

Molekularna filogenija i populacijska genetika bodorki (rod *Rutilus*; Actinopteri) u Hrvatskoj

Žigrović, Dora

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:217:936900>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dora Žigrović

**Molekularna filogenija i populacijska genetika bodorki (rod *Rutilus*;
Actinopteri) u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za zoologiju kralješnjaka na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Buj. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

ZAHVALA

Veliko hvala dragoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Buj na dobroti koju mi je pružila te na strpljenju i vremenu kojeg je uložila u izradu rada. Hvala doc. dr. sc. Zoranu Marčiću na pomoći oko izrade karte i trudu. Hvala asistenticama Luciji Ivić i Luciji Raguž koje su kroz cijeli ovaj period bile uvijek na raspolaganju, pomagale i maksimalno se trudile kako u labosu, tako i izvan njega i bile super društvo.

Hvala mojim curkama uz koje su studentski dani bili još ljepši, hvala Bruni i cijeloj mojoj obitelji, a posebno roditeljima koji su bili moja najveća podrška tijekom cijelog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekularna filogenija i populacijska genetika bodorki (rod *Rutilus*; Actinopteri) u Hrvatskoj

Dora Žigrović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Od ukupno četiri vrste roda *Rutilus* (*Rutilus basak* (Heckel, 1843), *Rutilus aula* (Bonaparte, 1841), *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), *Rutilus virgo* (Heckel, 1852)) koje možemo pronaći u Hrvatskoj, čak tri vrste (*Rutilus basak*, *Rutilus aula* i *Rutilus virgo*) su endemi. Iako vrste ovog roda nemaju nikakav status ugroženosti u Hrvatskoj, svojom brojnošću u sporim tekućicama i mirnim vodama itekako pridonose pravilnom funkcioniranju ekosustava. Cilj provedenog istraživanja bio je: objasniti srodstvene odnose pojedinih populacija i vrsta bodorki (rod *Rutilus*) u Hrvatskoj, ujedno i procijeniti evolucijska vremena divergencije pojedinih vrsta, opisati intraspecijsku i intrapopulacijsku gensku raznolikost, interspecijsku gensku različitost te u konačnici procijeniti efektivnu veličinu populacija i broj migranata po generaciji. Kako bi se utvrdili srodstveni odnosi među bodorkama u Hrvatskoj i njihov filogenetski položaj, filogenetska rekonstrukcija temeljena je na sekvencama za citokrom b (*cyt b*) pomoću tri metode: najveća parsimonija (MP), najveća vjerojatnost (ML) i metoda susjednog sparivanja (MJ). Dobivena filogenetska stabla i mreža potvrdili su razdvajanje svih četiri vrsta - vrste *Rutilus rutilus* u zasebnu liniju, kao i *Rutilus virgo* te odvajanje vrste *Rutilus aula* od vrste *Rutilus basak*. Prema dobivenoj procjeni, divergencija unutar roda *Rutilus* započela je u miocenskoj epohi i trajala je do pleistocenske epohe. Utvrđena je umjerena genska raznolikost vrste *Rutilus aula*, a visoka vrste *Rutilus basak*, a statistički testovi genske različitosti pokazali su genski iste populacije vrste *Rutilus aula*, a nešto različite vrste *Rutilus basak*. Procijenjene su male efektivne veličine populacija i nedostatak migracija među populacijama vrste *Rutilus aula*, dok su za vrstu *Rutilus basak* efektivne veličine nekih populacija veće, a nekih populacija manje uz migriranje jedinki između pojedinih populacija. Dobiveni rezultati mogli bi se koristiti kao podloga za daljnja istraživanja vrsta roda *Rutilus* u Hrvatskoj, ali i razmatranju njihovog statusa ugroženosti, kao i zaštite.

(49 stranica, 23 slike, 8 tablica, 48 literaturnih navoda, jezik izvornik: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Rutilus*, filogenija, genska raznolikost, efektivna veličina populacije, evolucijska povijest

Voditelj: doc. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelj: doc. dr. sc. Ivana Buj

doc. dr. sc. Ivan Radosavljević

doc. dr. sc. Duje Lisičić

Rad prihvaćen: 5. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Molecular phylogeny and population genetics of roaches (genus *Rutilus*; Actinopteri) in Croatia

Dora Žigrović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Out of four species of genus *Rutilus* (*Rutilus basak* (Heckel, 1843), *Rutilus aula* (Bonaparte, 1841), *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), *Rutilus virgo* (Heckel, 1852) which can be found in Croatia, three species (*Rutilus basak*, *Rutilus aula* and *Rutilus virgo*) are endems. Although species of this genus have no threat status in Croatia, density of their populations in slow streams and still waters contributes proper functioning of the ecosystems. The aim of this study was to: describe phylogenetic relationships of individual populations and species of the genus *Rutilus* in Croatia, evaluate the evolutionary time periods of divergences of species of the genus *Rutilus*, describe intraspecific and intrapopulation genetic diversity, interspecific genetic differentiation and in the end evaluate their effective sizes and number of migrants per generation. To determine relations between roaches found in Croatia and their phylogenetic position, phylogenetic reconstruction based on cytochrome *b* (*cyt b*) sequences was conducted using following methods: maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and median joining (MJ). Phylogenetic trees and network revealed the separation of all four species – separation of *Rutilus rutilus* and *Rutilus virgo* and separation *Rutilus basak* from *Rutilus aula*. According to the estimate, divergence within the genus *Rutilus* began in the miocene and lasted until pleistocene epoch. Moderate genetic diversity of *Rutilus aula* and high of *Rutilus basak* are determined, furthermore statistic tests of genetic differentiation indicate the same genetic population of *Rutilus aula* and a little bit different populations in *Rutilus basak*. Small effective sizes and no migrations were estimated within populations of *Rutilus aula* and higher effective sizes of *Rutilus basak* populations with migrations between some populations. The results could be used in further researches of the genus *Rutilus* in Croatia, but also in consideration of their conservation status as well as protection.

