoratus* nema mnogo podataka. U ovom istraživanju nije pronađena, a u prethodnima je pronađena samo u Modrom oku. Iz stabala se može očitati njezina bliskost s jadranskom linijom.

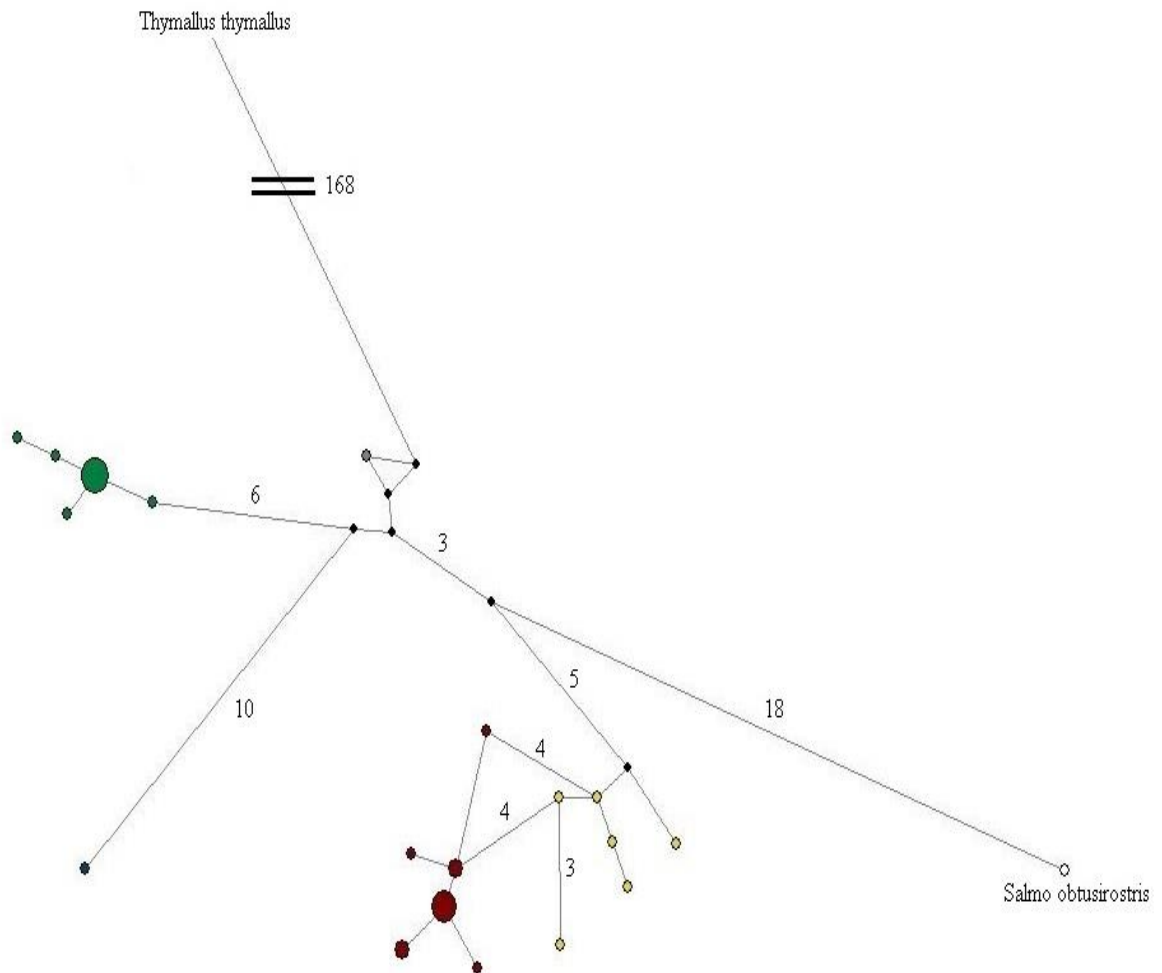


Slika 9. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju mitohondrijskog *cyt b* gena. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Haplotipovi različitih linija su smješteni unutar različito obojenog oblačića (atlantska linija-crveno; plitvička linija – žuto; linija *marmoratus* – sivo; jadranska linija – plavo; dinarsko-dunavska linija – zeleno). Haplotipovi iz ovog istraživanja označeni su s Hap i brojem.



