

Molekularna ekologija velikog vijuna (*Cobitis elongata*, Heckel & Kner, 1858)

Nemec, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:053268>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-09**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Petra Nemeč

**MOLEKULARNA EKOLOGIJA VELIKOG VIJUNA (*Cobitis
elongata* Heckel & Kner, 1858)**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u 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.

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Buj na stručnom vodstvu i prenesenom znanju, usmjeravanju i pomoći, strpljenju te vremenu koje mi je poklonila tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala što ste vjerovali da ja to mogu!

Hvala mojoj obitelji bez koje ovo sve ne bi bilo moguće. Hvala vam svima na velikoj potpori i brizi što ste me bodrili i bili uz mene tijekom mojih uspona, ali i padova.

Najveća hvala mami i tati na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, a najviše na svim odricanjima i nesebičnom trudu koji su uložili u moje obrazovanje.

Zahvaljujem svim svojim prijateljima i kolegama s kojima sam provela najbolje studentske dane. Hvala vam na svakom zajedničkom trenutku, zabavnim druženjima, razgovorima te učenju do dugo u noć.

Hvala što ste mi život u drugom gradu učinili ljepšim.

Hvala mojem Mateju na korisnim savjetima, pomoći i velikoj ljubavi! Znam da sam ponekad bila teška, ali hvala ti što si ostao hladne glave i imao razumijevanja u takvim trenucima. Hvala ti na neizmjerne podršci i inspiraciji, bez tvojih riječi poticaja vjerojatno ne bih toliko ustrajala u izradi i završavanju ovog rada.

Od srca vam hvala!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularna ekologija velikog vijuna (*Cobitis elongata* Heckel & Kner, 1858)

Petra Nemec

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Veliki vijun (*Cobitis elongata* Heckel & Kner, 1858) je slatkovodna riba iz porodice Cobitidae koja je endem dunavskog slijeva te je zaštita njezinih populacija nužna. Filogenetski odnosi, eventualna povezanost populacija migracijama, kao i evolucija ove vrste nisu dovoljno istraženi, a podataka koji bi obuhvaćali cijeli areal rasprostranjenosti nema. Cilj ovog istraživanja bio je: ustanoviti filogenetske i filogeografske odnose populacija velikog vijuna radi utvrđivanja intraspecijske strukturiranosti, utvrditi gensku raznolikost pojedinih populacija i čitave vrste, procijeniti efektivnu veličinu pojedinih populacija te cjelokupne vrste, rasvijetliti evolucijsku povijest te odrediti približno razdoblje nastanka velikog vijuna kao i vremena divergencije pojedinih populacija. Da bi se utvrdila intraspecijska struktura velikog vijuna, provedena je filogenetska rekonstrukcija na temelju sekvenci mitohondrijskog gena za citokrom b pomoću metoda najveće parsimonije, Bayesove metode te metode susjednog sparivanja. Pomoću računalnog programa DnaSP određene su mjere genskog polimorfizma, a pomoću programa MIGRATE stope migracija između populacija. Vremena divergencije određena su korištenjem programa Beast. Rezultati dobiveni provođenjem navedenih metoda pokazali su da je vrsta duboko strukturirana te da postoje četiri grupe haplotipova. Utvrđena je niska intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost te genska izoliranost populacija i mali protok gena. Male efektivne veličine populacija te slaba povezanost populacija odraz su ekologije ove vrste.

(49 stranica, 8 slika, 5 tablica, 61 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: veliki vijun, filogenija, citokrom b, genska raznolikost, protok gena

Voditeljica: dr.sc. Ivana Buj, doc.

Ocjenitelji: dr.sc. Ivana Buj, doc.

dr.sc. Ivan Radosavljević, doc.

dr.sc. Ana Galov, izv.prof.

Rad prihvaćen: 13. 2. 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Molecular ecology of the balkan loach (*Cobitis elongata* Heckel & Kner, 1858)

Petra Nemec

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Balkan loach (*Cobitis elongata* Heckel & Kner, 1858) is freshwater fish from the Cobitidae family which is endemic of Danube watershed and protection of their populations is necessary. Phylogenetic relationship, the possible connection between population through migrations, as well as the evolution of this species are not sufficiently researched and there is not enough data about whole areal of prevalence. The aim of this study was to: establish the phylogenetic and phylogeographic relations of the balkan loach to identify intraspecific structure, to determine genetic diversity of certain populations and the whole species, estimate the effective size of the individual populations and the whole species, clarify the evolution history and determine the approximate period of occurrence of this species as well as the divergence of individual populations. In order to determine intraspecific structure of balkan loach, a phylogenetic reconstruction was conducted based on the mitochondrial gene sequence for cytochrome b using the several methods: maximum parsimony, Bayesian method and median joining. Using the DnaSP computer program, the measures of the genetic polymorphism are determined and with MIGRATE migration rate among the population. Divergence times are determined using Beast software. The results obtained by these methods have shown that the species is deeply structured and that there are four groups of haplotypes. Also, low intraspecific and intrapopulation diversity was determined along with genetic isolation of population and low flow of genes. Small effective population sizes and poor population connectivity are the reflection of ecology of this species.

(49 pages, 8 figures, 5 tables, 61 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: balkan loach, phylogeny, cytochrome b, genetic diversity, gene flow

Supervisor: Dr. Ivana Buj, Asst. Prof

Reviewers: Dr. Ivana Buj, Asst. Prof.

Dr. Ivan Radosavljević, Asst. Prof.

Dr.sc. Ana Galov, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 13. 2. 2019.

Sadržaj

1. UVOD	7
2. LITERATURNI PREGLED	8
2.1. Osnovne značajke roda <i>Cobitis</i>	8
2.2. Opis velikog vijuna (<i>Cobitis elongata</i> Heckel & Kner, 1858).....	11
2.2.1. Taksonomija velikog vijuna.....	11
2.2.2. Opis i ekologija vrste	11
2.2.3. Rasprostranjenost i stanište velikog vijuna	13
2.2.4. Ugroženost i zaštita	14
2.3. Molekularna ekologija i uvod u metode.....	16
2.4. Ciljevi istraživanja	20
3. MATERIJAL I METODE.....	21
3.2. Materijal	21
3.2.1. Životinjski uzorci	21
3.2.2. Područje istraživanja	21
3.3. Metode	29
3.3.1. Računalne analize nukleotidnih sljedova	29
3.3.2. Analiza genskog polimorfizma (raznolikosti).....	30
3.3.3. Analiza intraspecijske strukture	30
3.3.4. Evolucijska analiza	31
4. REZULTATI.....	32
4.1. Genski polimorfizam.....	34
4.2. Rezultati filogenetske rekonstrukcije	35
4.2.1. Filogenetska rekonstrukcija metodama najveće parsimonije (MP) i Bayesovom metodom (BAY)	35
4.2.2. Filogenetska mreža konstruirana metodom susjednog sparivanja (MJ).....	38
4.3. Efektivna veličina populacije	40
4.4. Intraspecijska struktura	41
4.5. Vrijeme divergencije velikog vijuna.....	42
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČAK.....	48
7. POPIS LITERATURE.....	49

1. UVOD

Veliki vijun (*Cobitis elongata* Heckel & Kner, 1858) riba je koja je svojim životnim ciklusom vezana uz slatkovodne ekosustave dunavskog slijeva te je endem rijeke Save i njenih pritoka te donjih pritoka Dunava. Taksonomski je pripadnik roda *Cobitis* te porodice Cobitidae, velike porodice koja broji oko 130 vrsta (Kottelat i Freyhof, 2007).

Njegova rasprostranjenost obuhvaća rijeke Savu, Kupu (Slovenija i Hrvatska), Moravu (Srbija), Neru (Rumunjska) te Vit i Jantru (Bugarska) (Kottelat i Freyhof, 2007). Poput većine drugih pripadnika roda *Cobitis* i veliki vijun zauzima sličnu ekološku nišu koja je vrlo jedinstvena i koje druge ribe ne mogu zauzimati. Veliki vijun obitava isključivo na muljevitim do šljunkovitim dnima, koja su prekrivena vegetacijom te gdje je voda čista, ali ipak sadrži organske čestice i sporo teče te se smatra da je njihova vezanost uz takvo dno uzrokovana specijaliziranim načinom hranjenja (Robotham, 1982; Culling i sur., 2003; Buj, 2010).

Dunavski bazen se često navodi kao područje refugija slatkovodnih riba (Banarescu, 1990; Bohlen i Rab, 2001; Ludwig i sur., 2001; Perdices i sur., 2003) tijekom perioda glacijacija, a moguće da je takvu ulogu imao i za neke vrste vijuna. Budući da je veliki vijun malena riba, gospodarski nevažna te veći dio dana zakopana u sedimentu, često prođe neprimijećena u istraživanjima slatkih voda.

To su glavni razlozi zašto molekularna ekologija velikih vijuna s čitavog areala dunavskog slijeva do sada nije detaljnije istraživana. Stoga sam nekolicinom metoda molekularne filogenije istraživala filogenetsku povezanost na temelju mitohondrijskog gena za citokrom b (*cyt b*) populacija velikog vijuna u čitavom području rasprostranjenosti ove vrste. U istraživanje sam uključila i metode populacijske genetike koje otkrivaju postoji li protok gena između populacija različitih lokaliteta. Analiza evolucijske prošlosti otkriva mogući period geološke prošlosti koji je pokrenuo divergenciju populacija i/ili filogenetskih linija.

S ciljem očuvanja populacija ove endemske vrste posebnu pozornost potrebno je pridati zaštitni staništa na kojima živi te ograničiti i zabraniti prekomjernu eksploataciju pijeska i šljunka. Naime, u većini europskih zemalja rijekama se poprilično loše gospodari, a pogotovo ako prolaze kroz velike gradove. Tokovi rijeka se često i stalno rekonstruiraju, iskopava se pijesak i šljunak, grade se umjetna korita, vodotoci su iznimno onečišćeni, a sve to ima poguban utjecaj na staništa ovih životinja. Nadalje, zaštita ove vrste može biti djelotvorna samo ako se prepoznaju populacije koje su osobito važne za opstanak čitave vrste (npr. populacije koje su izvori imigranata za ostale populacije, sadrže osobito veliku gensku raznolikost) te ako se dobro opiše genska struktura vrste, što je i osnovni cilj ovoga rada.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Osnovne značajke roda *Cobitis*

Cobitis Linneaus, 1758 - vijuni, rod su riba iz porodice Cobitidae koja spada u red šaranki (Cypriniformes). Vrstama su najbrojniji i najraznolikiji rod porodice Cobitidae, s oko 60 opisanih vrsta (Kottelat & Freyhof, 2007; Buj i sur., 2014; Delić i sur., 2014). Ime im potječe od grčke riječi *kobitis* što znači mala riba (Ćaleta i sur., 2015).

Vijuni su male slatkovodne bentonske ribe, uskog izduženog tijela i ventralno spljoštenog profila. Za njih je karakteristično da imaju viličastu podočnu bodlju (koja je katkad skrivena pod kožom), tri para kratkih brčića (četiri na vrhu njuške ili rila i dva na rubovima usana), ždrijelne zube, minijaturne ljuske ispod kože, prilično nejasnu bočnu liniju, malu leđnu i podrepnu peraju te malu, kratku i okruglu repnu peraju (Ivelić i sur., 2007).

Na prvi pogled izgledaju vrlo slično, no detaljnijim promatranjem pružaju nekoliko razlikovnih karakteristika (Nalbant i sur., 2001). Najvažnije uključuju organizaciju Gambetta zona, tj. obrasca pigmentacije duž bokova tijela, strukturu i organizaciju usne regije, prisutnost/nedostatak te broj i oblik Canestrinijevih ljusaka (*lamina circularis*) u mužjaka, veličinu i oblik podočne bodlje (*spinum suborbitale*) (Nalbant i sur., 2001), broj i oblik mrlja na početku repne peraje, odnos visine i duljine repnog drška, kao i visine tijela i standardne duljine (Kottelat i Freyhof, 2007; Buj, 2010) te izgled ljusaka kod vrsta kod kojih su one prisutne (Vasil'eva, 2000; Buj, 2010).

Prisutnost, duplikacija ili nedostatak Canestrinijeve ljuske, odnosno izdanka na dorzalnoj površini anteriornih šipčica prsnih peraja kod mužjaka, glavne su karakteristike koje definiraju podrodove roda *Cobitis*. Prema tim karakteristikama neki autori ovaj rod dijele na četiri podroda: *Cobitis sensu stricto*, *Iberocobitis*, *Bicanestrinia* i *Acanestrinia* (Băsescu, 1961; Perdices i Doadrio, 2001). *Cobitis sensu stricto* i *Iberocobitis* imaju jednu Canestrinijevu ljusku na drugoj šipčici prsne peraje, dok je po jedna Canestrinijeva ljuska prisutna na prvoj i drugoj šipčici kod podroda *Bicanestrinia*. Vrste podroda *Acanestrinia* nemaju Canestrinijevu ljusku (Ludwig i sur., 2001).

Općenito govoreći, europske vrste uključene u podrod *Cobitis sensu stricto* naseljavaju rijeke središnje Europe, dok vrste podroda *Bicanestrinia* i *Iberocobitis* nastanjuju ograničenije područje i rasprostranjene su na Apeninskom i Pirenejskom poluotoku. S druge strane, vrste uključene u podrod *Acanestrinia* imaju neobičnu geografsku rasprostranjenost na udaljenim područjima poput istočne Azije (Banarescu, 1990; Perdices i Doadrio, 2001).

Nadalje, vijuni imaju specifičan plan građe tijela i nastanjuju jedinstvenu ekološku nišu.

Nikakva značajnija radijacija ekoloških prilagodbi nije moguća, a vrlo je zanimljivo i da ni jedna druga vrsta nije uspjela zauzeti tu nišu. Naime, u najvećem broju slučajeva u jednom vodotoku dolazi samo jedna vrsta vijuna (Nalbant i sur., 2001; Buj, 2010). Rijetki su slučajevi kada u istoj rijeci ili jezeru obitavaju dvije vrste, tada im se staništa obično ne preklapaju te zauzimaju različite dijelove vodotoka (Buj, 2010). Iz toga se može zaključiti kako je njihovu nišu vrlo teško zauzeti te kako je ona vrlo specijalizirana (možda samo prema jednom ili dva čimbenika). Takva ekološka ograničenja upućuju na veliku intraspecijsku i interspecijsku kompeticiju (Nalbant i sur., 2001; Buj, 2010).

O ranoj evoluciji vijuna se malo toga zna, ali se pretpostavlja da raznolike skupine roda *Cobitis* koje žive u Europi predstavljaju postepenu evoluciju linija nastalih na području istočne Azije. Prevaljujući veliku sibirsku ploču u zadnjih 10 milijuna godina različite linije su evoluirale ili nestale na putu do Europe, a rezultat toga je današnja fauna ovog roda (Nalbant i sur., 2001).

Najranije poznato nalazište fosila roda *Cobitis* je iz miocena s datiranom starošću od otprilike 15 milijuna godina (Frickhinger, 1991; Ludwig i sur., 2001).

Rod *Cobitis* ubraja se među najšire rasprostranjene rodove slatkovodnih riba umjerene zone Europe i Azije. Rasprostranjenost obuhvaća Euroaziju od Engleske i Pirenejskog poluotoka pa sve do Japanskog arhipelaga, Korejskog poluotoka i amurskog riječnog bazena na Dalekom istoku (Nalbant i sur., 2001). S obzirom na takvu široku rasprostranjenost i veliki broj vrsta vijuna evolucijski gledano radi se o vrlo uspješnoj skupini (Nalbant i sur., 2001; Buj, 2010). Što se tiče područja Europe, Bohlen i Rab (2001) otkrili su da je bogatstvo vrstama ovog roda, kao i drugih rodova slatkovodnih riba poput roda *Barbus* (Bianco, 1998) znatno veća u južnoj, nego u središnjoj i sjevernoj Europi. Na području središnje i sjeverne Europe vrste su većinom široko rasprostranjene te nema stenoendema, dok je u južnoj Europi rasprostranjenost vrsta znatno ograničenija te su mnoge među njima endemi (Buj, 2010). Pretpostavlja se da su uzrok tome višestruke glacijacije tijekom pleistocena (Hewitt, 1999; Bohlen i Rab, 2001).