(49 pages, 23 figures, 8 tables, 48 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Rutilus*, phylogeny, genetic diversity, effective population size, evolutionary history

Supervisor: doc. dr. sc. Ivana Buj

Reviewers: doc. dr. sc. Ivana Buj

doc. dr. sc. Ivan Radosavljević

doc. dr. sc. Duje Lisičić

Thesis accepted: 5 September 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Slatkovodna ihtiofauna Hrvatske	1
1.2. Osnovne značajke roda <i>Rutilus</i>	2
1.3. Primjena suvremenih metoda molekularne filogenije i populacijske genetike u istraživanjima ribljih populacija	6
1.3.1. Osnovna načela molekularne filogenije i populacijske genetike	6
1.3.2. Molekularni genski markeri i filogenetska rekonstrukcija.....	7
1.4. Cilj istraživanja	9
2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA	10
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Uzorkovanje	22
3.2. Laboratorijski postupci (izolacija DNA, lančana reakcija polimerazom (PCR), sekvenciranje).....	22
3.3. Filogenetska rekonstrukcija.....	24
3.4. Evolucijska povijest roda <i>Rutilus</i> u Hrvatskoj	25
3.5. Intrapopulacijska i intraspecijska genska raznolikost i interspecijska genska različitost	25
3.6. Procjena efektivne veličine populacija i broja migranata po generaciji.....	26
4. REZULTATI.....	28
4.1. Filogenetska rekonstrukcija.....	28
4.2. Vrijeme divergencije vrsta roda <i>Rutilus</i> i evolucijskih linija u Hrvatskoj	32
4.3. Intrapopulacijska i intraspecijska genska raznolikost i interspecijska genska različitost	33
4.4. Procjena efektivne veličine populacija i broja migranata po generaciji.....	35
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČAK	43
7. LITERATURA	44
8. ŽIVOTOPIS	49

1. UVOD

1.1. Slatkovodna ihtiofauna Hrvatske

Unatoč tome što su brojem vrsta i raznolikošću ribe dominantni kralješnjaci na Zemlji, još uvijek su najmanje istražene (Maitland, 2000), a smatraju se ujedno i najugroženijom skupinom kao posljedica antropogenog utjecaja. Posebno se ističu slatkovodne ribe koje čine oko 40% vrsta riba, a žive samo na 1% površine Zemlje. Obzirom da Europa broji oko 560 slatkovodnih vrsta riba, Hrvatska je zemlja koja se zbog geografskog položaja, geološke prošlosti te prisutnosti dva riječna sustava (jadranski i crnomorski) na relativno malom području, itekako može pohvaliti izuzetnim bogatstvom i raznolikošću slatkovodne ihtiofaune, što ju svrstava u sam vrh Europe, odmah iza Turske. Od otprilike 140 slatkovodnih svojti koje nalazimo u Hrvatskoj, 52 vrste su endemi (Ćaleta i sur. 2015), a 21 vrsta boravi i u slanim i boćatim vodama. Crnomorski (dunavski) slijev površine 35 132 km² (Mrakovčić i sur. 2006) nastanjuje 87 ribljih svojti - 67 autohtonih i 20 alohtonih vrsta (Ćaleta i sur. 2015), dok u jadranskom slijevu površine 21 405 km² (Mrakovčić i sur. 2006) živi 80 vrsta, od kojih je 10 alohtonih i 13 prenesenih iz crnomorskog slijeva (Ćaleta i sur. 2015). Razlog sličnosti broja vrsta dvaju sljevova unatoč razlici u površini, leži u tome što su rijeke jadranskog slijeva procesom specijacije postale kratke i izolirane, u odnosu na rijeke crnomorskog slijeva, što je za posljedicu imalo razvitak velikog broja endemskih ribljih vrsta i podvrsta (Mrakovčić i sur. 1995) jer je dolazilo do specijacije uslijed geografske izolacije.

1.2. Osnovne značajke roda *Rutilus*

Ribe nisu taksonomska skupina, već obuhvaćaju više razreda, od kojih je razred Actinopteri (zrakoperke) najbrojniji, a kojem pripada rod *Rutilus*. Po novoj sistematici ovaj rod se ubraja u porodicu Leuciscidae, a ne Cyprinidae kao što se do sada smatralo te u red Cypriniformes.

Jedan od vrstama najbogatijih redova unutar razreda zrakoperki (Actinopteri) je red šaranki (Cypriniformes). Vrste ovog reda naseljavaju sve kontinente, osim Australije i Južne Amerike, najbrojnije su u jugoistočnog Aziji (Schönhuth i sur. 2018), a većina slatkovodnih riba u Hrvatskoj ubraja se upravo u ovaj red (Mrakovčić i sur. 2008). Karakteristike koje ih odlikuju su ljuske na tijelu, glava gotovo uvijek bez ljusaka, duguljasta i pruživa gornja čeljust, nedostatak zubi u čeljustima umjesto kojih imaju ždrijelne zube (perforirani peti škržni luk) čija je funkcija drobljenje hrane, nedostatak masne peraje i prisutnost tri branhiostegalne šipčice (Nelson, 2006).

Porodica Leuciscidae jedna je od vrstama najbogatijih porodica reda šaranki. Vrste karakterizira kratka leđna peraja čija nerazgranata šipčica nije nazubljena ni nalik bodlji, ždrijelni su zubi raspoređeni u jedan ili dva reda i nedostatak brčića (Kottelat i Freyhof 2007).

Rod *Rutilus* uključuje ribe srednje do velike duljine tijela koje naseljavaju nizinske rijeke i jezera (Kottelat i Freyhof 2007). Najveća raznolikost vrsta ovog roda je u Palearktičkoj regiji (Bianco i sur. 2004), i to konkretno u dinarskom području, dok njihova taksonomija još uvijek nije sasvim riješena i razjašnjena. Ekološka raznolikost ovog roda kreće se od dobro poznatih euritopnih vrsta sve do neistraženih specijaliziranih vrsta. Vrlo su važna karika hranidbenih mreža jer svojom brojnošću u rijekama i jezerima značajno pridonose sveukupnom funkcioniranju ekosustava. Zbog morfoloških sličnosti vrsta roda *Rutilus*, pri njihovoj identifikaciji često i vrlo lako može doći do donošenja krivih zaključaka, stoga je determinacija prilično komplicirana, a razlikovanje vrsta otežano, posebice kada se jedinke različitih vrsta nalaze na istom lokalitetu (Kottelat i Freyhof, 2007). Ono što je zajedničko većini vrsta roda *Rutilus* jest prehrana koju čine detritus, alge, planktonski organizmi i manji vodeni beskralješnjaci (Mrakovčić i sur. 2006). Od ukupno 13 vrsta roda *Rutilus* (Kottelat i Freyhof, 2007), u Hrvatskoj žive čak 4 vrste, od kojih *Rutilus virgo* (Heckel, 1852) i *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) u crnomorskom slijevu te *Rutilus aula* (Bonaparte, 1841) i *Rutilus basak* (Heckel, 1843) u jadranskom slijevu (Jelić i sur. 2008).