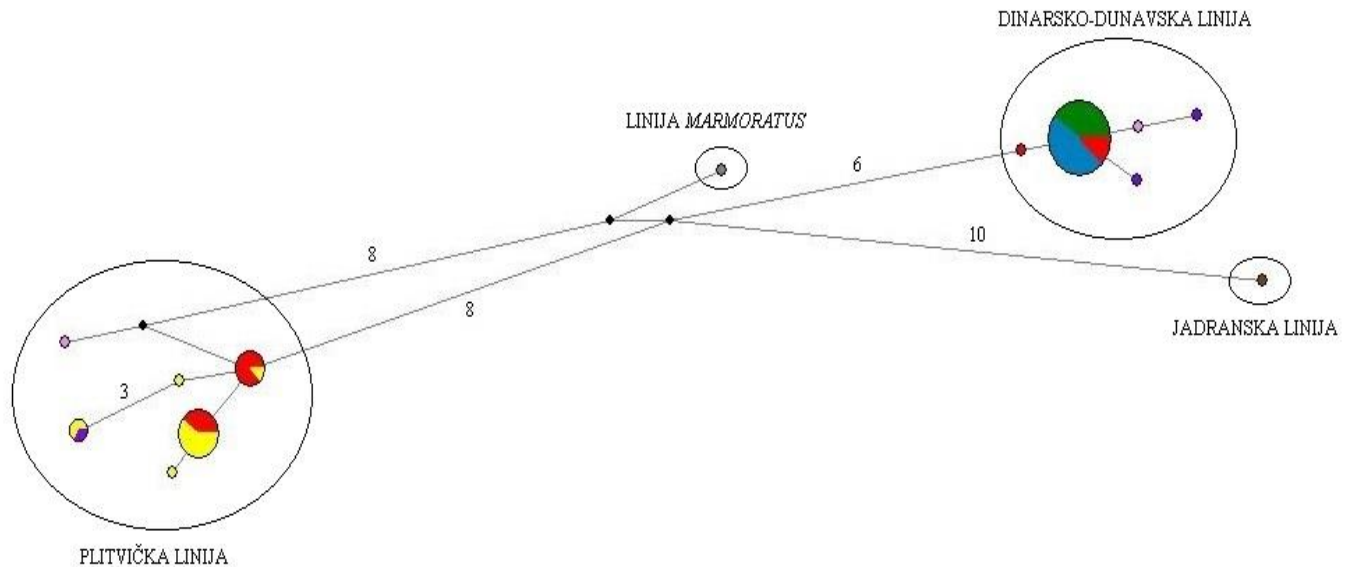
Slika 10. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju mitohondrijskog *cyt b* gena. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima. Haplotipovi različitih linija su smješteni unutar različito obojenog oblačića (atlantska linija-crveno; plitvička linija – žuto; linija *marmoratus* – sivo; jadranska linija – plavo; dinarsko-dunavska linija – zeleno). Haplotipovi iz ovog istraživanja označeni su s Hap i brojem.

Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) pokazala je jasno odvajanje različitih linija, razlike u broju mutacija, te stvorene nove haplotipove kao posljedicu tih mutacija (**Slika 11**).



Slika 11. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ). Brojevi predstavljaju broj mutacija ako je >2 . Haplotipovi dinarsko-dunavske linije označeni su zelenim točkama, atlantske linije crvenim, plitvičke linije žutim, jadranske linije plavom, linije *marmoratus* sivom, dok crne točke predstavljaju neprimjećene haplotipove. Promjer točaka proporcionalan je broju sekvenci svakog haplotipa.

Druga filogenetska mreža koja je dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) pokazala je odvajanje različitih linija po lokalitetima. U ovu filogenetsku mrežu (**Slika 12**) bile su uključene samo sekvence iz Hrvatske, odnosno iz ovog i iz prethodnih istraživanja.



Slika 12. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ). Brojevi predstavljaju broj mutacija ako je >2 . Različito obojene točke predstavljaju sekvence s različitih lokaliteta (crveno – Matica korenička; žuto – Rijeka korenička; zeleno – Lička Jesenica; plavo – Plitvica; ljubičasto – Lovinac, Krasulja, Ševerova pećina; roza – Dobra; sivo – Modro oko; smeđe – Paško polje). Crne točke predstavljaju neprimjećene haplotipove. Promjer točaka proporcionalan je broju sekvenci na svakom lokalitetu.

3.3. Molekularno razlikovanje svojti

Molekularne analize su se izvodile pomoću sekvenci iz ovog istraživanja i iz prijašnjih istraživanja vršenih u Republici Hrvatskoj.

Rezultati filogenetskih analiza su pokazale da potočne pastrve s istog lokaliteta mogu pripadati različitim linijama (svojtama), te da su te svojte genski različite i nezavisne. Konkretno, radilo se o plitvičkoj i dinarsko-dunavskoj liniji, koje su bile prisutne istovremeno u Matici koreničkoj, Rijeci koreničkoj i Dobri. Takav rezultat potvrđuje i p-udaljenost čije su srednje vrijednosti prikazane u **Tablici 13**. Postotak udaljenosti unutar linije očekivano je bio manji nego između linija.

Tablica 13. Srednje vrijednosti p-udaljenosti između linija pastrva (crna slova), unutar linija (crvena slova) i neto srednje vrijednosti p-udaljenosti (plava slova) izražene u postocima (%).

| | dinarsko-dunavska linija | plitvička linija | <i>marmoratus</i> linija | jadranska linija |
|--------------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| dinarsko-dunavska linija | 0,158 | 1,493 | 0,929 | 1,543 |
| plitvička linija | 1,265 | 0,298 | 1,066 | 1,709 |
| <i>marmoratus</i> linija | 0,850 | 0,917 | 0,000 | 1,139 |
| jadranska linija | 1,464 | 1,560 | 1,139 | 0,000 |

Veliku gensku razliku među linijama potvrdio je i broj fiksiranih (fiksni) razlika prikazan u **Tablici 14**, odnosno broj pozicija u *cyt b* genu na kojem pripadnici različitih svojti (linija) imaju različite nukleotidne baze. Kako bi se linije mogle razlikovati i na molekularnoj razini, određena su i tzv. dijagnostička mjesta, prikazana u **Tablici 15**. Ona omogućuju da se linija potpuno određi pomoću nukleotida prisutnog na određenoj poziciji.

Analiza zajedničkih polimorfizama je pokazala da je jedini zajednički polimorfizam prisutan samo između dinarsko-dunavske i plitvičke linije, što potvrđuje njihov sestrinski položaj.