Specifična povezanost s mikrostaništem, odnosno bentonski način života čini vrste roda *Cobitis* izuzetno osjetljivima pa su stoga ugrožene u većini zemalja (Nalbant i sur., 2001). Prvenstveno su uzroci tome onečišćenje i regulacija vodotoka iskapanjem sedimenta što uzrokuje uništavanje staništa, gradnja hidroelektrana te unos alohtonih vrsta. Iz tih je razloga

mного vrsta u Europi zaštićeno. Nekolicina vrsta ove porodice nalazi se na popisu Direktive o očuvanju prirodnih staništa i očuvanju divlje flore i faune (Mrakovčić i sur., 2008).

U Dodatku II Direktive o očuvanju prirodnih staništa i očuvanju divlje flore i faune te u Dodatku III Bernske Konvencije nalaze se vrste *C. elongata* Heckel & Kner, 1858, *C. taenia* Linnaeus, 1758, *C. illyrica* Freyhof & Stelbrink, 2007, *C. jadonaensis* Mustafić & Mrakovčić, 2008, *C. dalmatina* Karaman, 1928, *C. bilineata* Canestrini, 1865, *C. narentana* Karaman, 1928 i *C. elongatoides* Băcescu & Maier, 1969. Osim toga, neki od vijuna nalaze se u Crvenoj knjizi slatkovodnih riba Hrvatske: *C. dalmatina* (VU, eng. *vulnerable*), *C. narentana* (VU), *C. elongata* (VU) (Mrakovčić i sur., 2006).

2.2. Opis velikog vijuna (*Cobitis elongata* Heckel & Kner, 1858)

2.2.1. Taksonomija velikog vijuna

Predmet je ovog diplomskog rada slatkovodna riba veliki vijun. Sistematska mu je pripadnost sljedeća:

CARSTVO: Animalia

KOLJENO: Chordata

RAZRED: Actinopterygii (zrakoperke)

NADRED: Teleostei (prave koštunjače)

RED: Cypriniformes (šaranke)

PORODICA: Cobitidae (vijuni)

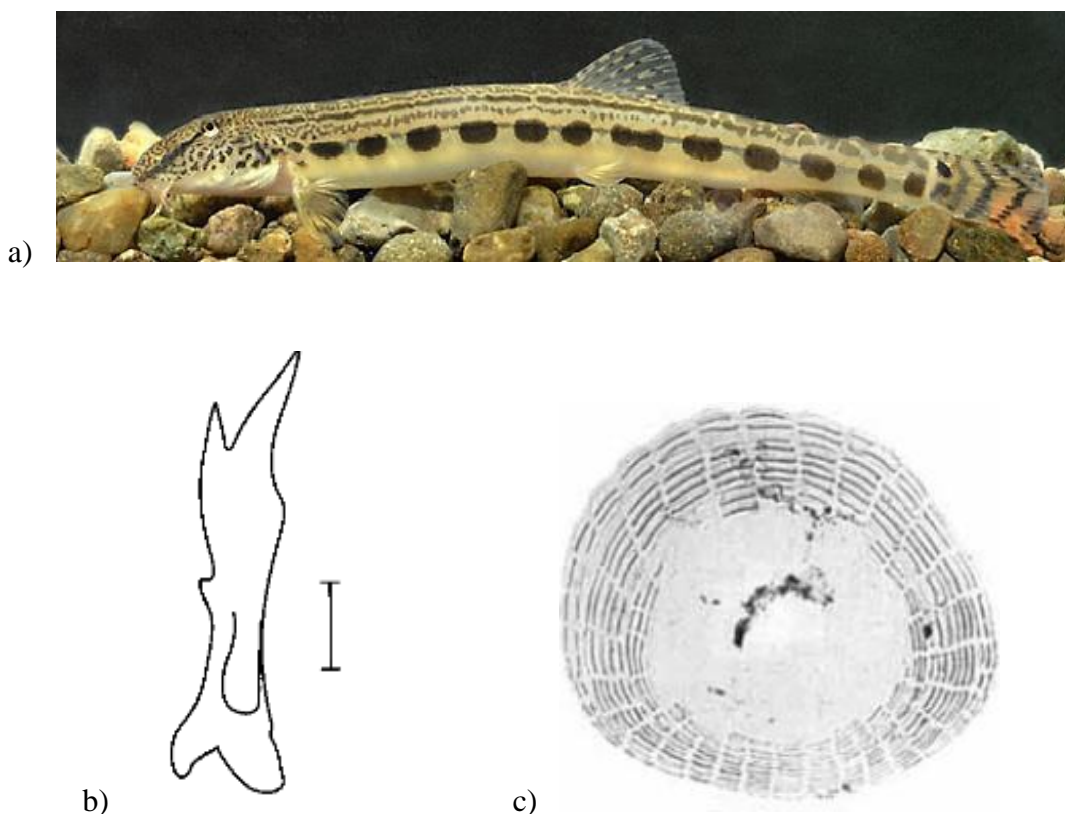
ROD: *Cobitis* Linneaus, 1758

VRSTA: *Cobitis elongata* Heckel & Kner, 1858 - veliki vijun

2.2.2. Opis i ekologija vrste

Veliki vijun (*Cobitis elongata*) ima dugo valjkasto tijelo kojim se ukopava u pijesak te izduženu bočno spljoštenu glavu (slika 1a). Usta su malena, smještena s donje strane glave i okružena s tri para brčića. Podočna bodlja (slika 1b) malena je, prikrivena naborima kože na obrazu, a u nepovoljnim uvjetima i u slučaju opasnosti je izbacuje van (Mrakovčić i sur., 2006).

Za razliku od većine vrsta roda *Cobitis* u dunavskom slijevu, veliki vijun nema Canestrinijevu ljusku te spada u podrod *Acanestrinia* (Perdices i Doadrio, 2001). Tijelo mu pokrivaju sitne ljuske (slika 1c). Žutobijele je boje s uzdužnim nizovima tamnosmeđih pjega koji se protežu od kraja glave do početka repne peraje. Takvom se obojenošću izvrsno podudara s podlogom na kojoj živi pa ga je stoga teško uočiti. Na leđima ima 12 - 19 mrlja, a na bokovima 10 - 13. Od oka do kraja gornje usne proteže se tamna pruga koja se iza oka razdijeli. Bočna pruga ima nekoliko ljusaka, a pruža se od škržnog poklopca prema kraju tijela (Mrakovčić i sur., 2006). Peraje su malene i pravilno raspoređene na tijelu te su prsne peraje mužjaka znatno dulje nego kod ženki. Ženke su obično nešto veće i narastu do 16 cm, dok su mužjaci manji i mogu narasti do 13 cm (Treer i sur., 2008).



Slika 1: a) *Cobitis elongata* (izvor: www.fishbase.de, fotografirao: Kohout J.), b) crtež podočne bodlje velikog vijuna (preuzeto iz Ludwig i sur., 2001) i c) ljuska s tijela velikog vijuna (preuzeto iz Ludwig i sur., 2001).

Izrazito su noćne životinje, noću se intenzivnije hrane i plivaju, dok se preko dana skrivaju zakopane u sediment. U prehrani ove vrste dominiraju sitni beskralješnjaci, a nađen je i pijesak jer su staništem i načinom hranjenja – prosijavanjem supstrata, vezani za pjeskovit sediment. Hranu unose pomoću aparata za filtriranje sa zonama ljepljive sluzi u ždrijelnoj šupljini (Ćaleta i sur., 2015). Hrane se sitnim beskralješnjacima u vodi prisutnim kao makrozoobentos, poput taksona: Nematoda, Gastropoda, Bivalvia i Crustacea, Chironomidae, Oligochaeta, Odonata i Heteroptera (Mičetić i sur., 2008). Također, Mičetić i suradnici su 2008. godine otkrili da se prehrana velikog vijuna u rijeci Petrinjčici razlikuje tijekom ljeta od prehrane tijekom proljeća i jeseni kada se hrane samo redom Diptera. Nadalje, u želucu su rakovi reda Isopoda nađeni pojedinačno, dok u sastavu makrozoobentosa s istog lokalitet nisu nađeni, što može značiti da su se jedinke hranile negdje drugdje.

Veliki vijun spolno dozrijeva u drugoj godini života. Tijekom udvaranja, mužjak prati ženku te stvara prsten oko ženkinu tijela iza leđne peraje dok ona otpušta jaja (Kottelat & Freyhof, 2007). Oviparna je vrsta te se mrijesti od travnja do lipnja pri dnu čistih, tekućih voda, najčešće u gustom vegetaciji, o čemu ujedno ovisi preživljavanje jaja i mladih (Mrakovčić i sur., 2006). U najranijim fazama razvoja ličinke su slabo pokretne, nemaju nikakve strukture za obranu od predatora ili bijeg stoga se zadržavaju u gustom vegetaciji koja im pruža zaštitu. Kada se razviju napredniji stadiji, izlaze iz vegetacije i postaju pozitivno fototaksični te se počinju hraniti prosijavanjem sedimenta. Životni vijek im je pet do šest godina i ženke najčešće žive duže od mužjaka (Ćaleta i sur., 2015).

2.2.3. Rasprostranjenost i stanište velikog vijuna

Istraživana vrsta naseljava rijeke dunavskog slijeva: Savu i Kupu u Hrvatskoj i Sloveniji, Moravu i njezine pritoke u Srbiji, Vit i Jantru u Bugarskoj te sustav rijeke Nere u Rumunjskoj (Kottelat i Freyhof, 2007) (slika 3). Endem je dunavskog slijeva (Mrakovčić i sur., 2008). Dolazi u umjerenim do sporo tekućim tokovima navedenih rijeka uz pjeskovito ili muljevito dno, a ponekad i šljunkovito s potopljenom vegetacijom, obično u zoni lipljena, mreke i deverike (Mrakovčić i sur., 2006). Češći je u gornjim tokovima dunavskog slijeva (Mrakovčić i sur., 2008). Na području dunavskog slijeva u Hrvatskoj *C. elongata* živi u simpatriji s *C. elongatoides*, ali su rijetki slučajevi njihova sintopijskog obitavanja. No, poznato je da se u hrvatskom dijelu rijeke Kupe i u nekim manjim pritocima Save veliki vijun pojavljuje sintopijski (dvije vrste zbog sličnih ekoloških zahtjeva dijele životni prostor) s vrstom *C. elongatoides* (slika 2) te hibridnim biotipom (triploidne ženke nastale hibridizacijom vrsta *C. elongatoides* i *C. tanaitica*) (Buj, 2010).



Slika 2: *Cobitis elongatoides* (izvor: www.fishbase.se, fotografirao: Kohout J.).

Nije poznato da li ulazi u male potoke, velike rijeke ili dionice rijeke bez struje. Vrsta je izumrla na području rijeke Jiu u Rumunjskoj (na slici 3 označeno crvenom bojom), dok su u ostatku navedenih rijeka populacije stabilne (Kottelat & Freyhof, 2007).



Slika 3: Karta rasprostranjenosti velikog vijuna (izvor: www.iucnredlist.org) - crvena boja označava područje na kojem je vrsta izumrla, a narančastom bojom je označeno područje njenog rasprostranjenja.

2.2.4. Ugroženost i zaštita

Veliki vijun na razini Europe trenutno se ne smatra osobito ugroženim, ali bi to mogao postati u skorijoj budućnosti. Prvenstveno bi tome mogli doprinijeti: smanjenje kvalitete staništa, odnosno stalne rekonstrukcije rijeka, iskopavanja šljunka i pijeska te zagađenje. Kako na odgovarajućim staništima dolazi u velikom broju, lokalizirani zahvati mogu biti pogubni za njegove populacije. Osim toga, vrsta ima mali areal, biologija vrste je još uvijek nedovoljno istražena, a ekonomsku korist nema. Ponekad se lovi kako bi poslužio kao mamac za lov na druge ribe (Mrakovčić i sur., 2006). Na Crvenom popisu Međunarodnog saveza za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava (IUCN) od 2008. godine nalazi se kao najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC).

U Hrvatskoj prema metodologiji IUCN-a ova vrsta svrstana je u skupinu osjetljivih (VU) na temelju kriterija A2 i B2b(iii)c(iii), tj. uslijed kontinuiranog smanjenja kvalitete staništa te ekstremnih fluktuacija broja lokacija i subpopulacija (Mrakovčić i sur., 2008). Živi unutar Natura 2000 područja te je ciljna vrsta Natura 2000 područja. Također u Hrvatskoj, uz vrste *C. bilineata*, *C. dalmatina*, *C. illyrica*, *C. jadovaensis*, *C. narentana* i veliki vijun je strogo zaštićena vrsta prema Zakonu o zaštiti prirode (Narodne novine 70/05, 139/08, 57/11 i 80/13). Kao što je već spomenuto, međunarodno je zaštićen Bernskom konvencijom (Dodatak III) (Mrakovčić i sur., 2006) te se nalazi u Dodatku II Direktive o očuvanju prirodnih staništa i očuvanju divlje flore i faune.

2.3. Molekularna ekologija i uvod u metode

Molekularna ekologija istražuje međusobne odnose između ekoloških i evolucijskih procesa (Hoelzel, 2018). Dio je evolucijske biologije s primjenom molekularne populacijske genetike, molekularne filogenije te relativno nove genomike, a uključuje i rješavanje tradicionalnih ekoloških pitanja (poput stanja vrsta, očuvanja i procjene biološke raznolikosti itd.) (bs.wikipedia.org).

Molekularna filogenija proučava evolucijske veze između organizama na razini molekula, tj. DNA, RNA i proteina. Njena je zadaća opisivanje i rekonstrukcija genetičkih veza među vrstama i višim taksonomskim kategorijama, kao i na intraspecijskoj razini. Prema onome što se želi istraživati mogu se koristiti nukleotidne ili proteinske sekvence. Tako se primjerice, za proučavanje blisko srodnih vrsta koriste nukleotidne sekvence jer evoluiraju brže nego proteini, dok se za istraživanje udaljenijih grupa organizama uglavnom koriste proteinske sekvence (Xiong, 2006).

U taksonomskim istraživanjima riba se najčešće koristi mitohondrijska DNA (mtDNA) i ribosomalna nuklearna DNA (rDNA) (Hwang i King, 1999), a u novije vrijeme sve češće i pojedini nuklearni geni. Mitohondrijska DNA kod viših životinja evoluira prilično brzo i prenosi se samo majčinskom linijom čime je efektivna veličina populacija manja te ne dolazi do rekombinacije (Avice, 1998; Emerson i Hewitt, 2005; Abramović-Ristov i sur., 2007). Nadalje, mtDNA je prikladnija za istraživanja jer je u genomu stanice prisutna u velikom broju kopija (do nekoliko tisuća) pa ju je moguće umnožiti i iz vrlo ograničene količine uzoraka ili uzoraka lošijeg integriteta (starih ili loše pohranjenih uzoraka) (Abramović-Ristov i sur., 2007).

Kao molekularni biljezi mitohondrijske DNA u istraživanjima se najčešće koriste citokrom oksidaza I, citokrom oksidaza II, mitohondrijski 12S te gen za citokrom *b* (Patwardhan i sur. 2014).

Obično se u filogenetskim istraživanjima izrađuje filogenetsko stablo od haplotipskih sekvenci korištenjem neke od metoda filogenetske rekonstrukcije. Postoje tri diskretne metode filogenetske rekonstrukcije: metoda najveće parsimonije (MP), metoda najveće vjerodostojnosti (ML) te Bayesova metoda (BAY). One rade izravno sa sekvencama, a njima se dobivaju filogenetska stabla ili filogrami.