Taksonomija roda *Rutilus*:

Carstvo: Animalia (životinje)

Koljeno: Chordata (svitkovci)

Razred: Actinopteri (zrakoperke)

Red: Cypriniformes (šaranke)

Porodica: Leuciscidae (bjelice)

Potporodica: Leuciscinae

Rod: *Rutilus* Rafinesque, 1820

Masnica (*Rutilus aula* (Bonaparte, 1843))

Masnica je autohtona, strogo zaštićena i ujedno endemska vrsta jadranskog slijeva (Ćaleta i sur. 2015). Prema IUCN-ovom statusu u Hrvatskoj spada u kategoriju gotovo ugrožena (NT), dok je na Crvenom popisu IUCN-a u kategoriji najmanje zabrinjavajuća vrsta (LC). Nastanjuje Italiju od sjevera prema jugu, južni dio Švicarske i jadranski slijev Slovenije i Hrvatske. Uzroci njene ugroženosti su izuzetna osjetljivost na uništavanje staništa, onečišćenje voda i unos invazivnih vrsta. Radi se o manjoj ribi ukupne duljine tijela do 20 cm, visokog tijela i male glave s očima crvenkaste boje. Plavkastosivog do srebrnkastog je obojenja s tamnoplavom prugom koja se proteže duž bokova tijela iznad bočne pruge, što ju razlikuje od drugih vrsta ovog roda (Slika 1). U drugoj ili trećoj godini života dostiže spolnu zrelost, pri čemu se za vrijeme mrijesta pojavljuju mrijesne kvržice (Mrakovčić i sur. 2006), a može živjeti do 7 godina (Kottelat i Freyhof, 2007). Preferira jezera i bare, ali može se pronaći i u sporim tekućicama obraslima vegetacijom (Mrakovčić i sur. 2006).



Slika 1. Masnica, *Rutilus aula* (foto: P. Zupančič)

Basak (*Rutilus basak* (Heckel, 1843))

Basak je endem jadranskog slijeva koji uz Hrvatsku naseljava još i Bosnu i Hercegovinu. Na Crvenoj listi IUCN-a ima status najmanje zabrinjavajuće vrste (LC), a u Hrvatskoj mu je IUCN status gotovo ugrožena (NT) (Ćaleta i sur. 2015). Također je, kao i masnica, osjetljiv na onečišćenja vode te fragmentaciju i smanjenje staništa. Srebrnkastosive je boje, ukupne duljine do 18cm, tijelo mu je vretenasto i bočno spljošteno, kod odraslih jedinki visoko, glava kratka (Ćaleta i sur. 2015) sa zašiljenim rostrumom i velikim očima, leđna peraja ima dužu osnovu od podrepne peraje i ujedno počinje iznad trbušnih (Slika 2). Spolnu zrelost dostiže u drugoj ili trećoj godini, a u vrijeme mrijesta pojavljuju se mrijesne kvržice te također živi u stajaćicama i sporim tekućicama obraslima vegetacijom (Mrakovčić i sur. 2006).



Slika 2. Basak, *Rutilus basak* (foto: P. Mustafić)

Bodorka (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758))

Bodorka je na Crvenom popisu IUCN-a u kategoriji najmanje zabrinjavajuće vrste (LC). Vrlo je česta i prilagodljiva vrsta koja od Pireneja do Urala nastanjuje različita staništa - od potoka i jezera, do manjih i velikih rijeka. Duljine je oko 30 cm, sivozelenkaste boje s prepoznatljivim crvenkastim obojenjem pri kraju peraja (Slika 3.). Spolnu zrelost dostiže s dvije do tri godine, tijekom mrijesta se javljaju mrijesne kvržice, a može živjeti čak do 13 godina (Kottelat i Freyhof 2007).



Slika 3. Bodorka, *Rutilus rutilus* (foto: P. Mustafić)

Plotica (*Rutilus virgo* (Heckel, 1852))

Plotica je endem dunavskog slijeva, na Crvenom popisu IUCN-a spada u kategoriju najmanje zabrinjavajuće vrste (LC), dok je u Hrvatskoj gotovo ugrožena (NT). Živi u gornjem i srednjem toku Dunava, u pritocima Tise u Rumunjskoj, a najzastupljenija je u porječju rijeke Save. Rastom je velika riba čija duljina može biti i do 40 cm, tijelo joj je bočno spljošteno i izduženo, ima malenu glavu s tupom gubicom, debelim usnama i malenim očima. S leđne strane tijelo je tamnozelenog obojenja, s trbušne plavozelenog, dok su prsne peraje žutobijele, a podrepna i trbušne narančastocrvene boje (Slika 4.). Spolno sazrijeva u trećoj godini života, a za vrijeme mrijesta jedinke se skupljaju u jata, ulaze u pritoke i rukavce s bržim protokom vode i bujnom vegetacijom kako bi ženka mogla odložiti jaja te se za vrijeme mrijesta mužjacima pojavljuju mrijesne kvržice. Smatra se da je osjetljiva na onečišćenje voda i regulacije vodotoka, a upravo zato što je migratorna vrsta pregradnja rijeka za ploticu predstavlja jednu od najvećih prijetnji (Čaleta i sur. 2015).