Tablica 14. Fiksne razlike na *cyt b* genu između linija.

| | dinarsko-dunavska linija | plitvička linija | <i>marmoratus</i> linija | jadranska linija |
|--------------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| dinarsko-dunavska linija | - | 13 | 9 | 16 |
| plitvička linija | - | - | 9 | 17 |
| <i>marmoratus</i> linija | - | - | - | 13 |
| jadranska linija | - | - | - | - |

Tablica 15. Fiksne razlike na *cyt b* genu s navedenim nukletidnim mjestima fiksnih razlika i bazama prisutnim kod pojedine linije. Dijagnostička mjesta za pojedinu liniju predstavljaju nukleotidi u crvenim poljima.

| NUKLEOTIDNO MJESTO | LINIJA | | | |
|-----------------------|-----------------------|-----------|-------------------|-----------|
| | dinarsko- dunavska | plitvička | <i>marmoratus</i> | jadranska |
| 69 | A | A | A | C |
| 115 | T | T | T | C |
| 117 | G | A | G | G |
| 165 | T | C | C | C |
| 216 | C | T | C | C |
| 240 | G | A | A | A |
| 466 | G | G | G | A |
| 504 | T | C | T | T |
| 573 | C | T | T | T |
| 630 | T | T | T | C |
| 654 | C | C | C | T |
| 666 | C | A | C | C |
| 706 | T | C | C | C |
| 732 | G | G | G | A |
| 750 | C | C | A | C |
| 768 | T | T | T | C |
| 777 | C | C | C | T |
| 849 | T | C | T | T |
| 885 | A | A | A | G |
| 891 | G | G | A | G |
| 915 | C | T | C | C |
| 990 | A | A | A | G |
| 1041 | T | C | T | T |
| 1044 | C | T | T | T |
| 1113 | A | G | G | G |

4. RASPRAVA

4.1. Filogenija potočne pastrve u Hrvatskoj

Filogenetskim mrežama i stablima u ovom istraživanju utvrđeno je da u Republici Hrvatskoj obitavaju minimalno 4 filogenetske linije potočne pastrve – dinarsko-dunavska, plitvička, jadranska i *marmoratus* linija. Linije su se topološki na stablima jasno odvojile jedna od druge, a uz to, bilo je lako za primijetiti sestrinsku srodnost plitvičke i atlantske linije, kako u stablima tako i u filogenetskoj mreži dobivenoj metodom susjednog povezivanja. Srodnost ove dvije linije nije bila očekivana i predstavlja vrlo zanimljiv rezultat jer sa sobom povlači filogeografska, evolucijska i povijesna pitanja. Haplotipovi atlantske linije korišteni u ovom istraživanju potječu iz Austrije stoga je mogući uzrok ovakvog filogenetskog položaja postglacijalna ekspanzija, odnosno prirodno širenje vodotokova i širenje (migracija) vrsta u razdoblju nakon ledenog doba (Schenekar i sur. 2014; Suárez i sur. 2001). S obzirom da točno vrijeme odvajanja ovih linija nije poznato, u obzir bi trebalo uzeti i sam politički status teritorija RH u povijesti. Plitvička linija pronađena je na lokalitetima (Matica korenička, Rijeka korenička, Lovinac, Dobra) koja su se u prošlosti nalazili u tzv. Hrvatskoj vojnoj krajini (njem. *Krabatische Graenitz*), teritoriju koji je pripadao Habsburškoj monarhiji pod direktnom vladavinom Austrije (www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=65199, pristupljeno 10.5.2018.). Potočna pastrva se već stoljećima koristi kao hrana, a prvi zabilježeni pastrvski ribnjak sagrađen je u Čabru 1882. godine (www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=52715, pristupljeno 10.5.2018.), te je moguće da je atlantska linija donešena iz Austrije na to područje za uzgoj. Potočna pastrva je poznata po svojoj plastičnosti i brzoj prilagodbi okolišu, a ako se mikroevolucija dovoljno brzo odvijala, ovakav scenarij, iako malo vjerojatan, postaje moguć. S druge strane, analiza zajedničkih polimorfizama je ukazala na sestrinski odnos plitvičke i dinarsko-dunavske linije, što bi odgovaralo pretpostavljenom geografskom arealu ove dvije linije i činjenici da su prisutne u istim vodotocima. Međutim pronađen je samo jedan zajednički polimorfizam, te je istraživanje rađeno na malom uzorku, stoga je teško donijeti konkretan zaključak. Za donošenje točnog zaključka o filogeografiji, evolucijskoj povijesti i brzini evolucije ove linije potrebno je provesti dodatna istraživanja koja bi uključivala više lokaliteta i više genskih markera. Ako se utvrdi da je plitvička linija autohtona za područje Hrvatske, pobila bi se tvrdnja Freyhofa iz 2011. te Kottelata i Freyhofa iz 2007. da je atlantska linija alohtona za područje srednje i južne Europe, što je zapravo u skladu s novijim istraživanjima (Schenekar i sur. 2014).