Metoda najveće parsimonije (eng. *maximum parsimony*, MP) odabire stablo ili stabla s najmanjim brojem evolucijskih promjena potrebnih da se objasne sve uočene razlike među sravnjenim sekvencama. Ova metoda se najčešće upotrebljava kada su sekvence međusobno

vrlo slične ili se uspoređuje mali broj sekvenci (potrebno je dosta vremena za obradu podataka). Za opisivanje MP stabla koristi se indeks konzistencije (CI), indeks homoplazije (HI), indeks retencije (RI) te indeks reskalirane konzistencije (RC).

Indeks konzistencije je mjera koja pokazuje kako se pojedina značajka dobro uklapa u filogenetsko stablo, a dobiva se tako da se najmanji mogući broj koraka (promjena za neki skup podataka) podijeli s uočenim brojem. Teoretski, ako je značajka u potpunosti kompatibilna sa stablom te je uočeni broj koraka najmanji mogući tada CI iznosi 1. U slučajevima nepotpune kompatibilnosti manji je od 1, što pokazuje homoplaziju (analogno svojstvo), odnosno svojstvo ne potječe od zajedničkog pretka već je rezultat konvergentne evolucije, paralelnih ili reverznih mutacija. Stupanj homoplazije može se prikazati i indeksom homoplazije (HI), dok se indeksom retencije (RI) izražava dio sinapomorfije koju očekujemo u nekom skupu podataka koja je zadržana kao sinapomorfija u filogenetskom stablu. Indeks reskalirane konzistencije (RC) povećan je vrijednošću indeksa retencije.

Za opisivanje stabla još se koristi i duljina stabla, a ona predstavlja najmanji mogući broj koraka (promjena) potrebnih da bi se za neki skup podataka izradilo filogenetsko stablo. Stablo manje duljine bolje odgovara nekom skupu podataka nego stablo veće duljine (Lipscomb, 1998).

Metoda najveće vjerodostojnosti (eng. *maximum likelihood*, ML) traži stablo (ili stabla) koja, unutar određenog evolucijskog modela imaju najveću vjerojatnost primjećivanja podataka koji određuju stablo. Ova metoda procjenjuje vjerojatnost da je izabrani evolucijski model doveo do nastanka skupa sekvenci koje se analiziraju. S obzirom na to da su pojedine vjerojatnosti izuzetno mali brojevi, obično se množe njihove logaritamske vrijednosti te se vjerojatnost čitavog stabla izražava kao logaritamna vjerojatnost ($\ln L$).

Bayesova je metoda (BAY) također tradicionalna metoda diskretne filogenetske rekonstrukcije. Temelji se na posteriornim vjerojatnostima, tj. vjerojatnostima koje se određuju na temelju nekog evolucijskog modela. Odnosno, pronalazi najvjerođostojnija stabla s obzirom na evolucijski model i podatke koji se temelje na prijašnjim vjerojatnostima te donosi niz stabala koja su otprilike jednako vjerodostojna. Stablo koje ima najveće vrijednosti posteriornih vjerojatnosti je ono koje je najvjerođatnije i takvo stablo će biti izdvojeno kao najtočnije.

U filogenetskim analizama kao podrška grananja unutar stabla koristi se metoda samopodržavanja ili *bootstrap*. To je statistička metoda za empirijsko određivanje varijabilnosti parametara (Efron i Gong, 1983), a funkcionira tako da kreira izmišljeni skup podataka nasumičnim uzimanjem podataka iz stvarnog skupa sve dok se ne stvori novi skup

iste veličine. Postupak se ponavlja nekoliko stotina ili tisuću puta te se iz svakog izmišljenog skupa računa određeni parametar.

Filogenetska stabla su prikladan način prikazivanja evolucijske povijesti organizama jer ilustriraju odnose između organizama kao i redosljed specijacijskih događaja kojima su iz ranijih predaka nastali njihovi raznolikiji potomci. Svako se stablo sastoji od čvorova i grana. Čvorovi prikazuju taksonomske jedinice (vrste, populacije, organizme, a i zajedničkog pretka). Postoje završni (terminalni) čvorovi koji prikazuju položaj proučavanog organizma, te unutrašnji čvorovi koji označavaju položaj posljednjeg zajedničkog pretka. Grane filogenetskog stabla su poveznice između čvorova i prikazuju filogenetske odnose.

Stabla se obično ukorjenjuju pri čemu korijen prikazuje položaj posljednjeg zajedničkog pretka za sve organizme u stablu, a određuje se na temelju fosilnih podataka, ili češće na temelju podataka o jednom ili više udaljenijih organizama. Metode kojima se stablo ukorjenjuje su upotreba vanjske grupe (eng. *out group*), srednje točke ili molekularnog sata. Najučestalija je metoda upotreba vanjske grupe, taksonomske jedinice koja je blisko srodna s proučavanim taksonima (Boykin i sur., 2010; Kinene i sur., 2016).

Intraspecijsku gensku evoluciju nije uvijek moguće prikazati u obliku razgranatog stabla. Odnosi među genima uzorkovanim unutar vrste nisu hijerarhijski jer su rezultat spolnog razmnožavanja, rekombinacija i manjeg broja relativno nedavnih mutacija (Posada i Crandall, 2001). Populacijske genealogije često se račvaju na više strana, geni potomci opstaju zajedno s predačkim genima, a rekombinacijski događaji dovode do nastanka mrežastih odnosa pa ih je stoga točnije prikazivati filogenetskim mrežama. Za razliku od stabla u mreži su dopuštene poprečne veze između vrsta koje nisu u direktnom srodstvu, a na taj način rekombinacija, hibridizacija i lateralni (horizontalni) prijenos gena nisu isključeni (Posada i Crandall, 2001; Nakhleh i sur., 2005). Filogenetske se mreže sastoje od nekolicine povezanih krugova. Veličina kruga određena je brojnošću haplotipova, dok najmanji crni kružići prikazuju neprimjećene haplotipove. Veličina linija koje povezuju mrežu određena je brojem mutacijskih veza.

Filogeografija je znanstvena disciplina koja analizira geografsku rasprostranjenost genealoških linija (Avice, 1998; Hewitt, 2001; Emerson i Hewitt, 2005). Nadalje, pomoću filogeografije se utvrđuju povijesni demografski procesi odgovorni za prostornu rasprostranjenost genetskih linija (Avice, 2000). Do danas je, uz kombinaciju raznovrsnih tehnika analize DNA, modernih analitičkih metoda te suvremenih paleoklimatskih i geoloških

studija, postala snažan alat za utvrđivanje rasprostranjenosti i evolucije genetske raznolikosti na Zemlji (Emerson i Hewitt, 2005). Zbog svojih dubokih korijena u povijesnoj biogeografiji i populacijskoj genetici filogeografija se smatra mostom koji povezuje istraživanja mikroevolucijskih i makroevolucijskih procesa (Bermingham i Moritz, 1998) te omogućuje promatranje gena u prostoru i vremenu (Hewitt, 2001).

Populacijska genetika je grana evolucijske biologije koja pokušava odrediti razinu i rasprostranjenost genskog polimorfizma u prirodnim populacijama, kao i otkriti evolucijske sile (mutacija, migracija, selekcija i drift) koje određuju obrazac genetske raznolikosti primjećen u prirodnim populacijama. Genska raznolikost je raznolikost alela i genotipova prisutnih u promatranoj skupini, neovisno o tome radi li se o populaciji, vrsti ili skupini vrsta (Frankham i sur., 2002; Sindičić, 2011). Čine je razlike u slijedu nukleotida u molekuli DNA. Struktura populacije je rasprostranjenost genotipova u prostoru i vremenu te je rezultat procesa sadašnjosti i prošlosti (Hewitt i Butlin, 1997; Hewitt, 1999).

Efektivna veličina populacije je jedan od najvažnijih parametara u populacijskoj genetici i konzervacijskoj biologiji. To je veličina idealne populacije u kojoj je broj reproduktivno aktivnih ženki i mužjaka jednak, a parenje se događa slučajno, što znači da svaki mužjak ima jednaku vjerojatnost da se pari sa svakom ženkom (jadran.izor.hr). Procijenjeni broj migranata označava najveću vjerojatnost da određeni broj jedinki u nekoj populaciji migrira iz jedne populacije u drugu.

2.4. Ciljevi istraživanja

- utvrđivanje intraspecijske strukturiranosti vrste *C. elongata*
- određivanje parametara intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti velikog vijuna
- procjena smjera i veličine protoka gena između pojedinih populacija
- procjena efektivne veličine pojedinih populacija velikog vijuna te cjelokupne vrste
- rasvjetljavanje evolucijske povijesti velikog vijuna te određivanje razdoblja nastanka ove vrste, kao i divergencije pojedinih populacija

3. MATERIJAL I METODE

3.2. Materijal

3.2.1. Životinjski uzorci

Od strane više europskih ihtioloških timova uzorkovano je ukupno 198 jedinki vrste *Cobitis elongata* iz 18 rijeka dunavskog slijeva (tablica 1), što obuhvaća čitav areal rasprostranjenosti ove vrste. Po uzorkovanju, gen za citokrom *b* (cyt *b* gen) bio je umnožen i sekvenciran iz svih uzoraka, a sekvence pohranjene u Zoologijskom zavodu PMF-a. Primjenom modernih metoda molekularne genetike na sekvencama sam provela računalne analize filogenije i filogeografije, analize populacijske genetike te analizu evolucijske povijesti ove vrste.

3.2.2. Područje istraživanja

Rijeka Dunav druga je po veličini europska rijeka, dužine 2826 km, slijevnog područja od oko 801093 km² te pokriva približno 10% kontinentalne Europe. Slijev same rijeke se dijeli na 3 velike sekcije (gornji, srednji i donji tok) te deltu (Sommerwerk, 2009). Dio je crnomorskog slijeva, kojim uz rijeku Dunav dominiraju Sava i Drava s više manjih podsljevova (Čaleta i sur., 2015). Dunavski bazen obuhvaća 19 zemalja te tvori prirodnu granicu osam država, dok sama rijeka teče kroz 9 država te kroz nekolicinu glavnih gradova.

Dunavski bazen je „vruća točka“ za europsku slatkovodnu bioraznolikost temeljenu na tradicionalnim zoogeografskim kao i filogeografskim istraživanjima. Pretežno poravnanje porječja s istoka na zapad učinilo ga je koridorom za migracije i rekolonizaciju i tijekom i nakon ledenog doba jer su slatkovodni organizmi migrirali između ponto-kaspijske i srednjoazijske biogeografske regije prema istoku te s Alpa i mediteranskih regija prema zapadu. Glavni tok Dunava nije bio zaleđen te je služio kao refugij (utočište). Povlačenjem ledenog pokrova, slatkovodne vrste proširile su se iz tog utočišta u ostali dio Europe (Sommerwerk, 2009).

Danas u dunavskom slijevu obitava ukupno 103 vrste riba, što je oko 20% europske slatkovodne ihtiofaune (Kottelat i Freyhof, 2007) te je prema raznolikosti ribljih vrsta to područje najbogatije u Europi. U posljednje su vrijeme provedena brojna istraživanja koja su

snažno utjecala na saznanja o taksonomiji i rasprostranjenosti riba u dunavskom slijevu. Uočeno je da istočni dio dunavskog bazena obilježava lagano smanjenje brojnosti ihtiofaune. Prema najnovijim saznanjima u rijekama dunavskog slijeva obitava 12 endemskih vrsta: veliki vijun, dunavska paklara, prugasti balavac, dunavska krkuš, mladica, tankorepa krkuš, bjeloperajna krkuš, plotica, dok su svijetlica, kapelska svijetlica, krbavski pijor i krbavska gaovica prisutni samo u hrvatskom dijelu dunavskog slijeva (Ćaleta i sur., 2015).

Ovo istraživanje je obuhvatilo rijeke šest država balkanskog poluotoka: Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu, Srbiju, Bugarsku i Rumunjsku (slika 4), odnosno čitav areal rasprostranjenosti velikog vijuna. U tablici 1 naveden je popis lokaliteta, kao i riječnih bazena kojima lokalitet pripada.



Slika 4: Karta s označenim rijekama iz kojih su sakupljeni uzorci u ovom istraživanju.

Površina vodnog područja rijeke Dunav u Hrvatskoj iznosi 35101 km², što predstavlja 62% hrvatskog kopnenog teritorija (www.icpdr.org).

Kupa i Petrinjčica

Kupa izvire iz Kupskog jezera unutar Nacionalnog parka Risnjak u Gorskom kotaru. Tvori istočnu granicu Hrvatske i Slovenije te na tom dijelu ima sve karakteristike planinske rijeke, dok je nizvodno od Karlovca pa sve do ušća u Savu tipična nizinska rijeka (Delić i sur., 2014). Ukupne je dužine toka 296 km, a teče jugoistočno i istočno do ušća u Savu kraj Siska.

Glavne desne pritoke su joj Dobra, Korana, Glina, Petrinjčica, a lijeve Čabranka, Kupčina i Odra (www.enciklopedija.hr).

U ovom diplomskom radu uzorke iz Petrinjčice analizirala sam zajedno s uzorcima iz Kupe s obzirom da nema prepreka migraciji te se vjerojatno radi o istoj populaciji.

Petrinjčica izvire na sjevernim obroncima Zrinske gore, duga je 36 km, a porječje obuhvaća 82 km². Protječe kroz Petrinju gdje se i ulijeva u Kupu. Predstavlja bogat prirodni rezervat s nizom zaštićenih biljnih i životinjskih vrsta te je bogato nalazište okamina iz mezozoika. U njoj obitava i nekoliko zaštićenih vrsta riba karakterističnih za gorske rijeke (potočna i balkanska mrena, veliki vijun, piškur, zlatni vijun, potočna pastrva, tankorepa krkuš, lipnjen, obični vijun, manjić i glavoč) (www.dinarskogorje.com).

Sava

Sava nastaje iz dviju planinskih rijeka: Save Dolinke i Save Bohinjke. Dugačka je 945 km te je najvažnija i najdulja pritoka Dunava u cijelom njegovu toku, a pokriva površinu od 95719 km². Također je jedna od najvećih europskih rijeka. Cijelim tokom ima jako puno pritoka, a najznačajnije desne pritoke su Ljubljanica, Kupa, Una, Drina, Vrbas, Bosna, Kolubara. Te se rijeke zbog svoje veličine porječja i dužine smatraju podsljevovima Save. (www.dinarskogorje.com).

Savski bazen je međunarodni bazen te se 40% bazena nalazi u Bosni i Hercegovini, 26% u Hrvatskoj, 15,4% u Srbiji, 11% u Sloveniji, 7,5% u Crnoj Gori i 0,1% u Albaniji (Sommerwerk i sur., 2009).

Sunja

Sunja je desna pritoka rijeke Save koja izvire na sjevernim padinama Zrinske gore, ispod Priseke, na 600 metara apsolutne visine. Duga je 69 km, a površina riječnog bazena joj je 462 km². Kanalizirana je, a u Savu se ulijeva jugozapadno od Jasenovca (www.enciklopedija.hr).

Sutla

Sutla je granična rijeka između Slovenije i Hrvatske. Lijeva je pritoka Save te je duga 92,4 km. Površina riječnog bazena čini oko 600 km² te je prilično krivudavog toka. Izvire na južnim obroncima Maceljske gore, ispod Prevoja, a u Savu se ulijeva blizu Savskog Marofa. Dio je ekološke mreže Natura 2000, u njoj živi vrlo raznolika ihtiološka zajednica, a ondje obitava i 7 ciljnih Natura 2000 vrsta (www.klanjec.hr).