Slika 4. Plotica, *Rutilus virgo* (foto: J. Gregori)

1.3. Primjena suvremenih metoda molekularne filogenije i populacijske genetike u istraživanjima ribljih populacija

1.3.1. Osnovna načela molekularne filogenije i populacijske genetike

Sličnost bioloških funkcija i molekularnih mehanizama u živim bićima čvrsto sugeriraju da su vrste potekle od zajedničkog pretka. Molekularna filogenija (filogenetika) je znanstvena disciplina koja koristi strukturu, funkciju i promjenu molekula kroz vrijeme kako bi prikazala evolucijske i srodstvene odnose među vrstama (Dowell 2008).

Populacijska genetika je područje biologije koje se bavi proučavanjem genske strukture prirodnih populacija i njihovih promjena koje proizlaze iz djelovanja različitih čimbenika (Okasha 2008), kao što su: veličina populacije, načini razmnožavanja, geografska rasprostranjenost organizama, mutacije, migracije i prirodna selekcija. Pošto je faktora mnogo, a ujedno su i u složenim interakcijama, za objašnjavanje pojedinih faktora koriste se različiti modeli. Populacijska genetika je zapravo primjena Mendelovih zakona i drugih genetičkih principa na cijeloj populaciji organizama. Uključuje proučavanje genetičke varijacije unutar i između vrsta i pokušava razumjeti proces koji rezultira adaptivnom radijacijom vrsta kroz vrijeme (Hartl i sur. 1997).

1.3.2. Molekularni genski markeri i filogenetska rekonstrukcija

Molekularni markeri (tip markera korišten u ovom istraživanju), predstavljaju fragmente DNA koji na temelju DNA analize omogućuju razlikovanje pojedinih genotipova (Collard i sur. 2004). Mitohondrijska DNA (mtDNA) kružna je dvolančana molekula DNA s mutacijama češćim do 20 puta nego u jezgrinoj DNA, u njoj se ne događa rekombinacija, po stanici broji 1000-100 000 kopija, pa ju je time lakše izolirati iz starih uzoraka, a za razliku od jezgrine DNA koja se nasljeđuje od oba roditelja, mtDNA se nasljeđuje samo od majke (Berg i sur. 2013). Navedene karakteristike čine mtDNA idealnim markerom za istraživanja u evoluciji, posebno za istraživanja intraspecijskih i populacijskih struktura (Zhang i Hewitt 1996).

U filogenetskim istraživanjima najčešće korišteni markeri su mitohondrijski markeri: gen za citokrom b (*cyt b*), kontrolna regija (CR), citokrom oksidaza I/II (CO I/II) i 12S rRNK (Patwardhan i sur. 2014). Citokrom b (*cyt b*) igra ključnu ulogu u mitohondrijima gdje pretvara energiju kako bi je stanica mogla efikasno iskoristiti i sudjeluje u oksidativnoj fosforilaciji (Cooper i sur. 2000). Upravo zato što je citokrom b visoko konzerviran, jedan je od najpouzdanijih genskih markera za istraživanje evolucijskih veza bliskih taksonomskih jedinica (Nei i Kumar 2000).

Filogenetska stabla i filogenetske mreže dobivaju se postupcima filogenetske rekonstrukcije. Izrađuju se od haplotipskih sekvenci korištenjem neke od filogenetskih metoda (metoda najveće parsimonije, metoda najveće vjerojatnosti, Bayesova metoda, metoda susjednog sparivanja). Filogenetska rekonstrukcija se preporuča korištenjem više metoda jer korištenjem samo jedne metode postoji mogućnost prikaza nedovoljno dobrih rezultata ili rezultata različitih od onih dobivenih drugim metodama, što je posljedica matematičkih analiza na kojima se temelje modeli. Stoga, treba uzeti u obzir i objasniti rezultate dobivene korištenjem više metoda jer se ni jedna metoda zasebno bez uključenja više njih ne može koristiti kao 100% točna. Međutim, ako su od rezultata dobivenih korištenjem više metoda, rezultati jedne metode uvjerljivo najjasniji, tada se oni mogu koristiti kao najispravniji u ostatku istraživanja (kao što je slučaj u ovom istraživanju). Nadalje, dobivena filogenetska stabla i mreže omogućuju ilustraciju srodstvenih odnosa među organizmima, kao i redosljed specijacijskih događaja koji kontroliraju daljnji tijek evolucije kojima su od ranih predaka nastali današnji potomci (Nei 1986, 1987). Kolika će biti preciznost dobivenih stabala ovisi o tome koliko taksonomske

jedinice uključene u istraživanje odgovaraju povijesti grananja linija, pod uvjetom da nema protoka gena i da preci više nisu prisutni u recentnoj raznolikosti. Ako navedeni uvjeti nisu zadovoljeni, haplotipske sekvence se mogu slagati u filogenetsku mrežu (Emerson i Hewitt 2005). Za razliku od filogenetskog stabla, filogenetska mreža dopušta poprečne veze između vrsta koje su u direktnom srodstvu, uz rekombinaciju, hibridizaciju i lateralni prijenos gena (Nakhleh i sur. 2005, Posada i Crandall 2001)

1.4. Cilj istraživanja

Obzirom na važnost vrsta roda *Rutilus* u hranidbenim mrežama, a istovremeno i nedostatak istraživanja o njihovim srodstvenim odnosima i populacijskoj strukturi u Hrvatskoj, diplomski rad je izrađen kako bi pomogao opisivanju strukture i raznolikosti ovog roda u Hrvatskoj, rasvjetljavanju njegove evolucijske povijesti, ali i mogućem razmatranju statusa ugroženosti vrsta iz istraživanja.

Ciljevi rada su:

1. utvrđivanje srodstvenih odnosa pojedinih populacija i vrsta roda *Rutilus* u Hrvatskoj.
2. procjena evolucijskog vremena divergencije pojedinih vrsta, odnosno evolucijskih linija roda *Rutilus*, u svrhu opisivanja evolucijske povijesti.
3. utvrđivanje intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti, kao i interpopulacijske različitosti.
4. procjena efektivne veličine populacija i broja migranata po generaciji.