Velika genska varijabilnost potočne pastrve dokazana je i filogenetskim mrežama. U istom toku rijeke moguća je prisutnost dviju linija (plitvička i dinarsko-dunavska), koje se međusobno vjerojatno ne razmnožavaju, iako bi trebalo provesti dodatna istraživanja zbog sklonosti riba ka hibridizaciji, pogotovo potočne pastrve za koju se otkrilo da može hibridizirati čak i s atlantskim lososom (*Salmo salar* Linnaeus, 1758; Wilson i Bernatchez 1998; Leaniz i Verspoor 1989) ali i pojave zajedničkog polimorfizma između te dvije linije. Reproductivna izoliranost i brojne genske mutacije prisutne između linija ukazuju na mogućnost da se radi o odvojenim podvrstama ili čak zasebnim vrstama, pogotovo ako se za usporedbu koristi druga vrsta iz istog roda kao što je mekousna pastrva (*Salmo obtusirostris*) i broj mutacija koje su tu vrstu odvojile od ostalih vrsta iz roda *Salmo*. Zanimljivo je poklapanje u rezultatima filogenetske mreže i izračuna p-udaljenosti, odnosno postotku razlike među linijama. Linije koje su se ovim istraživanjem pokazale najrazličitijima bile su jadranska i plitvička (razlika 1,7 %), a najbližije dinarsko-dunavska i *marmoratus* linija (razlika 0,9 %). Na mrežama se te genske razlike mogu jasno vidjeti u obliku broja mutacija. Ovakav srodstveni odnos linija može biti posljedica radijacije vrste nakon oledbi (Bernatchez 2001) kada se linije koje su se prije odvojile više genski razlikuju ili premalog uzorka određenih linija koji je onemogućio prikaz ukupne genske varijabilnosti. Konkretno, moguće je bilo korištenje samo po jednog haplotipa za jadransku i *marmoratus* liniju zbog neuspjelih sekvenciranja, što se odrazilo na prikaz različitosti unutar tih linija (0 %).

Provođenjem ovog istraživanja primijetilo se i da je DNA pastrve sačuvana u visokopostotnom etanolu kratkoživuća. Naime, DNA analiza uzoraka iz toka Cetine, Zrmanje, Rječine i Vrela koreničkog se nije pokazala uspješnom, vjerojatno jer su ti uzorci duže stajali u etanolu čekajući istraživanje. Zbog toga su se koristili dodatni haplotipovi iz istih ili sličnih vodotokova dobiveni prethodnim istraživanjima. Iako se iz ovog istraživanja još uvijek ne može donijeti konkretan zaključak o filogeniji i taksonomskom statusu potočne pastrve, ovaj rad je zasigurno započeo razrješenje taksonomske zavrzlane vezane uz takson *Salmo trutta*. Potrebno je provesti detaljnije istraživanje na ovu temu kako bi se mogli objaviti točni zaključci, te kako bi napokon taksonomija najpoznatije vrste unutar roda *Salmo* bila poznata.

4.2. Dijagnostička svojstva za razlikovanje linija potočne pastrve

Razlikovanje linija bilo je jasno na genskoj razini, međutim njihova morfologija nije u jednakoj mjeri odražavala genske razlike. Na ovakav rezultat uvelike je utjecala činjenica da se od 77 jedinki, samo njih 13 moglo međusobno morfološki i genetski usporediti i to zbog neuspjelih DNA sekvencioniranja. Iz tog razloga nije moguće utvrditi koja su točno morfološka dijagnostička svojstva za određenu liniju, još više radi činjenice da u istom vodotoku mogu živjeti dvije različite linije.

Morfometrija se ipak pokazala vrlo korisnim alatom, pogotovo ako su se koristile prilagođene mjere. Rezultati su potvrdili veliku morfometrijsku raznolikost populacija, što je u skladu s prethodnim zaključcima o velikoj morfološkoj plastičnosti i varijabilnosti potočnih pastrva (Meraner i sur. 2013; Freyhof 2011). Prilagođene mjere su se pokazale vrlo korisnima jer je još prilikom izvođenja istraživanja primijećena velika razlika u veličini jedinki, i u populacijama ali i između populacija. Uklanjanjem te varijable, dobila se lijepa i jasna slika morfometrijskih sličnosti i razlika između populacija, gdje su se populacije iz Ličke Jesenice i Plitvice, te Matice koreničke i Rječine pokazale najbližijima, u skladu s njihovom geografskom rasprostranjenošću. Sličnost između Matice koreničke i Vrela koreničkog nije primijećena, iako su ta dva vodotoka povezana. Morfološke razlike ovih dviju populacija bi se mogle objasniti unosom alohtonih linija, s obzirom da su na tom području zabilježena ribogojišta.

S druge strane, ukoliko su prilagođene mjere bile isključene, rezultati su bili mnogo konfuzniji i pojavljivali su se ekstremi, kako u istraživanju omjera morfometrijskih značajki, tako i u meristici i fenologiji. Ove metode su također potvrdile iznimnu plastičnost potočne pastrve, te fenološku raznolikost. Fenologija i meristika ovih populacija imale su veliki raspon varijabilnosti, te su uglavnom potvrdile raspon merističkih mjera koje su još davne 1971. godine objavili Vuković i Ivanović, iako je teško potvrditi u koju liniju/vrstu/podvrstu bi svaka od populacija pripadala. S druge strane, raspored i količina točkica se nisu pokazale dijagnostičkim svojstvom kako su to utvrdili Giuffra i sur. 1996. godine. Ovom metodom najizraženiji su postali ekstremi, kao što je populacija iz Cetine s najviše crnih točkica ili Zrmanja s najmanje narančastih točkica. Ovakva pojava bi se mogla objasniti veličinom jedinki (jedinke iz Cetine bile su najveće, a iz Zrmanje najmanje) i konzervacijom u formalinu i etanolu, za koje je poznato da utječu na promjenu vanjskog obojenja životinja, što se posebno izrazilo na populaciju iz Zrmanje koje su vidno izgubile obojenje. Sve uhvaćene jedinke iz Zrmanje imale su poprečne tamne pruge po tijelu, karakteristične za mlade ribe, što ujedno objašnjava njihovu manju veličinu (Klemetsen i sur. 2003). Kod manjih jedinki su bila primijećena manja