Una

Rijeka Una izvire u tihom tirkiznom zelenilu svoga vrela, iz beskrajne dubine mirnog jezera, pokraj sela Donja Suvaja u Zadarskoj županiji. Njen izvor zaštićen je 1968. godine kao hidrološki spomenik prirode. Teče dužinom od oko 212 km, a na kraju svog toka ulijeva se u Savu u blizini Jasenovca. Granična je rijeka i tvori granicu između Hrvatske i Bosne i Hercegovine. Na zapadnom dijelu Bosne i Hercegovine, uz samu granicu s Hrvatskom, dio je Nacionalnog parka „Una“, posebnog po dužini svog sedrotvornog toka s cijelim nizom sedrenih tvorevina (www.panacomp.net).

Kroz Sloveniju protječe 16442 km² vodnog područja rijeke Dunav, što čini oko 81% kopnenog teritorija (www.icpdr.org).

Iška

Iška je rijeka u središnjoj Sloveniji, duga je 29 km. U svojem kratkom toku rijeka savladava visinsku razliku od 492 m (najvećim dijelom u prvih 17 km toka – prosječni pad 4%). Izvire na kraju Bloške visoravni - dolomitnog dijela Dinarida, ispod sela Lužarji, potom se kod Črne Vasi ulijeva u rijeku Ljubljanicu, a zatim i u Savu.

Rijeka Iška s pritokama uključena je u mrežu Natura 2000 te je životni prostor nekih rijetkih i ugroženih životinjskih vrsta, primjerice potočnog raka. Rijeku obilježava velika razlika između najvišeg i najnižeg vodostaja, odnos 1:120 koji je uzrokovan sezonalnošću (najniži vodostaj u srpnju i kolovozu, najviši u proljeće i jesen – otapanje snijega i pojačane padaline) (www.dedi.si).

Dio dunavskog slijeva koji protječe kroz Bosnu i Hercegovinu obuhvaća 36636 km² površine, što je oko 75% teritorija ove države (www.icpdr.org).

Usora

Usora je lijeva pritoka rijeke Bosne, pripada slijevnom području rijeke Save. Izvire ispod vrha Očauš, planinskog masiva Borija s desne strane i planine Vlašić s lijeve strane. Nastaje spajanjem dvije male rječice Penava i Mihajlovac, a u Bosnu se ulijeva kod grada Doboja. Dužina toka iznosi oko 80 km, dok je površina slijeva oko 850 km². Što se tiče riblje zajednice u izvornom dijelu pa sve do mjesta Studenci (tok koji čini čista planinska voda)

nastanjena je potočna pastrva, klen, škobalj, krkuša, potočna mrena, mrena, plotica, pijor, uklija, bijelica (www.bistrobih.ba).

Vrbanja

Vrbanja je rijeka u zapadnom dijelu srednje Bosne te je uz rijeku Ugar najveća desna pritoka Vrbasa i dio je savskog bazena. Izvire na planini Vlašić, kod Kruševog Brda na visini 1520 m, teče pored Kotor-Varoši, a ušće joj je u samoj blizini Banja Luke. Duga je oko 85,3 km, a površina slijeva obuhvaća 866 km². U svom gornjem toku izuzetno je čista te je taj predio bogat potočnom pastrvom i mladicom, kao i ostalim ribljim vrstama (podust, klen, mrena, plotica) (turizamrs.org).

U Srbiji je površina dunavskog slijeva među najvećima i pokriva površinu od 81 261 km², odnosno 92% teritorija Srbije (www.icpdr.org).

Dičina

Dičina je rijeka u Srbiji. Izvire na južnim padinama Suvobora i Rajca a nastaje od Velike i Male Dičine. Kao lijeva pritoka ulijeva se u rijeku Čemernicu, pritoku Zapadne Morave. Dužina toka joj je 35 km, a površina slijeva oko 394 km² (sr.wikipedia.org).

Jadar

Jadar je rijeka u zapadnoj Srbiji, izvire na planini Vlašić, sjeveroistočno od Valjeva te je njegov glavni izvorišni krak Mali Jadar. Ukupna dužina Jadra iznosi 79 km, a površina slijeva je 878 km². Ulijeva se u rijeku Drinu te je dio savskog bazena. Slijev Jadra je asimetričnog oblika s razvijenom i prostranijom lijevom stranom (en.wikipedia.org). U dolini ove rijeke nađen je mineral jadarit te je to jedino nalazište tog minerala na svijetu. Osim toga, dolina rijeke Jadar jedno je od najvećih svjetskih nalazišta litija i bora (www.b92.net).

Kolubara

Rijeka Kolubara smještena je u zapadnoj Srbiji, duga je oko 123 km s područjem slijeva od oko 3600 km². Jedna je od najvećih desnih pritoka Save u Srbiji, u koju utječe 4 km sjeveroistočno od Obrenovca. Nastaje kod Valjeva od izvorišnih krakova Obnice i Jablanice. Veće pritoke su joj Gradac i Ljig (desne pritoke) te Tamnava (lijeva pritoka) (www.enciklopedija.hr).

Ribnica

Ribnica je pritoka rijeke Ibar u Srbiji, najveća je rijeka koja cijelim svojim tokom prolazi kroz teritorij općine Kraljevo. Nastaje u Brežđu spajanjem potoka Paklešnice i Manastirice. Duga je 26 km, a površina slijeva je 115 km². Veliki dio toka je planinski. Ima alogeni tok Valjevskog krša, tj. nema izrazito kanjonsku dolinu već se sastoji od kanjonskih i klisurastih poteza, a mjestimično i erozivnih proširenja. Voda u Ribnici je izuzetno čista te je stanište različitih vrsta riba. Dio toka je zaštićen kao spomenik prirode te kao dobro od izuzetne važnosti. Posebnosti su joj dvije pećine Ribnička i Šalitrena te 15 vrsta zaštićenih šišmiša (Chiroptera) (www.koreni.rs).

Timok

Timok je rijeka u istočnoj Srbiji. To je skup rijeka istog imena, s pridjevom ispred (Crni Timok, Beli Timok, Svrliški Timok, Trgoviški i Veliki Timok). Teče kroz Srbiju, a u donjem toku čini dio granice s Bugarskom. U ovom su radu jedinke uzorkovane iz Crnog, Svrliškog i Trgovišnog Timoka.

Crni Timok izvire ispod planine Veliki Maljenik. Dugačak je 84 km, a površina njegova slijeva je 1233 km². Ulijeva se u Beli Timok kod Zaječara i zajedno čine Timok. Na nekim mjestima ima izuzetno krivudav tok.

Svrliški Timok izvire u podnožju Svrliških planina i teče do mjesta Svrlijig po kojem je i dobio ime. Dužina toka mu je 65,5 km, dok površina slijeva obuhvaća 730,7 km². Kod mjesta Knjaževac spaja se s Trgovišnim Timokom i čini Beli Timok.

Trgovišni Timok izvire na zapadnim obroncima Stare planine ispod Midžora, manje od kilometra od bugarske granice pod imenom Strma reka. Dužine je 50,5 km i površine slijeva 523 km² (timok.net)

Toplica

Toplica je najveća lijeva pritoka Južne Morave. Ime je dobila po toplim izvorima kojih ima dosta duž njenog toka. Duga je preko 130 km te joj slijev obuhvaća površinu od oko 2200 km². Izvire na istočnoj strani Kopaonika ispod Pančićeva vrha, a ulijeva se u Južnu Moravu kod Doljevca. Jedinstvena je po tome što u Prokuplju kod brda Hisar teče uz brdo (epigenija). Najznačajnija i najveća joj je pritoka Kosanica (www.telegraf.rs).

U Bugarskoj dunavski slijev čini oko 43% kopnenog teritorija, odnosno površinu od 47413 km² (www.icpdr.org).

Jantra

Jantra je rijeka u sjevernoj Bugarskoj, treća po veličini. Izvire iz sjevernog podnožja vrha Hadji Dimitar u središnjem dijelu Stare planine na 1340 metara, te je gornji dio toka planinski. Ukupna površina slijeva iznosi 7869 km², dok je ukupna duljina toka oko 285 km. U Dunav se ulijeva u blizini mjesta Krivina (Bojilova, 2011).

Vit (Vid)

Vit je također rijeka u sjevernoj Bugarskoj, dužine 189 km te površine slijeva od 3228 km². Izvor se nalazi na Staroj planini na 2030 m nadmorske visine u blizini vrha Vezhena te su joj glavne pritoke Kamenska reka, Kalnik i Tuchenista. U blizini mjesta Somovit ulijeva se u Dunav. Veći dio slijeva rijeke Vit uključen je u 4 predložena zaštićena područja nacionalne mreže Natura 2000 (Pehlivanov i sur., 2009). Rijeka je izuzetno bogata ribom te su u istraživanju 2009. godine (Pehlivanov i sur.) zabilježili 35 vrsta iz 10 porodica.

Uz Srbiju, površina dunavskog slijeva je među najvećim u Rumunjskoj, obuhvaća čak 97% teritorija ove države, odnosno površinu od oko 232000 km² (www.icpdr.org).

Nera

Rijeka Nera je 124 km duga rijeka koja protječe kroz Srbiju i Rumunjsku, a tvori i dio prirodne granice između Srbije i Rumunjske. Izvire na planini Semenik u rumunjskom Banatu, teče prema Srbiji, lijeva je pritoka Dunava u koji se ulijeva u Banatskoj Palanki. Protječe kroz nekadašnje rudarsko naselje Sasca Montană, na rubu Nacionalnog parka Cheile Nerei – Beusnita uz planinski vodotok svoje pritoke Šušare (planine.net).

Tablica 1: Popis uzoraka uključenih u istraživanje, s navedenim lokalitetima i haplotipovima (brojevi u zagradi pored oznake haplotipa predstavljaju broj jedinki u kojima je nađen određeni haplotip).

LOKALITET	RIJEČNI BAZEN	DRŽAVA	OZNAKA UZORKA	HAPLOTIP
Kupa (Petrinja, Brod na Kupu, Ozalj)	Sava	Hrvatska	CBKU1-23	HAP1 (6), HAP2 (3), HAP3-4, HAP7, HAP12 (5), HAP13-16, HAP45-46
Petrinjčica (Miočinović, Dodoši)	Sava	Hrvatska	CBPET1-15	HAP1 (4), HAP2 (6), HAP12 (4), HAP18
Sava (Dugo Selo, Zagreb, Ivanja Reka)	Sava	Hrvatska	CBSA1-8	HAP5-12
Sunja (Kostreši Bjelovački)	Sava	Hrvatska	CBSUNJ1-5	HAP12 (2), HAP13, HAP26-27
Sutla	Sava	Hrvatska	CBSU1	HAP13
Una (Hrvatska Kostajnica)	Sava	Hrvatska	CBUN1-15	HAP12 (3), HAP13 (8), HAP32-35
Dičina (Brđani)	Zapadna Morava	Srbija	CBDI1-15	HAP12 (10), HAP20 (2), HAP21, HAP22 (2)
Jadar (Zavlaka)	Drina, Sava	Srbija	CBJAD1-15	HAP2 (10), HAP12, HAP28, HAP29 (2), HAP30
Kolubara (Valjevo)	Sava	Srbija	CBKO1-7	HAP2 (6), HAP19
Ribnica (Kraljevo)	Ibar, Zapadna Morava	Srbija	CBRIB1-5	HAP2, HAP12 (3), HAP23
Timok (Gamzigrad, Podvis)	Timok	Srbija	CBTI1-9	HAP12 (6), HAP24 (3)
Toplica (Doljevac)	Južna Morava	Srbija	CBTO1-16	HAP12 (14), HAP25 (2)
Usora (općina Usora)	Bosna, Sava	Bosna i Hercegovina	CBUS1-14	HAP12 (5), HAP13 (2), HAP16, HAP38-43
Vrbanja (Banja Luka)	Vrbas, Sava	Bosna i Hercegovina	CBVR1-15	HAP12 (7), HAP13 (4), HAP36 (3), HAP37
Iška	Ljubljana, Sava	Slovenija	CBIS1-4	HAP12, HAP44 (3)
Jantra ili Vit	Dunav	Bugarska	CBJAN1-8	HAP12 (6), HAP31 (2)
Vit (Pleven)	Dunav	Bugarska	CBVIT1-10	HAP12 (10)
Nera (Sasca Montană)	Dunav	Rumunjska	CBNE1-13	HAP12 (4), HAP13 (5), HAP17, HAP47 (3)

3.3. Metode

3.3.1. Računalne analize nukleotidnih sljedova

Nukleotidne slijedove DNA, pohranjene na Zoologijskim zavodu Biološkog odsjeka PMF-a sravnila sam pomoću programa BioEdit v7.2.5 (Hall, 1999). BioEdit se koristi za poravnanje i uređivanje sekvenca (www.mbio.ncsu.edu). Sravnila sam sekvence u ukupnoj duljini *cyt b* gena, koja iznosi 1140 parova baza (pb).

Nakon sravnjenja sekvenci utvrdila sam haplotipove (predstavljaju skupinu sekvenci s identičnim nukleotidnim slijedom). Svakom haplotipu dala sam drugačiji naziv za lakši prikaz na filogenetskim stablima i mreži. Datoteku sa sekvencama sam potom pretvorila u *nexus* format i filogenetski ih analizirala u programu PAUP 4.0.10 (Swofford, 2002). Paup omogućuje filogenetske analize temeljem metoda koje rade izravno sa sekvencama, a njima se dobivaju filogenetska stabla i filogrami (Mount, 2001). Koristila sam metodu najveće parsimonije (MP). Duljinu stabla, broj konstantnih, varijabilnih, kao i parsimonijski informativnih mjesta te indeks konzistencije (CI), indeks homoplazije (HI), indeks retencije (RI) i indeks reskalirane konzistencije (RC) također sam izračunala pomoću računalnog programa PAUP. Filogenetsko stablo dobiveno je korištenjem algoritma dijeljenja i ponovnog povezivanja, odnosno TBR (*Tree bisection reconnection*) algoritma koji radi po principu da se preklapanje grana dijeli te ponovno povezuje.

Nadalje, pomoću programa MrBayes 3.2. provela sam Bayesovu analizu (BAY). MrBayes koristi Markov Chain Monte Carlo (MCMC) pristup za traženje stabala, a sastoji se od dvije faze: *burn in* - program traži stabla i parametre koji su najbliže najvjerojatnijim rezultatima te „stacionarne faze“ u kojoj program istražuje stabla i parametre oko najvjerojatnijih rezultata. U metodi Bayesove analize prvih 20% stabala isključeno je iz analize (*burn in*).

Podršku za grananja unutar filogenetskih stabala (*bootstrap*) odredila sam na temelju 1000 ponavljanja za metodu najveće parsimonije i Bayesove analize. U obje analize kao vanjsku grupu koristila sam vrstu *Cobitis elongatoides* (slika 2) za potrebe usporedbe jer je blisko srodan velikom vijunu.

Filogenetsku mrežu konstruirala sam metodom susjednog sparivanja (MJ, *median joining*) u programu Network 5.0.0.3. Zatim sam mrežu uredila tako da sam svaki lokalitet, tj. svaku sekvencu unutar haplotipa obojala drugom bojom, označila broj mutacijskih veza ukoliko je bio veći od 2 te rimskim brojevima obilježila svaku od četiriju grupa haplotipova.

3.3.2. Analiza genskog polimorfizma (raznolikosti)

Uz pomoć računalnog programa DnaSP v5 (Librado i Rozas, 2009) za ukupan broj uzoraka te za svaki posebno od lokaliteta napravila sam analizu parametara intrapopulacijskog genskog polimorfizma. Parametre genskog polimorfizma za rijeku Sutlu zbog malog broja uzoraka nisam računala, dok sam rijeke Kupu i Petrinjčicu računala zajedno. Analizirala sam sljedeće parametre: n- broj sekvenci, h- broj haplotipova, S- broj polimorfnihi mjesta, η- ukupan broj mutacija, Hd- raznolikost haplotipova, k- prosječan broj nukleotidnih razlika, π- nukleotidna raznolikost, tj. prosječan broj nukleotidnih razlika po mjestu između dvije sekvence.