2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

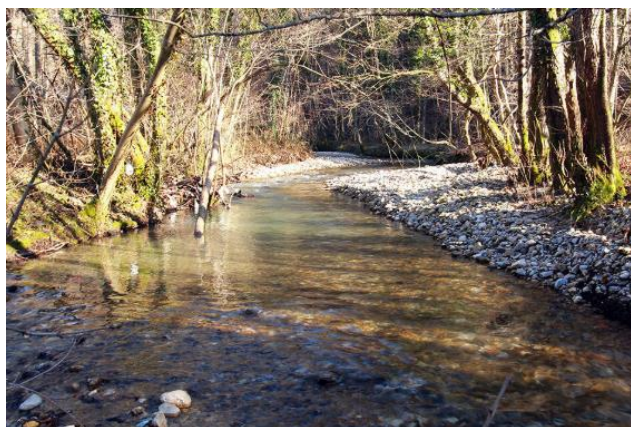
Uzorkovanja vrsta roda *Rutilus* za potrebe istraživanja provedena su u vodotocima jadranskog slijeva, izuzev uzorka s lokaliteta u Bregani (crnomorski slijev) koji je služio za što vjerniji prikaz filogenetskih stabala, ali i kao usporedba za daljnje analize. Radi što uvjerljivijih i točnijih rezultata o evolucijskoj povijesti i srodnosti vrsta roda *Rutilus* u Hrvatskoj, uzorci su sakupljeni s 15 lokaliteta. U nastavku slijedi prikaz lokaliteta na karti Hrvatske s kojih su jedinke uzorkovane uz naziv vrste za koju se, s obzirom na literaturne podatke, pretpostavljalo da nastanjuje pojedini lokalitet (Slika 5.), kratak opis navedenih lokaliteta te tablični popis vrsta s pridruženim lokalitetima na kojima su uzorkovane, brojem sekvenci, kodovima i pridruženim haplotipom (Tablica 1.).



Slika 5. Karta lokaliteta uzorkovanja jedinki vrsta roda *Rutilus*

Bregana

Rijeka Bregana u dijelu srednjeg toka do ušća u Savu, granični je vodotok između Republike Hrvatske i Republike Slovenije. Duljine je 26,02 km, a svojim pritocima tvori dobro razgranatu hidrografsku mrežu. Karakteristike ovog područja koje pripada slivu rijeke Save su uglavnom šumski pokrov (Slika 6.) te strmi obronci koji uzrokuju eroziju, dok su manji dio površine sliva naselja i poljoprivredna zemljišta. Upravo zbog statusa zaštićenosti Bregane radi zaštite prirode, ali i važnosti za očuvanje više vrsta riba (Direktiva o staništima), nužna su upravljanja i briga rijeke Bregane (<https://frisco-project.eu/hr/slivna-podrucja-rijeka/bregana/>).



Slika 6. Rijeka Bregana (izvor: <https://frisco-project.eu/hr/slivna-podrucja-rijeka/bregana/>)

Raša

Rijeka Raša duljinom toka drugi je vodotok na hrvatskom dijelu istarskog poluotoka (<https://www.istrapedia.hr/hrv/819/rasa-rijeka/istra-a-z/>). Duga je 50 km (Benac i sur. 2017), a vodu prima u srednjem toku iz nekoliko stalnih i povremenih krških izvora do kojih voda dolazi iz sliva Pazinskog potoka (Rubinić 1994) (Slika 7.). Erozijska i produkcijska nanosa relativno su visoki zbog izrazito ogoljelih površina u području pritoka rijeke Raše koji teku po terenu oblikovanom u laporima i flišu (Gulam 2012).



Slika 7. Rijeka Raša (izvor: www.istrapedia.hr)

Jadova

Rijeka Jadova je izolirana lička ponornica duga svega 12,5 km (Ćaleta i sur. 2015). Spada u povremene vode (Duplić i sur. 2008), što znači da tijekom ljeta u sušnom razdoblju najvećim dijelom presuši (Ćaleta i sur. 2015) (Slika 8.). Bez obzira na takav vodni režim tijekom godine uz ostale vrste, u njoj živi i stenoendem jadovski vijun (*Cobitis jadovaensis* Mustafić & Mrakovčić, 2008) za kojeg se pretpostavlja da tada preživljava u podzemnim vodama (Mrakovčić i sur. 2008). Jadova je uvrštena na popis Područja očuvanja značajna za vrste i stanišne tipove (POVS).



Slika 8. Rijeka Jadova za vrijeme sušnog razdoblja (izvor: Duplić 2008)

Miljašić Jaruga

Rijeka Miljašić Jaruga nalazi se u Ražanačko-karinskom sjevernokotarskom priobalju. Vodotok se ulijeva u more na području Ninskog zaljeva, a vodni režim je u vrijeme obilnijih padalina bujičnog karaktera (Slika 9.), stoga može doći do plavljenja i erozije (Monitoring 2018).



Slika 9. Rijeka Miljašić Jaruga (izvor: zadarfilmcommision.com)

Vlačine

Jezero Vlačine umjetno je jezero (Slika 10.) koje se nalazi u mjestu Suhovare, u općini Poličnik. Uz floru, na ovom je području značajna i fauna, koja se posebno ističe bogatstvom ptica. Važnost za ciljne vrste svrstava jezero Vlačine u dio ekološke mreže Europske unije – Natura 2000, zaštićeno kao Područje očuvanja značajno za ptice (POP područje) (<http://www.haop.hr/hr>).



Slika 10. Jezero Vlačine (izvor: <https://www.zadarskilist.hr>)

Ruda

Tok rijeke Cetine dijeli se na gornji, srednji i donji. Na gornjem dijelu toka rijeka Ruda se ulijeva u Cetinu, a izvire u selu Ruda u Dalmatinskoj zagori. Glavni izvor rijeke Rude je Velika Ruda koja ima tri pritoka te se koristi za potrebe uzgoja ribe i vodoopskrbe za županiju (Banović 2014). Unatoč tome što je cijela rijeka Ruda pod antropogenim utjecajem, ipak je u svom gornjem dijelu toka stanište za nekoliko ugroženih ribljih vrsta zbog očuvanosti korita i čistoće vode (Slika 11.) (<http://www.dalmatian-nature.hr/znacajni-krajobraz/ruda>). Zbog tih je razloga Ruda zaštićena u kategoriji Značajni krajobraz, ali i unutar Ekološke mreže - Područja očuvanja značajna za vrste i stanišne tipove (POVS) (<http://www.bioportal.hr/gis/>).