mehanička oštećenja peraja i ljuski što je moglo utjecati na rezultate. Kako bi se ovakve pojave anulirale, bilo bi dobro koristiti unutarnje merističke karakteristike, poput broja piloričkih nastavaka ili otolita (Keat-Chuan i sur. 2017; Vuković i Ivanović 1971). Pigmentacija riba može biti uvjetovana prehranom (Keat-Chuan i sur. 2017), stoga kod određivanja vrsta ili linija pomoću uzoraka ili boje treba biti oprezan.

Molekularna dijagnostika linija pokazala se uspješnom i lako izvedivom, s velikim brojem fiksnih razlika između linija. Ova metoda predstavlja vjerojatno najjednostavniji način određivanja linija jer je za determinaciju potrebno samo usporediti nukleotide na specifičnoj poziciji. Međutim i kod ove metode treba biti oprezan jer ovako veliki broj fiksnih mjesta može biti odraz malog uzorka unutar istraživanja. Potrebno je napraviti opsežnije istraživanje s više uzoraka kako bi se ova fiksna dijagnostička mjesta mogla potvrditi. Kada bi se usporedili rezultati molekularnih i morfoloških analiza, trebalo bi uzeti u obzir samu problematiku uzoraka koji nisu uspjeli. Naime, u morfološkom dijelu istraživanja analiziralo se 77 jedinki prikupljenih u ovom istraživanju, a u molekularnom samo 13 iz ovog istraživanja dok su ostali uzorci dobiveni prethodnim istraživanjima na istim ili sličnim lokalitetima. To samu usporedbu čini nepreciznom, no moguće je iznijeti neke od hipoteza. Za populacije iz Rječine, Cetine i Zrmanje se pretpostavljalo da pripadaju jadranskoj liniji (Bernatchez i sur. 1992) i one su se morfometrijski jasno razlikovale od ostalih populacija, iako su se i međusobno dosta razlikovale. Rezultati p-udaljenosti i broja fiksnih razlika, ali na kraju i filogenetskih stabala i mreža mogli bi potvrditi tu hipotezu, jer se i po njima ta linija dosta razlikuje od drugih linija. Zanimljiva je i usporedba plitvičke i dinarsko-dunavske linije, koja je molekularnim analizama pokazala velike razlike, dok su morfometrijski bile najbližnje naspram ostalih populacija, uz pretpostavku da su populacije iz područja Like i Gorskog kotara dio tih linija. Moguće objašnjenje ove pojave jest sama prilagodljivost i plastičnost pastrve. Staništa u području Like i Gorskog kotara su međusobno sličnija nego ona jadranskog slijeva, što se odrazilo na izgled potočnih pastrva koje su morfološki sličnije, iako su genski i dalje prilično udaljene. To bi bilo u skladu s tvrdnjama drugih autora (Meraner i sur. 2013; Freyhof 2011; Kottelat i Freyhof 2007) o velikoj plastičnosti potočnih pastrva. Međutim, nije moguće donijeti precizan zaključak, upravo zbog nedostatka uzoraka DNA kako bi se jedinke mogle pravilno i točno usporediti.

U konačnici, teško je donijeti konkretan zaključak o taksonomskom položaju potočne pastrve u Hrvatskoj. Kada bi se promatrale genske, filogenetske ali i morfološke razlike, odnosno broj mutacija između linija i morfološka različitost, svaka linija bi predstavljala zasebnu vrstu, te bi se predložio model sličan onome Vukovića i Ivanovića (1971) te Kottelata i Freyhofa (2007), gdje bi jadranska linija bila vrsta *Salmo farioides*, dinarsko-dunavska *Salmo labrax*, a

marmoratus linija *Salmo marmoratus*. S druge strane, plitvička linija je pokazala sestrinski položaj u odnosu na atlantsku liniju, što se protivi teoriji Kottelata i Freyhofa (2007) o isključivoj vezanosti vrste *Salmo trutta* (sensu stricto) uz sjever Europe. Ipak, za donijeti snažan zaključak o taksonomskom položaju potočne pastrve, potrebno je provesti dodatna istraživanja koja bi uključivala još više lokaliteta ali i populacija iz drugih zemalja. Zbog brzine propadanja uzoraka DNA potočnih pastrva, u budućim istraživanjima bilo bi dobro odmah provesti molekularne i filogenetske analize, te ih uskladiti s morfološkom analizom kako bi se kasnije mogle usporediti linije. Time bi se dobila točnija evolucijska i filogenetska slika, te bi se mogla izraditi točna karta rasprostranjenosti linija. Sve to vodilo bi ka očuvanju same vrste i njezine genske raznolikosti, što u novije doba predstavlja sve veći problem. Brojne prijetnje modernog doba (globalno zagrijavanje, invazivne vrste, degradacija staništa, krivolov...) ostavljaju sve manje vremena i prostora za čekanje i postepeno rješavanje problema. Bez obzira na taksonomski ishod istraživanja, s konzervacijom ove vrste i njenih linija potrebno je krenuti odmah jer kasnije nema povratka.

5. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata, usporedbe morfologije linija, filogenetskih stabala i mreža, te molekularnih analiza, može se zaključiti:

- Na području Republike Hrvatske obitavaju minimalno 4 filogenetske linije potočne pastrve (*Salmo trutta*), no njihov točan taksonomski položaj se još uvijek ne može sa sigurnošću odrediti, iako je zbog velikog broja mutacija moguće da se radi čak o zasebnim vrstama.
- Morfološka dijagnostička svojstva svake od linija nije bilo moguće odrediti, iako su se populacije morfometrijski međusobno jako razlikovale. Meristika i fenologija nisu pokazale značajne razlike među populacijama.
- Utvrđena su točna molekularna dijagnostička mjesta za određivanje linija koja su potvrdila velik broj mutacija i gensku raznolikost među linijama.
- Populacije su pokazale izrazitu morfološku raznolikost čime je potvrđeno da se radi o veoma plastičnoj vrsti.
- Najbolje svojstvo za morfološku identifikaciju nije prepoznato, dok se najboljom metodom pokazao sustav prilagođenih morfometrijskih mjera.

Rezultati dobiveni ovim radom mogu se upotrijebiti kao smjernica za buduća istraživanja ove vrste u svrhu boljeg poznavanja taksonomije, ali i organizacije monitoringa i programa zaštite.

6. LITERATURA

- Allendorf F. W., England P. R., Luikart G., Ritchie P. A., Ryman N. (2008): Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends Ecol. Evol.* **23** (6): 327-337.
- Apostolidis A., Apostolou P., Georgiadis A., Sandaltzopoulos R. (2007): Rapid identification of *Salmo trutta* lineages by multiplex PCR utilizing primers tailored to discriminate single nucleotide polymorphisms (SNPs) of mitochondrial control region. *Conservation Genetics* **8**: 1025-1028.
- Araki H., Berejikian B. A., Ford M. J., Blouin M. S. (2008): Fitness of hatchery-reared salmonids in the wild. *Evolutionary Applications* **1**: 342-355.
- Araki H., Cooper B., Blouin M. S. (2007): Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* **318**: 100-103.
- Behnke, R. J. (1986): Brown trout. *Trout* **27**: 42 – 47.
- Bermingham E., Moritz C. (1998): Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* **7**: 367-369.
- Bernatchez L. (2001): The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* **55**: 351-379.
- Bernatchez L., Guyomard R., Bonhomme F. (1992): DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* **1**: 161-173.
- Bianco, P. G. (1990): Potential role of the palaeohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyoi. Explor. Freshwaters* **1** (2):167 – 184.
- Buj I., Marčić Z., Čaleta M., Šanda R., Geiger M. F., Freyhof J. (2017a): Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes). *PLoS ONE* **12** (12): e0187366.
- Buj I., Marčić Z., Čaleta M., Duplić A., Raguž L. (2017b): Očuvanje prirodne baštine NP Plitvička jezera. Program istraživanja, obnove i zaštite autohtone potočne pastreve. Hrvatsko ihtiološko društvo, Zagreb.

- Buj I., Šanda R., Marčić Z., Čaleta M., Mrakovčić M. (2014): Combining Morphology and Genetics in Resolving Taxonomy—A Systematic Revision of Spined Loaches (Genus *Cobitis*; Cypriniformes, Actinopterygii) in the Adriatic Watershed. PLoS ONE **9** (6): e99833.
- Calisher C. H. (2007): Taxonomy: what's in the name? Doesn't a rose by any other name smell as sweet? Croatian Medical Journal **48** (2): 268-270.
- Christie M. R., Marine M. L., French R. A., Waples R. S., Blouin M. S. (2012): Effective size of a wild salmonid population is greatly reduced by hatchery supplementation. Heredity **109** (4): 254-260.
- Coleman F. C., Figueira W. F., Ueland J. S., Crowder L. B. (2004): The impact of United States recreational fisheries on marine fish populations. Science **305**: 1958-1960.
- Coltman D. W., O'Donoghue P., Jorgenson J. T., Hogg J. T., Strobeck C., Festa-Bianchet M. (2003): Undesirable evolutionary consequences of trophy hunting. Nature **426**: 655-658.
- Crete-Lafreniere A., Weir L., Bernatchez L. (2012): Framing the Salmonidae Family Phylogenetic Portrait: A More Complete Picture From Increased Taxon Sampling. PLoS ONE **7** (10): e46662.
- Čaleta M., Buj I., Mrakovčić M., Mustafić P., Zanella D., Duplić A., Mihinjač T., Katavić A. (2015): Hrvatske endemske ribe. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb.
- Ebach M. C., Holdrege C. (2005): DNA barcoding is no substitute for taxonomy. Nature **434**: 697.
- Elliott N., Koslow J. A., Haskard K. A. (1995): Morphometric analysis of orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) off the continental slope of Southern Australia. Journal of Fish Biology **46** (2): 202-220.
- Emerson B., Hewitt G. (2005): Phylogeography. Current Biology **15** (10): 367-371.
- Freyhof, J. (2011): *Salmo trutta*. The IUCN Red List of Threatened Species. e.T19861A9050312.
- Georgiev S. (2011): Study of *Salmo* genus (Pisces, Salmonidae) on the Balkan Peninsula. Ribarstvo **69** (1): 11-20.