3.3.3. Analiza intraspecijske strukture

Da bi se razjasnila međusobna povezanost populacija velikih vijuna, potrebno je izračunati koliko jedinki migrira s jednog lokaliteta na drugi, odnosno postoji li protok gena između populacija ili su populacije izolirane. Kako bih to otkrila, koristila sam set podataka koji je sadržavao sve sekvence velikih vijuna (tablica 1) i populacijsko genetički program MIGRATE 3.3.1.

Na temelju sekvenci, a korištenjem metode najveće vjerodostojnosti (ML) i računalnog programa MIGRATE procjenjivala sam intenzitet protoka gena kao koeficijent migracije, ali i kao broj migranata po generaciji. Koeficijent migracije označava koliko su imigracijski događaji važni u unošenju varijabilnosti u neku populaciju u odnosu na mutacije. Važno je naglasiti kako provedena analiza procjenjuje protok gena kroz evolucijsku prošlost pa zaključno s današnjim trenutkom, a ne određuje samo recentni protok gena. Uzorke iz Kupe i Petrinjčice računala sam zajedno.

Bayesovom metodom, uz korištenje istog programa, procijenila sam efektivnu veličinu populacija i to na razini najveće vjerojatnosti, kao i vjerojatnosti od 2,5 do 97,5%.

Efektivnu veličinu populacije (N_e) izračunala sam koristeći sljedeću formulu:

$$Ne = \frac{\theta}{\mu}$$
, gdje je N_e – efektivna veličina populacije, θ – parametar, μ - stopa mutacije po generaciji po sekvenci (iznosi 0.0000017 za rod *Cobitis*, prema Perdices i sur., 2014)

Kako bih procijenila broj migranata (N_m) koji migrira iz populacije u populaciju, koristila sam sljedeću formulu:

$Nm = M * \Theta$, gdje je M – koeficijent migracije, pokazuje važnost migracija u odnosu na mutacije u unošenju nove varijabilnosti u populaciju, Θ – parametar teta

3.3.4. Evolucijska analiza

Pomoću programskog softvera BEAST 1.8.4 (Suchard i sur., 2018) dobila sam evolucijsko stablo s približnim vremenom nastanka pojedinih populacija. Za stopu mutacije primjenila sam vrijednost od 0,0034 (mutacijska stopa za obostrano uspoređivanje sekvenci po milijunu godina, prema Perea i sur., 2010). Analiza je provedena tijekom 10 milijuna generacija s uzorkovanjem svakih 1000 generacija, dok je prvih 1000 (10%) uzorkovanih stabala isključeno iz analize (*burn in*). Programom TreeAnnotator verzija 1.7.2 (Drummond i sur., 2012) izrađeno je konsenzusno filogenetsko stablo s procijenjenim vremenima divergencije. Nakon provedene analize, dobiveno filogenetsko stablo prikazala sam i uredila računalnim programom FigTree 1.4.2. (Rambaut, 2012) te dodala dobivena vremena divergencije.

4. REZULTATI

Ukupna duljina nukleotidnih sekvenci za cyt *b* iznosila je 1140 parova baza, što je ujedno i cjelokupna duljina navedenog gena. U ukupnom uzorku od 198 sekvenci s 18 lokaliteta pronađeno je 47 različitih haplotipova (tablica 2).

Tablica 2: Prikaz oznaka haplotipova i broja uzoraka u kojima je nađen pojedini haplotip.

Oznaka haplotipova	Broj uzoraka u kojima je nađen haplotip	Kodovi sekvenca
hap1	10	CBKU1, CBKU6, CBKU 8, CBKU10-12, CBPET1-2, CBPET8, CBPET11
hap2	26	CBKU2-3, CBKU7, CBPET3, CBPET7, CBPET9-10, CBPET13, CBPET15, CBKO1-2, CBKO4-7, CBRI4, CBJAD1, CBJAD4-11, CBJAD14
hap3	1	CBKU4
hap4	1	CBKU5
hap5	1	CBSA1
hap6	1	CBSA2
hap7	2	CBSA3, CBKU17
hap8	1	CBSA4
hap9	1	CBSA5
hap10	1	CBSA10
hap11	1	CBSA11
hap12	82	CBKU9, CBKU16, CBKU20-22, CBPET4-5, CBPET12, CBPET14, CBSA13, CBSUNJ1-2, CBUN3, CBUN10, CBUN15, CBIS4, CBDI2-3, CBDI5-10, CBDI12-13, CBRI1-3, CBTI1-2, CBTI6-9, CBTO1-8, CBTO10-14, CBTO16, CBJAD12, CBUS1, CBUS3, CBUS5-6, CBUS14, CBVR3-4, CBVR7-8, CBVR11, CBVR14-15, CBVIT1-10, CBJAN2-6, CBJAN8, CBNE3, CBNE7-8, CBNE12
hap13	22	CBKU13, CBSU1, CBUN2, CBUN5-7, CBUN9, CBUN12-14, CBNE1, CBNE5, CBNE9, CBNE11, CBNE13, CBSUNJ5, CBVR1-2, CBVR10, CBVR13, CBUS4, CBUS8
hap14	1	CBKU14
hap15	1	CBKU15
hap16	2	CBKU18, CBUS9
hap17	1	CBNE2
hap18	1	CBPET6

Tablica 2. Nastavak.

Oznaka haplotipova	Broj uzoraka u kojima je nađen haplotip	Kodovi sekvenca
hap19	1	CBKO3
hap20	2	CBDI1, CBDI4
hap21	1	CBDI11
hap22	2	CBDI14-15
hap23	1	CBRI5
hap24	3	CBTI3-5
hap25	2	CBTO9, CBTO15
hap26	1	CBSUNJ3
hap27	1	CBSUNJ4
hap28	1	CBJAD2
hap29	2	CBJAD3, CBJAD13
hap30	1	CBJAD15
hap31	2	CBJAN1, CBJAN13
hap32	1	CBUN1
hap33	1	CBUN4
hap34	1	CBUN8
hap35	1	CBUN11
hap36	3	CBVR5-6, CBVR9
hap37	1	CBVR12
hap38	1	CBUS2
hap39	1	CBUS7
hap40	1	CBUS10
hap41	1	CBUS11
hap42	1	CBUS12
hap43	1	CBUS13
hap44	3	CBIS1-3
hap45	1	CBKU19
hap46	1	CBKU23
hap47	3	CBNE4, CBNE6, CBNE10

4.1. Genski polimorfizam

Najveći broj haplotipova utvrđen je u populaciji velikog vijuna iz Kupe i Petrinjčice (ova je populacija predstavljena i najvećim brojem uzoraka), dok je u uzorku iz rijeke Vit prisutan samo jedan haplotip. Raznolikost haplotipova varira između 0,233 i 1, te je najveća raznolikost utvrđena u rijeci Savi. Također, veća raznolikost haplotipova utvrđena je i za Kupu i Petrinjčicu, Usoru i Neru. Populacija iz Kupe i Petrinjčice pokazuje najveći broj polimorfni mjesta i ukupan broj mutacija te najveći broj nukleotidnih razlika, što potvrđuje da sadrži najveću gensku raznolikost. Visoka genska raznolikost uočena je i za područje Save i Usore. S obzirom na broj uzorkovanih jedinki iz rijeke Toplice, dobivena genska raznolikost je bila niska. Uzorak rijeke Sutle sam isključila iz analize jer je u ukupnom uzorku bila prisutna samo jedna jedinka zbog čega mjere genskog polimorfizma nije bilo moguće izračunati. U ukupnom uzorku prosječan broj nukleotidnih razlika (k) iznosio je 3,911.

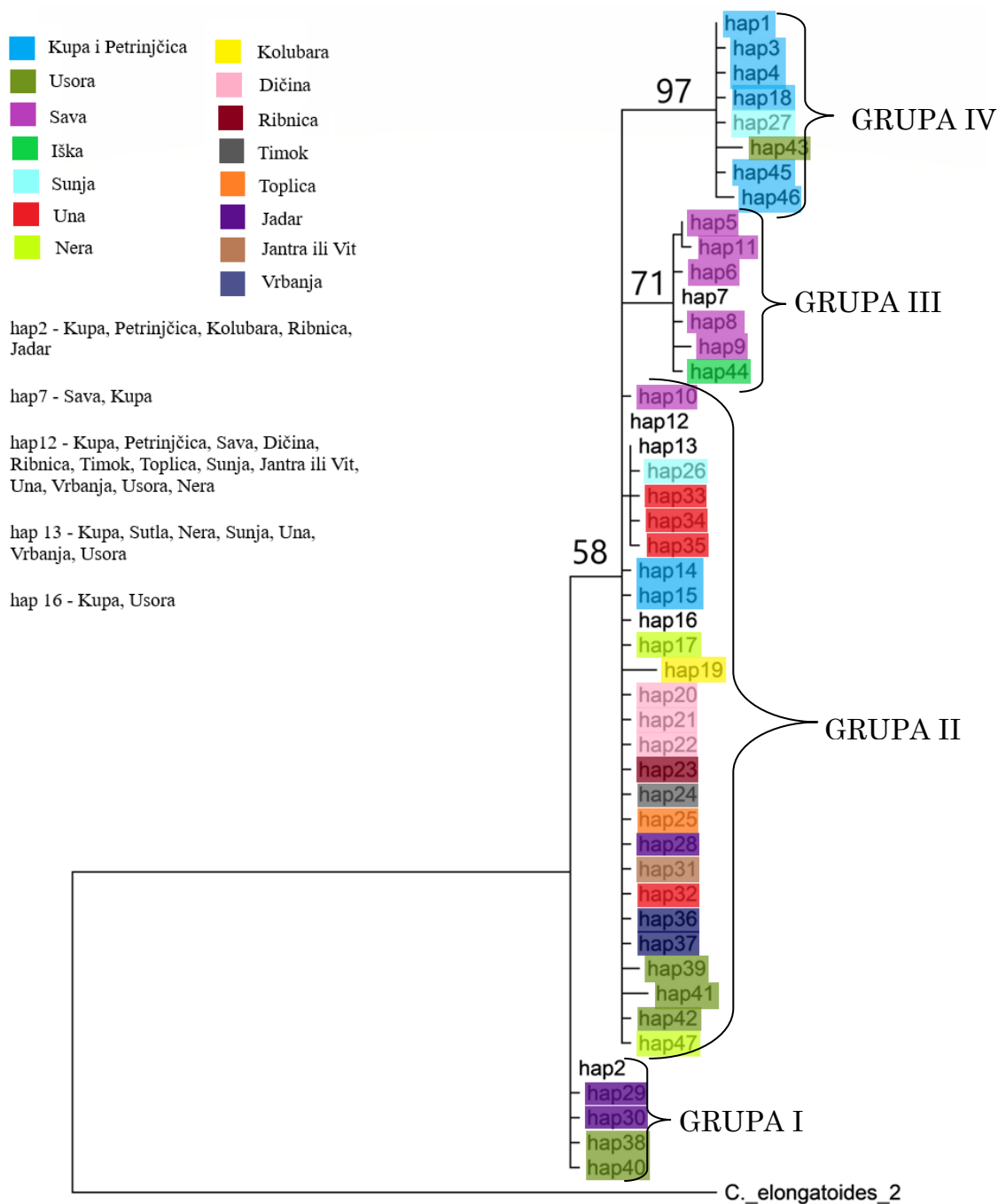
Tablica 3: Genski polimorfizam velikog vijuna prema lokalitetima te za ukupan broj uzoraka.

* n – broj sekvenci, h – broj haplotipova, S – broj polimorfni mjesta, η – ukupan broj mutacija, Hd – raznolikost haplotipova, k – prosječan broj nukleotidnih razlika, π – nukleotidna raznolikost

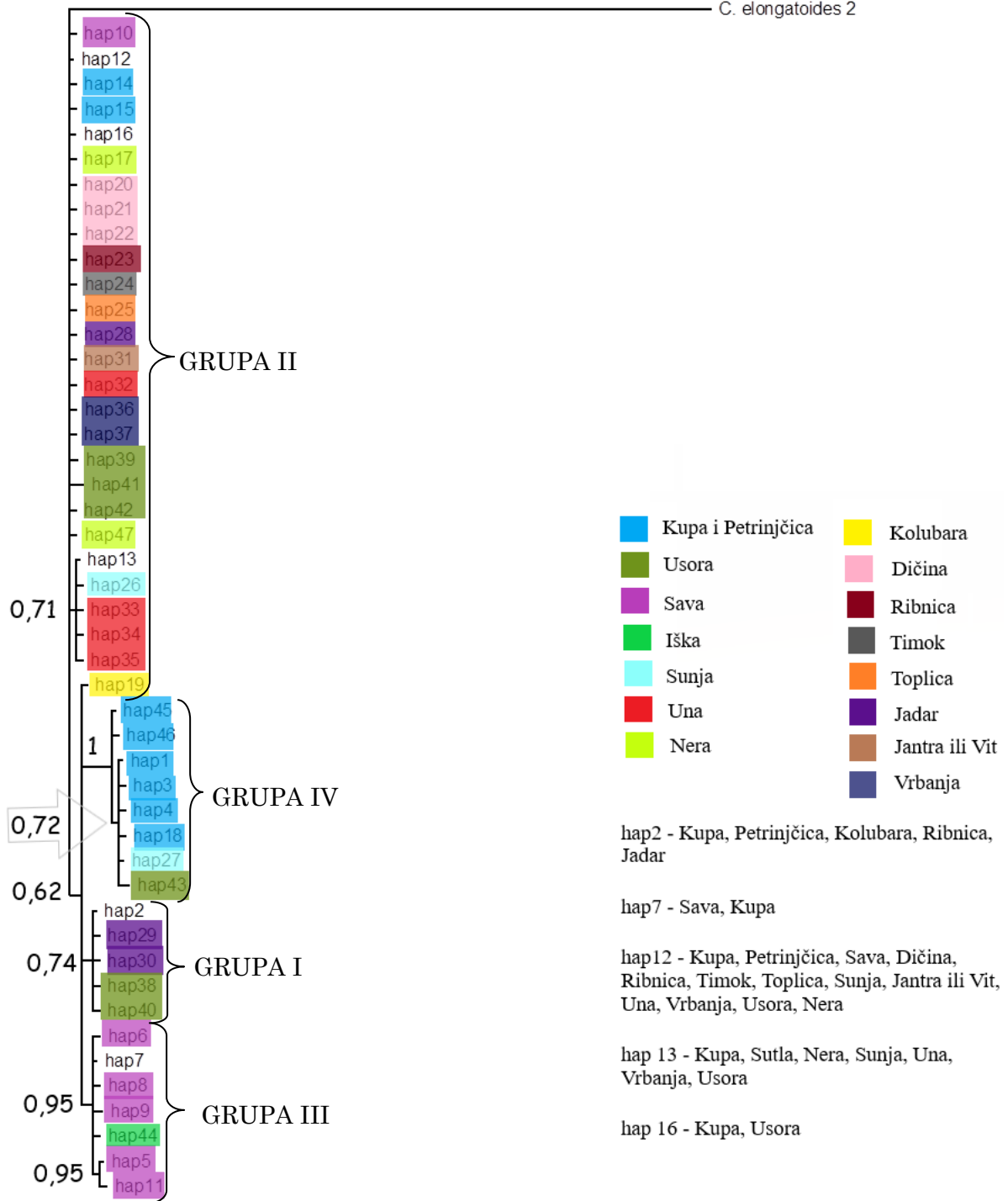
LOKALITET	n	h	S	η	Hd	k	π
Kupa i Petrinjčica	38	13	22	22	0.834	6.447	0.00566
Sava	8	8	13	13	1	4.5	0.00395
Nera	13	4	3	3	0.756	1.051	0.00092
Vit	10	1	0	0	0	0	0
Kolubara	7	2	4	4	0.286	1.143	0.001
Dičina	15	4	3	3	0.552	0.629	0.00055
Ribnica	5	3	7	7	0.7	2.8	0.00246
Timok	9	2	1	1	0.5	0.5	0.00044
Toplica	16	2	1	1	0.233	0.233	0.0002
Sunja	5	4	12	12	0.9	5	0.00439
Jadar	15	5	9	9	0.562	2	0.00175
Jantra ili Vit	8	2	1	1	0.429	0.429	0.00038
Una	15	6	5	5	0.705	0.952	0.00084
Vrbanja	15	4	3	3	0.714	0.895	0.00079
Usora	14	9	21	21	0.879	4.143	0.00363
Iška	4	2	7	7	0.5	3.5	0.00307
Ukupno uzoraka	198	47	51	51	0.798	3.911	0.00344

4.2. Rezultati filogenetske rekonstrukcije

4.2.1. Filogenetska rekonstrukcija metodama najveće parsimonije (MP) i Bayesovom metodom (BAY)



Slika 5: Filogenetsko stablo haplotipova dobiveno metodom maksimalne parsimonije; brojevi pokraj čvorova pokazuju vrijednosti podržanosti stabla. Vitičastim zagradama i rimskim brojevima označena je svaka od četiriju grupa haplotipova. Različitim bojama označen je lokalitet na kojem je haplotip nađen (nebojani haplotipovi sadrže sekvence s više lokaliteta).