Slika 11. Rijeka Ruda (izvor: <http://www.dalmatian-nature.hr/znacajni-krajobraz/ruda>)

Prološko blato

Prološko blato je duboko jezero oko kojeg je poplavno polje (Slika 12.). Stanište je zaštićeno u kategoriji Značajni krajobraz, koje je unatoč antropogenom utjecaju, bogato florom i faunom. Posebno se ističe ihtiofauna koja broji čak nekoliko endema (<http://www.dalmatian-nature.hr/znacajni-krajobraz/prolosko-blato>) koji su razlog svrstavanja Prološkog blata unutar Ekološke mreže na popis Područja očuvanja značajna za vrste i stanišne tipove (POVS) (<http://www.bioportal.hr/gis/>).



Slika 12. Prološko blato (izvor: <http://www.dalmatian-nature.hr/znacajni-krajobraz/prolosko-blatu>)

Vrljika

Rijeka Vrljika (Slika 13.) protječe Imotskim poljem u smjeru od sjeverozapada prema jugoistoku. Iako je okolina pod izrazitim antropogenim utjecajem. Vrljika je unutar Ekološke mreže – Područja očuvanja značajna za vrste i stanišne tipove (POVS) (<http://www.bioportal.hr/gis/>), a njen izvor jedan je od ukupno dva posebna ihtiološka rezervata u Hrvatskoj zbog prisutnosti četiri endemske vrste (Ćaleta i sur. 2015).



Slika 13. Rijeka Vrljika (izvor: Jelić i sur. 2008)

Rastočko polje

Rastočko polje je krško polje koje se nalazi na južnom kraju Dalmatinske zagore, dužine oko 12 kilometara i prosječne širine 1,5 kilometara. Polje se nalazi unutar Ekološke mreže (Natura 2000) te je zbog prisutnosti crvenkrpice (*Elaphe situla* (Linnaeus, 1758)) i vrgoračke gobice (*Knipowitschia croatica* (Mrakovcic, Kerovec, Misetić & Schneider, 1996)) uvršteno u Područja očuvanja značajna za vrste i stanišne tipove (POVS) (<http://natura2000.dzrp.hr/reportpublish/reportproxy.aspx?paramSITECODE=HR2001315>).

Matica

Rijeka Matica je krška ponornica koja izvire i ponire u Vrgorskom polju (Jezero) (Jelić i sur. 2008) (Slika 14.). Zimi preplavi cijelo Jezero, dok ljeti gornji dio rijeke potpuno presuši, pa za vrijeme tog razdoblja ribe vjerojatno žive u podzemlju (Mrakovčić i sur. 2006). Također, u Matici živi čak šest endemskih vrsta riba (Ćaleta i sur. 2015), pa nije ni iznenađujuće što je na listi Područja očuvanja značajna za vrste i stanišne tipove (POVS) Ekološke mreže (<http://www.biportal.hr/gis/>).



Slika 14. Rijeka Matica (izvor: Jelić i sur. 2008)

Baćinska jezera

Baćinska jezera skup su krških, malih i nepravilnih, međusobno povezanih, prirodnih jezera (Slika 15.), smještenih blizu Ploča, na desnoj strani ušća rijeke Neretve. Uvrštena su na popis Područja ekološke mreže s ciljem očuvanja važnih područja za divlje svojte i stanišne tipove gdje se ističu barska i kopnena kornjača te nekoliko endemskih vrsta riba (<https://www.min-kulture.hr>).



Slika 15. Baćinska jezera (izvor: www.bacinskajezera.com)

Modro oko

Modro oko krško je jezerce dubine oko 18 m, koje leži u ponikvi (depresiji) na morskoj razini (Slika 16.). Takva duboka depresija nastala je tektonikom, tj. urušavanjem nekadašnje podzemne šupljine nastale djelovanjem vode koja se onda kasnije napunila vodom (<http://prirodahrvatske.com/jezera/>). Jezerska bočata do slana voda karakteristične je modre boje zbog kombinacije bijelog vapnenca ponikve i refleksije neba (<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=41489>). Modro oko je zaštićeno područje u kategoriji Značajni krajobraz (<http://www.bioportal.hr/gis/>).



Slika 16. Modro oko (izvor: www.nasaneretva.net)

Norin

Rijeka Norin je desna pritoka rijeke Neretve (Slika 17.). Ističe se po tome što je izrazito obilna vodom, stoga se iz njenog izvora vodom opskrbljuje vodovod "Neretva-Pelješac-Korčula-Lastovo" (Štambuk-Giljanović 2000). Norin je stanište mnogih ptica, ali i endemskih vrsta riba (Jelić i sur. 2008).



Slika 17. Rijeka Norin (izvor: Jelić i sur. 2008)

Neretva

Neretva je najveća i najduža rijeka jadranskog slijeva (Slika 18). Od ukupno 203 km, 22 km teče Hrvatskom gdje tvori najveću deltu i najprostraniji močvarni kraj u obalnom dijelu Hrvatske. Jedan je od najbolje sačuvanih močvarnih krajeva u Europi, prostor velike bioraznolikosti (<https://skolski.hrt.hr/emisije/71/neretva>) i jedno od najvažnijih područja za ihtiofaunu i ornitologiju u Hrvatskoj (Jelić i sur. 2008). Delta Neretve je zaštićeni ihtiološko-ornitološki rezervat, na popisu je Područja očuvanja za ptice (POP), kao i Područja očuvanja značajna za vrste i stanišne tipove (POVS).



Slika 18. Neretva (izvor: <https://www.adriatic.hr/hr/vodic/dalmacija-rivijera-usce-neretve/ri-83>)

Kuti

Jezero Kuti dugačko je 2,4 km i leži u razini mora (kriptodepresija) (Slika 19.). Vodu dobiva iz nekoliko vrela na istočnoj obali. Neretvom je povezano rijekama Crna rijeka i Mislina i pod utjecajem morskih mijena Jadranskoga mora. Kada je niski vodostaj tijekom ljeta, u sredini jezera se pojavljuje otočić (<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=34804>).