- Giuffra, E., Guyomard, R., Forneris, G. (1996): Phylogenetic relationships and introgression patterns between incipient parapatric species of Italian Brown trout (*Salmo trutta* L.complex). *Molecular Ecology* **5** (2): 207-220.
- Hadžiselimović R., Maslić E. (1999): *Osnovi etologije – Biologija ponašanja životinja i ljudi*. Sarajevo Publishing, Sarajevo.
- 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.
- Hewitt, G. M. (2001): Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**, 537-549.
- Hutchings, J. (2000): Collapse and Recovery of Marine Fishes. *Nature* **406**: 882-885.
- Jug T., Berrebi P., Snoj A. (2005): Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout populations as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation* **123**: 381-388.
- Keat-Chuan N. C., Aun-Chuan O. P., Wong W. L., Khoo G. (2017): A review of fish taxonomy conventions and species identification techniques. *Journal of Survey in Fisheries Sciences* **4** (1): 54-93.
- Klemetsen A., Amundsen P. A., Dempson J. B., Jonsson B., Jonsson N., O'Connell M. F., Mortensen E. (2003): Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* **12**: 1-59.
- Kottelat M., Freyhof J. (2007): *Handbook of European freshwater fishes*. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin.
- Laikre L., Schwartz M. K., Waples R. S., Ryman N. (2010): Compromising genetic diversity in the wild: unmonitored large-scale release of plants and animals. *Trends Ecol. Evol.* **25** (9): 520-529.
- Leaniz C. G., Verspoor E. (1989): Natural hybridization between Atlantic salmon, *Salmo salar*, and brown trout, *Salmo trutta*, in northern Spain. *Journal of Fish Biology* **34**: 41-46.
- Lipscomb D. (1998): *Basics of Cladistic Analysis*. George Washington University, Washington D.C.

- Mcginnity P., Prodöhl P., Ferguson A., Hynes R., Maoiléidigh N., Baker N., Cotter D., O'Hea B., Cooke D., Rogan G., Taggart J., Cross T. (2003): Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. *Proceedings. Biological sciences* **270**: 2443-2450.
- Meissner K., Muotka T. (2006): The role of trout in stream food webs: integrating evidence from field surveys and experiments. *Journal of Animal Ecology* **75**: 421-433.
- Meraner A., Gratton P., Baraldi F., Gandolfi A. (2013): Nothing but a trace left? Autochthony and conservation status of Northern Adriatic *Salmo trutta* inferred from PCR multiplexing, mtDNA control region sequencing and microsatellite analysis. *Hydrobiologia* **702**: 201-213.
- Nakhleh L., Guohua J., Fengmei Z., Mellor-Crummey J. (2005): Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony. *IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB'05)*.
- Nelson, J.S. (2006): *Fishes of the World*. 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- Njegač D., Pejnović D. (2012): *Veliki atlas Hrvatske*. Mozaik knjiga, Zagreb.
- Odak T. (2004): Molekularno-biološka obilježja endemske mekousne pastrve (*Salmothymus obtusirosis salonitana*). Magistarski rad. Zagreb.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014): Molecular markers in phylogenetic studies – A review. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology* **2**: 131.
- Phillips, R. P., Oakley, T. H. (1997): Phylogenic relationship among the Salmonidae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular systematics of fishes*, San Diego, Academic Press: 145 –162.
- Posada D., Crandall K.A. (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* **16** (1): 37-45.
- Rainboth W. J. (1996): *Fishes of the Cambodian Mekong*. FAO species identification field guide for fishery purposes. FAO, Rome, pp 265.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74** (12): 5463-5467.

- Saunders, R. L., Schom, C. B. (1985): Importance of the variation in the life history parameters of atlantic salmon (*Salmo salar*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **42**: 625-618.
- Schenekar T., Lerceteau-Köhler E., Weiss S. (2014): Fine-scale phylogeographic contact zone in Austrian brown trout *Salmo trutta* reveals multiple waves of post-glacial colonization and a pre-dominance of natural versus anthropogenic admixture. Conservation Genetics **15**: 561-572.
- Snoj, A., Marceta, B., Sušnik, S., Melkic, E., Meglic, V., Dovc, P. (2002): The taxonomic status of the sea trout from the north Adriatic Sea, as revealed by mitochondrial and nuclear DNA analysis. Journal of Biogeography **29**: 1179-1185.
- Splendiani A., Fioravanti T., Giovannotti M., Olivieri L., Ruggeri P., Nisi Cerioni P., Vanni S., Enrichetti F., Caputo Barucchi V. (2016): Museum samples could help to reconstruct the original distribution of *Salmo trutta* complex in Italy. Journal of Fish Biology **90**: 2443-2451.
- Stepien C. A., Kocher T. D. (1997): Molecular and morphology in studies of fish evolution. Molecular systematics of fishes. Academic Press: 1-11.
- Strauss R. E., Bond C. E. (1990): Taxonomic methods: Morphology. Methods for Fish Biology 109-140.
- Suárez J., Bautista J. M., Almodóvar A., Machordom A. (2001): Evolution of the mitochondrial control region in Palaearctic brown trout (*Salmo trutta*) populations: the biogeographical role of the Iberian Peninsula. Heredity **87**: 198-206.
- Sugeha Y. H., Suharti R. S. (2009): Discrimination and distribution of two tropical short-finned eels (*Anguilla bicolor bicolor* and *Anguilla bicolor pacifica*) in the Indonesian waters. Publications of the Seto Marine Biological Laboratory. Special Publication Series **9**: 1-14.
- Swofford D. L. (2002): PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4 [Computer software and manual]. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

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.