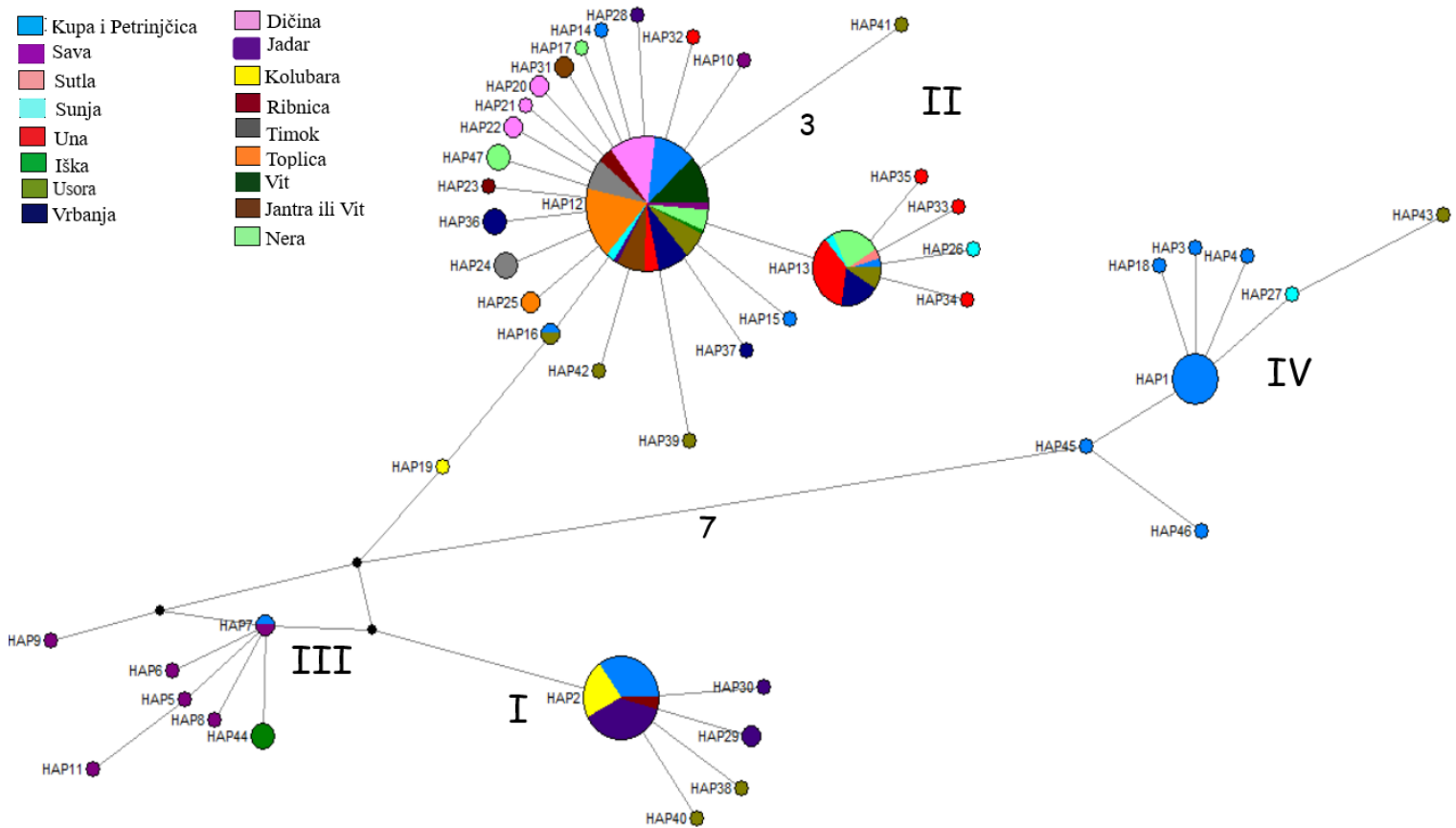
Slika 6: Filogenetsko stablo haplotipova dobiveno Bayesovom analizom. Brojevi pokraj čvorova pokazuju stupanj podržanosti stabla, a vitičastim zagradama i rimskim brojevima označena je svaka od četiriju grupa haplotipova. Različitim bojama označen je lokalitet na kojem je haplotip nađen (neobojeni haplotipovi sadrže sekvence s više lokaliteta).

Na slikama 5 i 6 nalaze se MP i BAY filogenetska stabla. Od ukupnih 1140 parova baza, 974 ih je stalno, 140 su varijabilne, dok je 26 parsimonijski informativnih mjesta. Filogenetska analiza gena za *cyt b* velikih vijuna pokazala je postojanje četiriju grupa haplotipova, odnosno četiriju filogenetskih grupa ili linija, utvrđenih s različitom (58 – 97%; 0,62 – 1) podržanošću, osobito što se tiče odnosa unutar grupe II, koje provedene analize nisu mogle dobro razriješiti.

Na temelju dobivenih stabala vidljivo je da su grananja vrlo uska, a veliki vijuni s istraživanog područja grupirani su u četiri grupe. Prva odvojena grupa je najmanja i sadržavala je 5 haplotipova s lokaliteta rijeka Kupe i Petrinjčice, Kolubare, Ribnice, Jadar te Usore. Druga grupa bila je najveća i najraznolikija, a sadržavala je haplotipove s gotovo svih područja koja su istraživana u ovom diplomskom radu: Kupe, Petrinjčice, Save, Dičine, Ribnice, Timoka, Toplice, Sunje, Jantre ili Vita, Une, Vrbanje, Usore i Nere. Unutar te grupe odvojila se jedna manja podgrupa koja je obuhvatila haplotipove 13, 26, 33, 34 i 35, odnosno haplotipove s područja Une i Sunje i nekolicine drugih rijeka sadržanih u haplotipu 13 (tablica 2). Treća je grupa obuhvatila haplotipove iz rijeka Save, Kupe i Iške te je uz četvrtu grupu imala najveći stupanj podržanosti. Četvrtu grupu čine haplotipovi s područja rijeka Kupe i Petrinjčice, Sunje i Usore.

Filogenetsko stablo dobiveno metodom maksimalne parsimonije opisano je sljedećim parametrima: duljina 209 koraka, indeks konzistencije (CI): 0,8230, indeks homoplazije (HI): 0,1770, indeks retencije (RI): 0,7798 te indeks reskalirane konzistencije (RC): 0,6417.

4.2.2. Filogenetska mreža konstruirana metodom susjednog sparivanja (MJ)



Slika 7: Filogenetska mreža haplotipova dobivena metodom MJ. Veličina kružića odgovara broju jedinki u kojem je nađen haplotip, crne točke prikazuju neprimjećene haplotipove kojih nema u uzorku (ancestralne čvorove) (eng. *median vectors*). Brojevi pod linijama označuju broj mutiranih pozicija u sekvencama, a označeni su kada je broj mutacija bio barem 3. Rimski brojevi pored najvećih krugova označuju broj grupe haplotipa.

Izradom filogenetske mreže haplotipova korištenjem MJ metode utvrđene su zvjezdaste strukture nekoliko grupa haplotipova (slika 7) te su kao i kod analiza provedenih tradicionalnim metodama dobivene 4 zasebne grupe. Prva grupa haplotipova uključila je sve uzorke s područja savskog riječnog bazena i Ribnicu s riječnog bazena Zapadne Morave. Najviše je haplotipova sadržano u II grupi koja je obuhvatila gotovo sve rijeke u kojima je provedeno istraživanje (Kupu i Petrinjčicu, Savu, Sunju, Jadar, Unu, Vrbanju, Usoru, Išku kao dio savskog riječnog bazena; Vit, Jantru ili Vit, Neru kao dio dunavskog riječnog bazena;

Dičinu, Ribnicu, Toplicu (Zapadna i Južna Morava), Crni, Svrliški i Trgovišni Timok (Timok).

Treća grupa uključila je haplotipove iz Save, Kupe i Iške (savski bazen). Unutar te grupe u Kupi i Savi nađen je ancestralni haplotip (hap7). Četvrta grupa je obuhvatila haplotipove Kupe i Petrinjčice, Sunje te Usore (savski bazen). Rijeka Kupa je uključena u svaku od grupa haplotipova. Primijećene haplogrupe odgovaraju grupama utvrđenima na filogenetskim stablima. Najviše se mutacija dogodilo između ancestralnog čvora i IV grupe haplotipova te je ta grupa ujedno i evolucijski najodvedenija. Između svih ostalih haplotipova dogodile su se 1 do 2, odnosno najviše 3 mutacije.

4.3. Efektivna veličina populacije

Efektivne veličine populacija s istraživanih područja uvelike se razlikuju, manje od 200 jedinki koliko je procijenjeno za Timok i Jantru ili Vit (procjena najveće vjerojatnosti) pa do preko 50000 jedinki, koliko je procijenjeno za Sunju.

Tablica 4: Prosječne vrijednosti efektivnih veličina prema najvišoj vjerojatnosti i vjerojatnosti između 2,5 – 97,5 %.

Populacija	Najviša vjerojatnost	Vjerojatnost 2,5% - 97,5%
Kupa i Petrinjčica	2100	512 - 3924
Sava	1117,65	/ - 15764
Nera	570,59	/ - 2353
Vit	529,41	/ - 12076
Kolubara	294,12	/ - 2782
Dičina	335,29	/ - 1371
Ribnica	1276,47	/ - 21571
Timok	135,29	/ - 4159
Toplica	335,29	/ - 1453
Sunja	53629,41	37924 - 58834
Jadar	252,94	/ - 1253
Jantra ili Vit	176,47	/ - 1135
Vrbanja	529,41	/ - 3100
Usora	31352,94	28117 - 52118
Iška	570,59	/ - 5100
Una	570,59	/ - 1806

*kosa crta kod pojedinih populacija označuje da te vrijednosti nije bilo moguće izračunati

4.4. Intraspecijska struktura

Izračunavanjem broja migranata pomoću metode najveće vjerodostojnosti dobivene su prosječne vrijednosti broja migranata koje migriraju između populacija po generaciji, a odnose se na razdoblje tijekom evolucijske povijesti koje završavaju s recentnim razdobljem (tablica 5). Može se primijetiti kako su migracije između pojedinih populacija vrlo ograničene ili ih uopće nema (u ovoj analizi vrijednost broja migranata ako je veća od 0, ali blizu 0 može odražavati gensku sličnost populacija). Samo se migracije iz rijeka Vit i Dičine u Vrbanju mogu smatrati primjetnima, iako ni one nisu značajne. Važno je naglasiti kako te rijeke danas nisu direktno povezane (iako su dio dunavskog bazena), no moguće je da je u geološkoj prošlosti postojala veza između navedenih populacija, ili su one koristile isti glacijalni refugij.

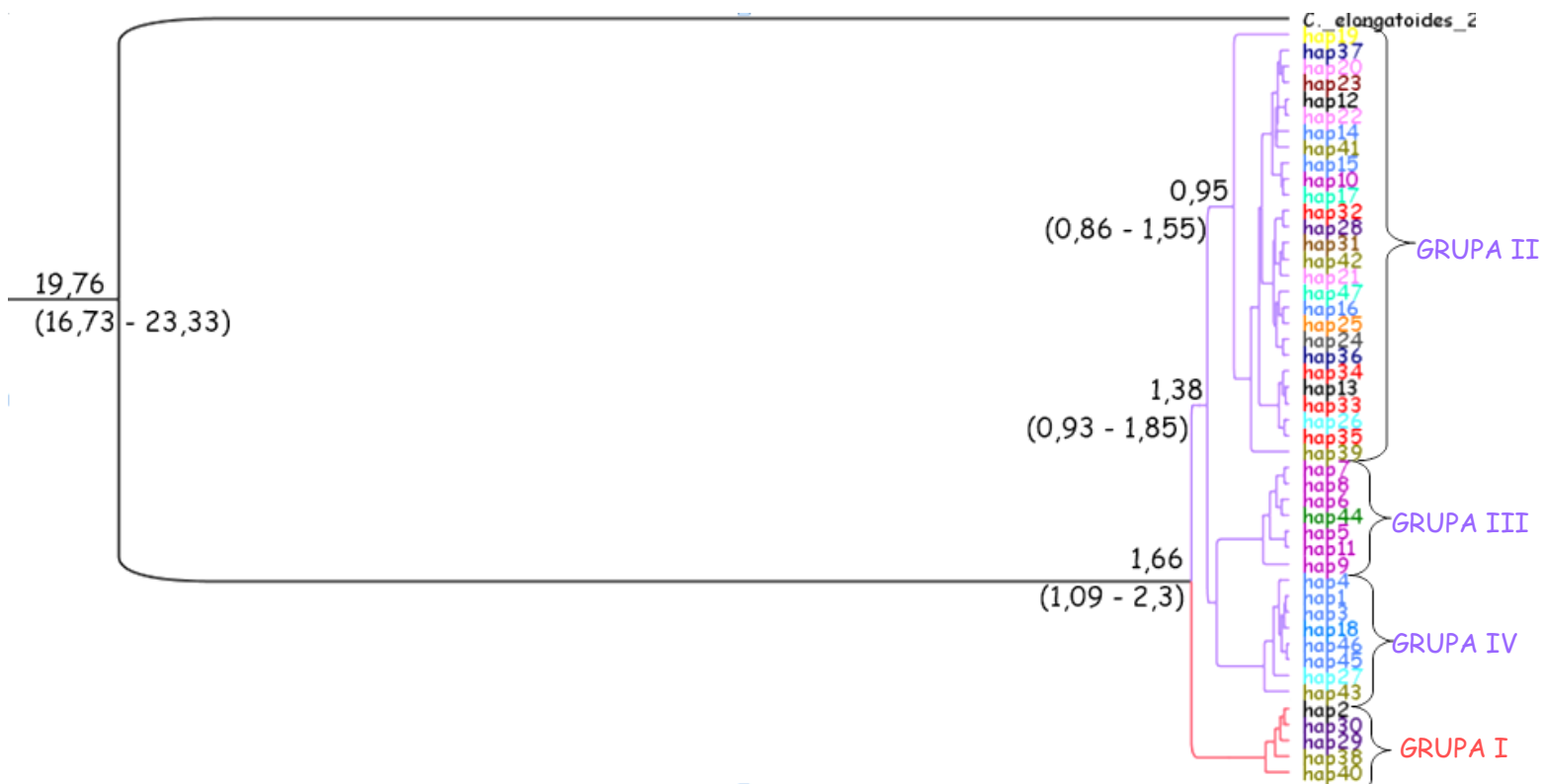
Tablica 5: Broj migranata između populacija dobivena metodom najveće vjerodostojnosti.