Slika 19. Jezero Kuti (<https://zastita-prirode-dnz.hr/zastita-mocvarnog-podrucja-kuti-u-kategoriji-posebnog-ornitoloskog-rezervata/>)

Tablica 1. Popis vrsta roda *Rutilus* s pridruženim lokalitetima na kojima su uzorkovane, brojem sekvenci, kodovima i pridruženim haplotipom.

VRSTA	LOKALITET	BROJ SEKVENCI	KOD	HAPLOTIP
<i>Rutilus virgo</i>	Bregana	1	RUBR1	Hap1
<i>Rutilus rutilus</i>	Jadova	1	RUJA1	Hap12
<i>Rutilus aula</i>	Raša	2	RURA1	Hap11
			RURA2	
	Vlačine	3	RUZA7	Hap4
			RUZA8	
			RUZA9	
<i>Rutilus basak</i>	Miljašić Jaruga	6	RUZA1	Hap3
			RUZA2	
			RUZA3	
			RUZA4	
			RUZA5	
			RUZA6	
	Ruda	5	RURD1	Hap3
			RURD2	
			RURD3	
			RURD4	
			RURD5	
	Prološko blato	2	RUPB1	Hap3
			RUPB2	
	Vrljika	1	RUVR1	Hap3
	Matica	10	RUMA1	Hap2
			RUMA2	
			RUMA3	Hap10
			RUMA4	Hap2
			RUMA5	
			RUMA6	
RUMA7			Hap3	
RUMA8				
RUMA9				
RUMA10				

Tablica 1. (Nastavak) Popis vrsta roda *Rutilus* s pridruženim lokalitetima na kojima su uzorkovane, brojem sekvenci, kodovima i pridruženim haplotipom.

<i>Rutilus basak</i>	Rastočko polje	11	RURP1	Hap2
			RURP2	Hap3
			RURP3	Hap8
			RURP4	Hap9
			RURP5	Hap8
			RURP6	Hap3
			RURP7	Hap8
			RURP8	
			RURP9	Hap9
			RURP10	Hap3
			RURP11	Hap9
	Baćinska jezera	6	RUBA1	Hap2
			RUBA2	
			RUBA3	
			RUBA4	Hap9
			RUBA5	Hap14
			RUBA6	Hap2
	Modro oko	10	RUMO1	Hap5
			RUMO2	Hap16
			RUMO3	Hap5
			RUMO4	Hap7
			RUMO5	Hap17
			RUMO6	Hap5
			RUMO7	
			RUMO8	
			RUMO9	Hap3
			RUMO10	Hap5
	Norin	7	RUNO1	Hap15
			RUNO2	Hap5
			RUNO3	
			RUNO4	
			RUNO5	
			RUNO6	
			RUNO7	
	Neretva	5	RUME1	Hap5
			RUME2	Hap13
			RUME3	Hap5
			RUME4	
			RUME5	
	Kuti	9	RUKU1	Hap5
			RUKU2	
			RUKU3	Hap6
			RUKU4	Hap5
RUKU5				
RUKU6				
RUKU7			Hap7	
RUKU8			Hap5	
RUKU9				

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je provedeno pomoću lednog elektroagregata u rijekama, dok je u jezerima postavljana mreža. Istraživanje je provedeno aktivnom metodom uzorkovanja – elektroribolovom (Duplić 2008) upravo zbog prednosti koje ima nad pasivnim metodama uzorkovanja, a neke od njih su što je metoda elektroribolova manje ovisna o ponašanju i aktivnosti riba, manje je selektivna, daje puno bolju sliku o ihtiofauni i ono najvažnije - što minimalno utječe na jedinke. Djelovanjem električne struje na jedinke, one prelaze u stanje narkoze gdje dolazi do djelomične paralize mišića, no brzo se oporavljaju te nemaju nikakvih trajnih posljedica.

Nakon ulova jedinkama je odrezan mali dio prsne peraje, nakon čega su komadići tkiva pohranjeni u epruvetice napunjene etilnim alkoholom i označene kodovima (prva dva slova označuju rod ribe, a druga dva slova lokalitet s kojeg je ulovljena), a zatim spremljene u hladnjak. Prilikom povratka s terena, epruvetice s uzorcima premještene su u zamrzivač i čuvane na temperaturi od -20 °C s ciljem očuvanja DNA i sprječavanja njene razgradnje. Jedinke su nakon vrlo uspješnog i efikasnog uzorkovanja, vraćene žive na mjesto ulova.

3.2. Laboratorijski postupci (izolacija DNA, lančana reakcija polimerazom (PCR), sekvenciranje)

Ukupna genomska DNA izolirana je iz uzoraka tkiva pomoću *DNeasy Blood i Tissue* Kit- a tvrtke QIAGEN prema protokolu proizvođača. U epruvetice s usitnjenim komadićima tkiva, dodano je 180 µL pufera ATL za razaranje tkiva, 20 µL proteinaze K za razaranje staničnih membrana, sadržaj epruvetice promiješan je mješalicom te su uzorci ostavljeni 24 h u kupelji na 56 °C. Sutradan uzorci su izvađeni iz kupelji, ponovno promiješani *vortex* mješalicom, dodano im je 200 µL pufera AL, promiješani mješalicom i 200 µL etanola (96 %) te ponovo pomiješani. Otprilike 650 µL uzorka iz svake epruvetice prebačeno je u epruveticu s membranom priloženom u QIAGEN Kit-u te centrifugirano na 8000 rpm 1 minutu. Donji dio epruvetice s membranom se odlijeva, dok se membrana dalje stavlja u novi donji dio, nakon čega je dodano 500 µL pufera AW1 te je ponovljen postupak centrifugiranja. Prebacivanjem membrane u novi donji dio, dodano je 500 µL pufera AW2 te je sadržaj centrifugiran na 14 000 rpm 3 minute. Ponovnim prebacivanjem membrane, dodano je 150 µL pufera AE za čije

elucijsko djelovanje je potrebno pričekati 2-3 minute na sobnoj temperaturi, potom je sadržaj centrifugiran na 8000 rpm 1 minutu. U zadnjem se koraku baca membrana, ostaje izolirana DNA u eprueticama na koje se nalijepe etikete s odgovarajućim kodom i pohrane u zamrzivač.