Vuković T., Ivanović B. (1971): Slatkovodne ribe Jugoslavije. Posebno izdanje. Zemaljski muzej BiH, Sarajevo.

Waugh J. (2007): DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays* **29** (2): 188-197.

Wheeler, A. (1992): Freshwater fishes of Britain and Europe. Rainbow Books, London.

Wilson C. C., Bernatchez L. (1998): The ghost of hybrids past: fixation of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial DNA in an introgressed population of lake trout (*S. namaycush*). *Molecular Ecology* **7**: 127-132.

www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=52715

www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=65199

www.fineartamerica.com/featured/brown-trout-autochthonous-indigenous-salmo-trutta-morpha-fario-salmo-trutta-fario-urft-valley-art.html

www.haop.hr

www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/planovi-upravljanja-i-mjere-ocuvanja-6

www.jelenje.hr

www.maps.iucnredlist.org/map.html?id=19861

www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

www.visitsinj.com/hr/Vodic/47/rijeka-cetina

www.saborsko.hr/rijeka-jesenica

7. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Lucija Ivić

Datum rođenja 5. listopada 1992.

Nacionalnost: Hrvatica

Mjesto rođenja: Šibenik

Mjesto prebivališta: Obala dr. Franje Tuđmana 9, 22000 Šibenik

Mjesto boravišta: Ribnjak 22, 10000 Zagreb

Obrazovanje

2016. – DIPLOMSKI STUDIJ – Diplomski studij ekologije i zaštite prirode; modul Kopno, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

2014.- 2017. DIPLOMSKI STUDIJ – Diplomski studij eksperimentalne biologije; modul Fiziologija i imunobiologija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb. Naziv teze: „Odabir hrane kod dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) u zatočeništvu“.

2011.-2014. PREDDIPLOMSKI STUDIJ – Preddiplomski studij biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb. Naziv teze: „Upotreba božanske kadulje (*Salvia divinorum*) i njeno fiziološko – biokemijsko djelovanje“.

2007.-2011. SREDNJA ŠKOLA – Opća gimnazija Antuna Vrančića, Put gimnazije 64, 22000 Šibenik

1999.-2007. OSNOVNA ŠKOLA – Osnovna škola Fausta Vrančića, Trg Ivana Gorana Kovačića 2, 22000 Šibenik

Radno iskustvo

2017.- rad preko Student Servisa na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Biološki odsjek (rad u laboratoriju), Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

2016. – demonstratura na Zavodu za animalnu fiziologiju, kolegij Ponašanje životinja

2015.-2016. – rad preko Student Servisa u Iskon d.d. (agent u teleprodaji dolaznih poziva),
Garićgradska 18, 10000 Zagreb

Profesionalna aktivnost i stručno vodstvo

2018. – sudjelovala na projektu Rasprostranjenost, veličina i vijabilnost populacija peša, potočne mreže i potočne pastrve na području Parka prirode Žumberak – Samoborsko gorje

2016. – voditeljica istraživačko-edukacijskog projekta „Mura-Drava 2016“

2015.-2017. – studentski predstavnik u Vijeću Biološkog odsjeka

2015. sudjelovala na studentskom projektu Primatijada

2015. – član Nadzornog odbora Udruge studenata biologije – BIUS

2015. – član Organizacijskog odbora 1. Simpozija studenata bioloških usmjerenja (SiSB 2015.)

2014.-2015. – stručna laboratorijska praksa na ponašanju životinja na Zavodu za animalnu fiziologiju

2014.-2015. – voditelj kolektiva Vertebrata unutar BIUS-a

2014.-2015. – član Upravnog odbora Udruge BIUS

2014. – član organizacijskog odbora Istraživačko-edukacijskog projekta „Grabovača 2014.“

2014. – sudjelovala kao edukator na znanstveno-popularnoj manifestaciji „Znanstveni piknik“

2013./2014. – stručna laboratorijska praksa u laboratoriju za evoluciju na Zavodu za zoologiju

2013. – sudjelovala na Istraživačko-edukacijskom projektu „Apsyrtides 2013“

2012.-2014. – sudjelovala kao edukator na znanstveno-popularnoj manifestaciji „Noć biologije“

2012.-2014 - voditelj Sekcije za sisavce unutar Udruge BIUS

2012. – sudjelovala na Istraživačkom projektu „Dinara 2012“

Stručna djelatnost

Buj I., Čaleta M., Marčić Z., Duplić A., Zanella D., Mustafić P., Ivić L., Raguž L. (2018): Rasprostranjenost, veličina populacija i vijabilnost populacija peša, potočne pastrve i potočne mreže na području Parka prirode 'Žumberak – Samoborsko gorje', završno izvješće.

Priznanja

2011./2012. i 2014./2015 - 2 posebne Rektorove nagrade na području prirodnih znanosti

2009. - nagrada "Antun" – priznanje za najuspješnijeg učenika 2.razreda gimnazije

Volonterski rad

2009/2010. – humanitarni rad u Centru za odgoj i obrazovanje „Šubićevac“

Članstva u znanstvenim udrugama

Udruga BIOM

Hrvatsko botaničko društvo (HbD)

Vještine

- rad na računalu (Windows, Office, Mendeley, Statistica, QGIS, PC-ORD, Salomon Coder)

- JEZICI – engleski (aktivno), talijanski (pasivno), njemački (pasivno)

- vozačka dozvola za B kategoriju vozila