* $M_{1 \rightarrow 12}$ – migracija iz Kupe u Jadar, $M_{1 \rightarrow 15}$ – iz Kupe u Vrbanju, $M_{2 \rightarrow 15}$ – iz Save u Vrbanju, $M_{4 \rightarrow 15}$ – iz Nere u Vrbanju, $M_{5 \rightarrow 15}$ – iz Vit u Vrbanju, $M_{7 \rightarrow 15}$ – iz Dičine u Vrbanju, $M_{10 \rightarrow 9}$ – iz Toplice u Timok, $M_{12 \rightarrow 15}$ – iz Jadar u Vrbanju, $M_{14 \rightarrow 15}$ – iz Une u Vrbanju, $M_{17 \rightarrow 10}$ – iz Iške u Toplicu

Migracije	Broj migranata (N_m)
$M_{1 \rightarrow 12}$	5,44
$M_{1 \rightarrow 15}$	6,32
$M_{2 \rightarrow 15}$	1,64
$M_{4 \rightarrow 15}$	7,3
$M_{5 \rightarrow 15}$	36,04
$M_{7 \rightarrow 15}$	27,64
$M_{10 \rightarrow 9}$	9,31
$M_{12 \rightarrow 15}$	2,44
$M_{14 \rightarrow 15}$	2,36
$M_{17 \rightarrow 10}$	1,67

4.5. Vrijeme divergencije velikog vijuna

Prema analizi vremena divergencije velikog vijuna (slika 8) do nastanka vrste došlo je prije otprilike 19,76 milijuna godina, dok je odvajanje grupe I od linije koja je dovela do nastanka ostalih filogenetskih grupa (na slici – grane označene svjetloljubičastom i crvenom bojom) nastupilo prije približno 1,66 milijuna godina, što je razdoblje ranog pleistocena. Tijekom pleistocena dolazi i do divergencije preostale tri grupe. Divergencija II grupe haplotipova dogodila se prije oko 0,95 milijuna godina, dok je odvajanje III i IV grupe haplotipova nastupilo prije otprilike 1,38 mil.god.



Slika 8: Filogenetsko stablo s procjenjenim vremenima divergencije velikog vijuna u milijunama godina. Brojevi na čvorovima određuju približno vrijeme divergencije velikog vijuna, a u zagradama stoji mogući raspon godina; imena haplotipova prikazana su različitim bojama prema lokalitetima (slika 5). Grane dviju većih skupina haplotipova označene su dvjema različitim bojama (svjetloljubičasta i crvena).

5. RASPRAVA

Ovo je prvo istraživanje koje je obuhvatilo molekularnu filogeniju i populacijsku genetiku velikog vijuna s čitavog područja rasprostranjenosti, stoga je literatura za potrebe usporedbe ograničena.

Molekularno filogenetičke analize provedene na sekvencama *cyt b* populacija velikog vijuna (*Cobitis elongata*) pokazale su da je vrsta duboko strukturirana. Provedene analize dale su četiri filogenetski različite i evolucijski odvojene grupe haplotipova: grupa I, grupa II, grupa III i grupa IV. Ustanovljene grupe su većinom geografski povezane te se grupiraju u određena geografska područja povezana riječnim bazenima većih rijeka, osim II grupe koja je široko rasprostranjena te obuhvaća uzorke svih lokaliteta. Vjerojatan uzrok ove duboke strukturiranosti leži u značajkama biologije velikog vijuna – to je slabo aktivna vrsta koja se uglavnom ne pomiče na veće udaljenosti, već je usko vezana uz svoja staništa. U prvoj grupi haplotipova većinom se nalaze haplotipovi s lokaliteta koji predstavljaju desne pritoke Save u središnjem dijelu savskog bazena: Kupa i Petrinjčica – njezine pritoke u Hrvatskoj, Kolubara kao njezina pritoka u Srbiji, Jadar kao pritoka Drine koja je pritoka Save, te Usora – pritoka Bosne, koja se ulijeva u Savu. Jedino odstupanje prisutno u toj grupi čini rijeka Ribnica, koja nije ni na koji način povezana s rijekom Savom, već je dio riječnog bazena Morave, koja se ulijeva u Dunav. Međutim, geografski gledano, Ribnica se nalazi u blizini Dičine i Kolubare te je u prošlosti vjerojatno postojala povezanost. Na temelju filogenetskih stabala, kao i procjene vremena divergencije, možemo zaključiti kako je I grupa haplotipova najsirođnija pretku ove vrste, te ima ancestralni položaj.

Druga grupa haplotipova je obuhvatila uzorke gotovo svih lokaliteta te povezala sve manje slijevove rijeke Dunav. Kako na filogenetskim stablima srodstveni odnosi između pojedinih haplotipova unutar ove grupe nisu riješeni, a na filogenetskoj mreži ona ima jasan zvjezdasti oblik, možemo zaključiti kako je današnja struktura grupe II posljedica nedavne i brze kolonizacije i radijacije, vjerojatno nakon završetka glacijacija. Treća filogenetska grupa (haplotipovi nađeni u rijekama Kupa, Iška i Sava) i četvrta grupa haplotipova (nađena u rijekama Kupa, Petrinjčica, Sunja, Usora), dvije su sestrinske grupe povezane s lokalitetima u gornjem dijelu savskog bazena. Sve četiri grupe haplotipova pojavljuju se u rijeci Kupi, moguće zato što je Kupa služila kao glacijalni refugij. Ovakav rezultat podcrtava važnost Kupe za očuvanje velikog vijuna.

Primjenom različitih tradicionalnih metoda, odnosno metode maksimalne parsimonije i Bayesove analize dobivena su stabla slične topologije, duljina grana i podržanosti. Dobivena stabla pokazala su nisku do srednju podržanost zbog toga što je analiza rađena na manje

raznolikim sekvencama, odnosno sekvencama iste vrste pa je i njihova rezolucija slabija, stoga su dobiveni filogenetski odnosi manje podržani. Osim toga, takvoj podržanosti pridonosi i činjenica da su čvorovi (populacije) evolucijski mladi. Upravo zbog navedenog razloga filogenetska mreža, iako je dala slične rezultate, omogućila je bolju rezoluciju odnosa između haplotipova.

Utvrđeno je ukupno 47 različitih haplotipova za cyt *b* mitohondrijske DNA unutar čitavog areala velikog vijuna. Filogenetska mreža prikazala je postojanje četiri filogenetske grupe. Na temelju pretpostavki na kojima se temelje filogenetske mreže (Posada i Crandall, 2001) moguće je zaključiti da su stariji aleli oni iz Kupe i Petrinjčice. Stoga, postoji vjerojatnost da je iz tih populacija mutacijama nastala većina drugih populacija velikih vijuna prisutnih u dunavskom slijevu. U populaciji velikih vijuna dunavskog slijeva oni su najučestaliji što može značiti da su u populaciji prisutni dulje vrijeme. Oni su ujedno i unutarnji haplotipovi jer imaju više od jedne mutacijske veze. Geografski su šire rasprostranjeni, nalaze se u svakoj od četiriju grupa haplotipova.

S druge strane rijetki haplotipovi i oni koji su u uzorku prisutni jednim haplotipom (rijeka Vit) i jednom sekvencom (singleton Sutla) povezani su s onima kojih ima više. Tako su rijeka Vit i rijeka Sutla prisutne samo u II grupi.

Na temelju analize genske raznolikosti uočena je različita nukleotidna raznolikost (0,0002 – 0,0566). Raznolikost haplotipova je uglavnom niska, a najviša je ona iz rijeka Usore te Kupe i Petrinjčice. U slučaju populacije rijeke Vit genska raznolikost je ekstremno niska te je u čitavom uzorku prisutan samo jedan haplotip. Kod te je populacije vjerojatno došlo do gubitka genske raznolikosti te je ona primjer uskog grla (eng. *bottleneck*), što je pretpostavlja se, posljedica događaja u evolucijskoj prošlosti – moguće je da su ledena doba imala nepovoljan utjecaj na ovu populaciju. Druga potencijalna hipoteza za objašnjenje ovako niske raznolikosti podrazumijeva efekt osnivača, odnosno pretpostavlja da je ova rijeka tek nedavno u evolucijskoj povijesti kolonizirana od strane ove vrste pa se veća raznolikost još nije stigla razviti. Za konačan odgovor na ovo pitanje potrebna su daljnja istraživanja. U svakom slučaju, zbog ekstremno niske genske raznolikosti upitno je hoće li navedena populacija opstati u budućnosti te kako će i hoće li se oduprijeti daljnjim promjenama u okolišu. Najveća genska raznolikost prisutna je kod populacija rijeka Kupe i Petrinjčice, te Save i Usore. S obzirom da su i sve ostale analizirane vrijednosti bile više kod Kupe i Petrinjčice nego kod ostalih lokaliteta, pretpostavlja se da su upravo ti lokaliteti izvor za širenja velikog vijuna na ostale dijelove Balkana te i ovaj rezultat govori u prilog pretpostavci da je Kupa bila jedan od refugija tijekom glacijalnih razdoblja za ovu vrstu.

Genska raznolikost velikog vijuna kao vrste, a osobito intrapopulacijska genska raznolikost pojedinih populacija znatno je niža nego što je utvrđeno za dalmatinske vrste i populacije vijuna (Buj i sur., 2015), koje nisu bile izložene negativnim utjecajima ledenih doba.

Prosječna vrijednost efektivnih veličina populacije različita je između lokaliteta. Međutim, zabrinjavajući je podatak da je na mnogo lokaliteta efektivna veličina populacija vrlo mala. Najmanja efektivna veličina je samo 135 jedinki, koja je procijenjena za populaciju iz rijeke Timok, dok je najveća efektivna veličina procijenjena za rijeke Kupu i Petrinjčicu, što je u skladu s rezultatima dobivenim analizom genskog polimorfizma. Štoviše, smatra se da je genska raznolikost ovisna o razini mutacije i efektivnoj veličini populacije, tj. broju jedinki koje se razmnožavaju u populaciji, tako da populacije male efektivne veličine uglavnom imaju i nisku gensku raznolikost (Sindičić, 2011; Ellegren, 2009a.; Ellegren, 2009b.). Efektivna veličina populacije je pokazala da je ta populacija najstabilnija što dodatno potvrđuje pretpostavku da su Kupa i Petrinjčica izvorišni lokaliteti iz kojih su se rasprostranile i razvile sve ostale populacije velikog vijuna na Balkanu.

Stopa migracije, odnosno prosječan broj migranata koji migriraju je između većine mogućih migracijskih puteva mali. Važno je spomenuti kako je izraženi broj migranata prosječna vrijednost koja obuhvaća razdoblje evolucijske povijesti završno s recentnim razdobljem. Moguće je da su male vrijednosti broja migranata koji migriraju posljedica genetski sličnih populacija, odnosno moguće da je analiza dala veći broj od 0 samo zbog genetske sličnosti između populacija, iako migracije zapravo nisu postojale. Migracije koje se vjerojatno i danas događaju u manjem broju su migracije povezane rijekom Savom, odnosno iz Kupe u Jadar i Vrbanju. Analize migracija između rijeka Vit i Vrbanje te između Dičine i Vrbanje dale su nešto veći prosječan broj migranata, no geografski su nemoguće pa je moguće pretpostaviti da se radi o genetski sličnim populacijama te da migracije nisu nikad postojale. Općenito, protoka gena migracijama gotovo da i nema, što nije čudno s obzirom na ekologiju velikog vijuna, jer gotovo da ne pliva, ne kreće se na veće udaljenosti.

Nastanak vrste procijenjen je za razdoblje od oko 20 (između 16,73 i 23,33) milijuna godina, što odgovara razdoblju prelaska iz miocena u pliocen. Sve divergencije unutar vrste događaju se tijekom pleistocena i vjerojatno su bile posljedica izmjene glacijalnih razdoblja s interglacijalima, odnosno periodičnom povlačenju populacija u povoljnija područja i/ili izumiranju te rekolonizaciji iz refugija nakon glacijala. Tome u prilog idu i ranije pretpostavke nekolicine autora (Banarescu, 1990; Bohlen i Rab, 2001; Ludwig i sur., 2001; Perdices i sur., 2003, Sommerwerk, 2009) o dunavskom bazenu kao području refugija

slatkovodnih riba tijekom perioda glacijacija. Manja područja unutar dunavskog bazena koja su služila kao mikrorefugiji do sada nisu bila identificirana, no za velikog vijuna možemo pretpostaviti kako je to svakako bila rijeka Kupa, s obzirom da su u njoj nađeni predstavnici svih evolucijskih grupa/linija.

Opisana evolucijska povijest velikog vijuna, oblikovana izmjenama glacijala i interglacijala, sasvim je različita od evolucijskih puteva utvrđenih za vijune rasprostranjene u jadranskom slijevu, čija je evolucija započela znatno ranije, a pleistocenske glacijacije na većinu vrsta nisu imale utjecaja (Buj i sur., 2015). Upravo kao odraz različitih evolucijskih povijesti je i različita intraspeicijska struktura velikog vijuna u odnosu na jadranske vrste, unutar kojih uglavnom nije moguće primijetiti intraspeicijsku strukturiranost (Buj i sur., 2015).

Dobivene procjene genske raznolikosti velikog vijuna za većinu rijeka obuhvaćenih ovim istraživanjem bile su niske. Takve vrijednosti najviše su došle do izražaja u velikim rijekama kao što su Timok, Toplica, Jadar, Una te Usora. Opstanak velikog vijuna dovodi se u pitanje s obzirom na malu gensku raznolikost jer takve vrste imaju i slabije izgleda za preživljavanje i odupiranje promjenama u okolišu. Kada se tome još pridoda vrlo niska efektivna veličina populacija utvrđena ovim istraživanjem, jasno postaje kako su djelotvorne mjere zaštite ove vrste hitne i nužne ukoliko se želi osigurati njen dugoročni opstanak.

Uz nisku gensku raznolikost vrsti dodatno prijete različiti uvjeti staništa. Stoga, da se brojnost ne bi dodatno smanjivala, potrebno je na vrijeme razviti mjere zaštite i očuvanja ove vrste te specifičnih staništa koja nastanjuju. Najprije, bilo bi korisno organizirati ihtiološke timove svake države posebno, koji bi razvili i provodili program za monitoring na područjima kritične genske raznolikosti te ih kao takve zaštititi. Unutar tog programa detaljno bi trebalo ispitati stanje svakog od mogućih lokaliteta rasprostranjenosti ove vrste. Između ostalog trebalo bi uključiti mjere očuvanja koje bi smanjile glavne prijetnje kritičnih lokaliteta, ponajprije smanjiti onečišćenje i regulaciju vodotoka iskopavanjem šljunka i pijeska, što se posebno odnosi na sustav rijeke Morave, unutar čijeg se riječnog bazena nalazi Toplica. Naime, rijeka Morava je pred uništenjem (noviput.rs), a eksploatacija šljunka dovela je do narušenog prirodnog izgleda obale što bi moglo dovesti do nestanka velikog vijuna kojem je obalni dio korita i sprudova glavno mjesto razmnožavanja i polaganja jaja. Ukoliko se po tom pitanju ništa ne poduzme, mala je vjerojatnost da će se vrsta oduprijeti tim promjenama.

Ugroženosti velikog vijuna uvelike doprinosi zagađenje staništa, a poznat je primjer zagađenja lokaliteta rijeke Jadar. Naime, 2014. godine teški metali, poput antimona, cinka, arsena i žive iz oštećenog jalovišta nekadašnjeg rudnika nanijeti muljem i vodom stigli su do

rijeke (www.klix.ba). Takvi antropogeni utjecaji dovode do ugrožavanja staništa ove vrste. Moguće je da je ova vrsta tada posebno stradala, s obzirom da se hrani prosijavanjem supstrata, a teški metali zajednom s muljem padaju na dno.

Dodatno, česti su primjeri presušivanja rijeka, osobito tijekom sušeg ljeta. Tako je primjerice tijekom ljeta 2013. godine presušila rijeka Dičina što je izazvalo pomor ribe i rakova koji ondje obitavaju (www.blic.rs). Sve češće prirodne katastrofe na populacije velikog vijuna, kao i na mnoštvo drugih vrsta mogu djelovati negativno. Ova prirodna katastrofa nije jedini primjer iscrpljenog stanja rijeke, događale su se tu i ekološke katastrofe. Naime, 2017. godine rijeka Dičina zagađena je nepoznatom tvari što je također izazvalo pomor ribe i rakova (www.telegraf.rs). Usprkos rastućoj ekološkoj svijesti u društvu, ljudska neodgovornost i nepažnja često su uzrok uništenja prirodnih staništa mnogih vrsta. Budući da veliki vijun nastanjuje vrlo jedinstvenu ekološku nišu koju ne može napustiti te je vjerojatno neka druga riba ne može zauzeti, potencijalni nestanak velikog vijuna mogao bi imati posljedice za čitav ekosustav. Rizik je utoliko viši s obzirom da je biologija ove ribe relativno nepoznata, nije lako uočljiva, a nema ni gospodarski značaj.

6. ZAKLJUČAK

- Molekularno filogenetičke analize pokazale su da je veliki vijun (*Cobitis elongata* Heckel & Kner, 1858) filogeografski duboko strukturirana vrsta.
- Utvrđene su četiri genski različite i evolucijski odvojene grupe haplotipova (filogenetske linije). Populacije iz Kupe i Petrinjčice su moguće ancestralne populacije od kojih su se razvile i proširile sve ostale grupe haplotipova dunavskog slijeva.
- Niska intraspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost vjerojatno su posljedica nepovoljnih razdoblja tijekom evolucijske povijesti.
- Relativno male vrijednosti efektivnih veličina većine istraživanih lokaliteta govore da je vrsta osjetljiva na promjene u okolišu što dovodi u pitanje opstanak vrste i pojedinih populacija.
- Niske stope migracija, kao i broj migranata između populacija, ukazuju da protoka gena gotovo da i nema. Dodatno, o malom protoku gena moguće je zaključiti i na temelju ekologije ove vrste – aktivno gotovo da i ne pliva, pokreće se strujama rijeka.
- Nastanak ancestralne grupe haplotipova i odvajanje ostalih grupa nastupilo je u geološkom razdoblju pleistocena.
- S obzirom da je veliki vijun najviše ugrožen radi eksploatacije pijeska i šljunka, potrebno je razviti mjere koje će to zabraniti ili barem ograničiti. Uz to, potrebno je zabraniti nepotrebna kanaliziranja rijeka te gradnju umjetnih korita kako bi se ova vrsta mogla nesmetano razmnožavati.

7. POPIS LITERATURE

Abramović-Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Herak Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Avice J.C. (1998): The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371–379.

Avice J. C. (2000): Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Banarescu P. (1990): Zoogeography of Fresh Waters, Vol 1. General Distribution and Dispersal of Freshwater Animals. Wiesbaden: Aula – Verlag.

Băsescu M. (1961): Contribution à la systématique du genre *Cobitis* description d'une espèce nouvelle, *Cobitis calderoni*, provenant de l'Espagne. *Rev. Roum. Biol.* 4: 435–438.

Bermingham E., Moritz C. (1998): Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367–369.

Bianco P. G. (1998): Diversity of Barbinae fishes in southern Europe with description of a new species (Cyprinidae). *Italian Journal of Zoology* 65 (Suppl.): 125–136.

Bohlen J., Rab P. (2001): Species and hybrid richness in spined loaches of the genus *Cobitis* (Teleostei: Cobitidae), with a checklist of European forms and suggestion for conservation. *Journal of Fish Biology* 59 (Suppl. A): 75–89.

Božilova E. (2011): Flow model of the Yantra river, Bulgaria. Conference: XXV conference of the Danubian countries, Budapest, Hungary, 16-17 June 2011.

Boykin L. M., Kubatko L. S., Lowrey T. K. (2010): Comparison of methods for rooting phylogenetic trees: A case study using *Orcuttieae* (Poaceae: Chloridoideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 687–700.

Buj I. (2010): Taksonomski položaj, filogenetski odnosi i morfološka obilježja roda *Cobitis* (Cypriniformes; Actinopterygii) Dalmacije i Hercegovine. Doktorski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

- Buj I., Radek Š., Marčić Z., Čaleta M., Mrakovčić M. (2014): Combining Morphology and Genetics in Resolving Taxonomy - A Systematic of Spined Loach (Genus *Cobitis*, Cypriniformes, Actinopterygii) in the Adriatic Watershed. *Plos One* 9 (6).
- Buj I., Čaleta M., Marčić Z., Šanda R., Vukić J., Mrakovčić M. (2015): Different Histories, Different Destinies—Impact of Evolutionary History and Population Genetic Structure on Extinction Risk of the Adriatic Spined Loaches (Genus *Cobitis*; Cypriniformes, Actinopterygii). *Plos One* 10 (7).
- Culling M.A., Lozano Valero I., Cote M. (2003): Substratum Preferences and Diel Activity Patterns of Spined Loach *Cobitis taenia* in England: implication for Conservation Management. *Folia Biol. (Krakow)* 51 (Suppl.): 129–133.
- Čaleta M., Buj I., Mrakovčić M., Mustafić P., Zanella D., Marčić Z., Duplić A., Mihinjač A., Katavić I. (2015): Hrvatske endemske ribe. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb.
- Delić A., Bučar M., Kučinić M., Mihoci I., Vilenica M., Kiš-Novak D., Dolenc Z. (2014): Contribution to the morphology of the Balkan Loach, *Cobitis elongata* Heckle & Kner, 1858 in Croatia. *Nat. Croat.*, 23 (1): 15–25, Zagreb.
- Doadrio I., Perdices A. (2005): Phylogenetic relationships among the Ibero-African cobitids (*Cobitis*, Cobitidae) based on cytochrome *b* sequence data. *Molecular Phylo. Evol.* 37: 484–493.
- Drummond A. J., Suchard M. A., Xie D., Rambaut A. (2012): Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973.
- Efron B., Gong G. (1983): A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *Amer. Statistician* 37: 36–48.
- Ellegren H. (2009a): The different levels of genetic diversity in sex chromosomes and autosomes. *Trends Genet.* 25 (6): 278–284.
- Ellegren H. (2009b): Is genetic diversity really higher in large populations? *Journal Biology* 8(41): 1–3.
- Emerson B.C., Hewitt G.M. (2005): Phylogeography. *Current Biology* 15 (10): 367–71.
- Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. (2002): *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge University Press. Cambridge.

- Freyhof J., Kottelat M. (2008): *Cobitis elongata*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Frickhinger K. A. (1991): Fossilienatlas Fische. Melle: Verlag für Natur- und Heimtierkunde.
- 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.
- Heckel J., Kner R. (1858): Die Süßwasserfische des Österreichischen Monarchie. Leipzig. Verlag Von Wilhelm. Engelmann, pp. 388.
- Hewitt G.M., Butlin R.K. (1997): Causes and consequences of population structure. In: Krebs J, Davies, N, eds. Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach. Oxford: Blackwell, 350–372.
- Hewitt G. M. (1999): Post-glacial re-colonization of European biota. Biological Journal of the Linnean Society 68: 87–112.
- Hewitt G. M. (2001): Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. Mol. Ecol. 10: 537–549.
- Hoelzel A. R. (2018). Molecular Ecology. Encyclopedia of Marine Mammals, 613–618.
- Hwang U. W., Kim W. (1999): General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. The Korean journal of parasitology 37: 215–228.
- Ivelić D., Jablan I., Svjetličić S., Piria M. (2007): O vijunu u rijeci Savi. Ribarstvo. 65 (3): 99–110.
- Kinene T., Wainaina J., Maina S., Boykin L. M. (2016): Rooting Trees, Methods for. U: Kliman, R. M. (ed.): Encyclopedia of Evolutionary Biology 3: 489–493. Oxford: Academic Press.
- Kottelat M., Freyhof J. (2007): Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Cambridge, UK.
- Librado P., Rozas J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451–1452.
- Lipscomb D. (1998): Basics of Cladistic Analysis. George Washington University, Washington D.C.

Ludwig A., Bohlen J., Wolter C. & Pitra C. (2001): Phylogenetic relationships and historical biogeography of spined loaches (Cobitidae, *Cobitis* and *Sabanejewia*) as indicated by variability of mitochondrial DNA. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 131 (3): 381–392.

Mičetić V., Bučar M., Ivković M., Piria M., Krulik I., Mihoci I., Delić A., Kučinić M. (2008): Feeding ecology of *Sabanejewia balcanica* and *Cobitis elongata* in Croatia. *Folia Zool.* 57 (1-2): 181–190.

Mount D.W. (2001): *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, 564 pp.

Mrakovčić M., Brigić A., Buj I., Čaleta M., Mustafić P., Zanella D. (2006): *Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske*. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

Mrakovčić M., Duplić A., Mustafić P., Marčić Z. (2008): Conservation of the genus *Cobitis* and related genera in Croatia. *Folia Zool.* 57 (1): 35–41.

Nakhleh L., Warnow T., Ringe D., Evans S. N. (2005): A comparison of phylogenetic reconstruction methods on an Indo-European dataset. *Transactions of the Philological Society*, 103 (2): 171–192.

Nalbant T. T., Rab P., Bohlen J., Saitoh K. (2001): Evolutionary success of the loaches of the genus *Cobitis* (Pisces: Ostariophysi: Cobitidae). *Travaux du Museum National d'Historie Naturelle „Grigore Antipa“* 43: 277–289.

Narodne novine 70/05, 139/08, 57/11 i 80/13. Zakon o zaštiti prirode.

Patwardhan A., Ray S., Roy A. (2014): Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology* 2: 131.

Pehlivanov L., Uzunova E., Pavlova M. (2009): Ichthyofauna of the Vit River (Danube Basin): Composition, Distribution and Conservation Significance, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 23 (Suppl. 1): 337–340.

Perdices A., Doadrio I. (2001): The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Mol Phylo. Evol.* 19 (3): 468–478.

- Perdices A., Doadrio I., Economidis P. S., Bohlen J. & Bănărescu, P. (2003): Pleistocene effects on the European freshwater fish fauna: double origin of the cobitid genus *Sabanejewia* in the Danube basin (Osteichthyes: Cobitidae). *Molecular Phylo. Evol.* 26 (2): 289–299.
- Perdices A., Vasil'eva E. & Vasil'ev V. (2014): From Asia to Europe across Siberia: phylogeography of the Siberian spined loach (Teleostei, Cobitidae). *Zoologica Scripta*, 44 (1): 29–40.
- Perea S., Böhme M., Zupančič P., Freyhof J., Šanda R., Özuluğ M., Abdoli A. & Doadrio I. (2010): Phylogenetic relationships and biogeographical patterns in Circum-Mediterranean subfamily Leuciscinae (Teleostei, Cyprinidae) inferred from both mitochondrial and nuclear data. *Evolutionary Biology*. 10: 265.
- Posada D., Crandall K. A. (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 37–45.
- Rambaut A. (2012): Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: FigTree [Online].
- Robotham P.W.J. (1982): An analysis of a specialised feeding mechanism of the spined loach, *Cobitis taenia* (L.), and a description of the related structures. *J. Fish. Biol.* 20: 173–181.
- Sawada Y. (1982): Phylogeny and zoogeography of the superfamily Cobitidae (Cyprinoidei, Cypriniformes). *Mem. Fac. Fisher. Hokaido Univ.* 28: 65–223.
- Sindičić M. (2011): Genska raznolikost populacije risa (*Lynx lynx*) iz Hrvatske. Doktorski rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Sommerwerk N., Hein T., Schneider-Jakoby M., Ostojić A., Siber R., Bloesch J., Paunović M., Tockner K. (2009): The Danube river basin. U: *Rivers od Europe* (ur. Tockner K, Uehlinger U, Robinson CT). Elsevier, London, 700 pp.
- Suchard M.A., Lemey P., Baele G., Ayres D.L., Drummond A.J., Rambaut A. (2018): Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 *Virus Evolution* 4.
- Swofford D.L. (2002): PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4 [Computer software and manual]. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Treer T., Sprem N., Torcu-Koc H., SunY., Piria M. (2008): Length-weight relationships of freshwater fishes of Croatia. *J. Appl. Ichthyol.* 24: 626–628.

Vasil'eva E.D. (2000): Sibling species in the genus *Cobitis* (Cobitidae, Pisces). *Folia Zool.*, 49 (Suppl. 1): 23–30.

Xiong J. (2006): *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press, Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York. The Edinburgh Building, Cambridge, UK.

Web izvori:

Slika 1a - <https://www.fishbase.de/> (2. 9. 2018.)

Slika 2 - <http://www.fishbase.se/photos/> (25. 1. 2019.)

Slika 3 - <https://www.iucnredlist.org> (8. 9. 2018.)

<https://bs.wikipedia.org> (20. 11. 2018.)

<http://jadran.izor.hr> (20. 11. 2018.)

Opis područja istraživanja:

<http://www.enciklopedija.hr> (5. 12. 2018.)

<https://www.dinarskogorje.com> (5. 12. 2018.)

<https://www.dinarskogorje.com> (5. 12. 2018.)

<http://www.enciklopedija.hr> (22. 11. 2018.)

<http://www.klanjec.hr> (22. 11. 2018.)

<http://www.panacomp.net> (22. 11. 2018.)

<https://www.icpdr.org> (25. 1. 2019.)

<http://www.dedi.si> (22. 11. 2018.)

<http://www.bistrobih.ba> (23. 11. 2018.)

<http://turizamrs.org> (23. 11. 2018.)

<https://sr.wikipedia.org> (23. 11. 2018.)

<https://en.wikipedia.org> (23. 11. 2018.)

<https://www.b92.net> (25. 11. 2018.)

<http://www.enciklopedija.hr> (25. 11. 2018.)

<http://www.koreni.rs> (25. 11. 2018.)

<http://timok.net> (25. 11. 2018.)

<https://www.telegraf.rs> (26. 11. 2018.)

<http://planine.net> (26. 11. 2018.)

<http://www.mbio.ncsu.edu> (5. 9. 2018.)

<http://noviput.rs> (12. 12. 2018)

<https://www.klix.ba> (23. 11. 2018.)

<https://www.blic.rs> (23. 11. 2018.)

<https://www.telegraf.rs> (23. 11. 2018.)

Životopis

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Petra Nemeč

Datum i mjesto rođenja: 25. 1. 1994., Koprivnica

E – mail adresa: nemecpetra17@gmail.com

OBRAZOVANJE

- Diplomski studij ekologije i zaštite prirode, Biološki odsjek; Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (rujan 2016. – sada)
- Preddiplomski studij biologije; Odjel za biologiju, Sveučilište J.J. Strossmayera, Osijek (2012. – 2016.)
- Gimnazija Fran Galović, Koprivnica (2008. – 2012.)

VANNASTAVNI PROGRAM

- Sudjelovanje u organizaciji popularno-znanstvene manifestacije „Noć biologije“ (2018.)
- Sudjelovanje na studentskoj izložbi fotografija Odjela za biologiju u Osijeku (2015.)
- Sudjelovanje u akciji spašavanja vodozemaca od stradavanja na prometnicama Koprivničko-križevačke županije (2008. – 2012.)
- Volonterski rad u davanju instrukcija djeci osnovnoškolskog uzrasta (2008. – 2012.)