Nakon dobivanja DNA izolata, uzorci se pripremaju za umnažanje PCR-om (polimerazna lančana reakcija). Za umnažanje gena za citokrom b (*cyt b*) (analizirani genski marker), korišten je komplet kemikalija *HotStarTaq Plus Master Mix Kit* (QIAGEN) te dvije početnice, sintetizirane u servisima *Eurofins Genomics* i *Macrogen Europe*. S ciljem dobivanja ispravnih rezultata za rod *Rutilus*, korištene su početnice koje potvrđeno daju ciljane produkte te protokol za PCR reakciju koji je optimiziran za ovaj rod. Stoga je ukupni volumen uzorka koji se priprema za PCR reakciju 25 µL, od čega 12.5 µL MASTERMIXA (mješavina tvari dobivena od proizvođača), 8.5 µL PRIMERMIXA koji se sastoji od dviju početnica, boje i vode te 4 µL DNA. Nakon pripreme za PCR, uzorci idu u PCR uređaj na točno određeni program. PCR uvjeti i početnice navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Laboratorijski protokol i početnice za analizirani genski marker *cyt b*

GEN	Citokrom <i>b</i> (<i>cyt b</i>)
PCR UVJETI	10 min 95,0 °C 35x 00:45 92,0 °C 01:30 48,0 °C 01:45 72,0 °C 7 min 72,0 °C
POČETNICE	GluF ThrR

Nakon završene PCR reakcije, provjera njene uspješnosti provedena je metodom elektroforeze na agaroznom gelu. Gel je pripremljen stavljanjem 1g agaroze u tabletama (2 tablete) i 100 mL pufera TAE u tikvicu, laganim miješanjem, zagrijavanjem te na kraju kratkim hlađenjem na sobnoj temperaturi kako bi se mogao uliti u kadicu za gel. Puffer TAE po svom sastavu je tris (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Nakon ulijevanja gela u kadicu i stavljanja češljića za dobivanje jažica, ostavljen je otprilike 20 minuta na sobnoj temperaturi kako bi učvrstio. Nakon nekog vremena, češljići su uklonjeni kao i kadica iz okvira. Uzorci su potom nanoseni na gel,

u svaku jažicu po 4 μ L uzorka, te je provedena elektroforeza na 120V, 400mA, 30 minuta. Po završetku elektroforeze, gel je prebačen u otopinu etidijevog bromida na otprilike 15 minuta te fotografiran pod ultraljubičastim svjetlom. U servisu *Macrogen Europe* provedeno je pročišćavanje i sekvenciranje dobivenih PCR produkata. Za sravnjivanje sekvenci korišten je računalni program BioEdit 7.2.5 (Hall 1999) prilikom čega su provjereni kromatogrami svih sekvenci.

3.3. Filogenetska rekonstrukcija

Filogenetska rekonstrukcija za utvrđivanje srodstvenih odnosa između vrsta roda *Rutilus* u Hrvatskoj u ovom je istraživanju bazirana na tri metode: metoda najveće parsimonije (MP), metoda najveće vjerojatnosti (ML) te metoda susjednog sparivanja (MJ). Metoda najveće parsimonije (MP), kao i metoda najveće vjerojatnosti (ML) daju filogenetska stabla, a metoda susjednog sparivanja (MJ) filogenetsku mrežu.

Analize metodama MP i ML provedene su pomoću računalnog programa MEGA7 (Kumar i sur. 2016), a MJ pomoću programa Network 4.5.1.6. (Fluxus Technology Ltd.). MP i ML analize provedene su pod heurističkim modelom uz 100 ponavljanja, uz nasumičan redosljed unošenja taksa, preklapanje grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem (TBR, od engleskog izraza *tree bisection-reconnection*). Tom se metodom traži stablo najkraće topologije preraspodjelom grana tako da se prvotni kladogram podijeli na više manjih potkladograma, koji se onda preslaguju u nova stabla. Sve nukleotidne supstitucije i sva mjesta kodona imala su jednaku težinu. Filogenetski testovi, točnije podržanost grananja za svaku od triju metoda, utvrđeni su analizom samopodržanosti (engleski *Bootstrap*) uz 500 ponavljanja za ML i MJ te 1000 ponavljanja za MP. Analiza podržanosti je statistička metoda za određivanje točnosti hipoteza, koja iz izvornog poravnanja sekvenci nasumično odabire stupce (neke odabire više puta, neke ni jednom) prilikom čega formira novi set sekvenci i za svaki novonastali set konstruira filogenetičko stablo korištenjem istih parametara. Potom se topologija novonastalog stabla uspoređuje s prethodno kreiranim stablom s ciljem sagledavanja razlika u rezultatima. Ukoliko je pozicija grane filogenetičkog stabla nepromijenjena u odnosu na prethodno kreirano stablo daje se vrijednost 1, dok se u suprotnom daje vrijednost 0. Taj postupak dodjeljivanja vrijednosti ponavlja se onoliko puta koliko je zadano ponavljanja. Rezultati *bootstrap* analize određeni su frekvencijom (%) pojavljivanja određene grane u ponavljanjima. Broj ponavljanja prilikom *bootstrapa* utječe na kvalitetu stabla, pa tako veći broj dobiven uz pojedinu granu

sugerira veću vjerojatnost postojanja te grane na srodstvenom stablu, međutim ne utječe na točnost, to jest na razmještaj grana na stablu (Nei & Kumar 2000). Dakle, ova analiza služi samo za određivanje pojedinih grana u stablima dobivenim na temelju odabrane metode. Stabla i mreža ukorijenjeni su pomoću sekvence vanjske grupe koja predstavlja organizam koji je u bliskom srodstvu, ali izvan grupe koju proučavamo (Holder i Lewis 2003).

3.4. Analiza evolucijske povijesti roda *Rutilus* u Hrvatskoj

Vremena divergencije između vrsta roda *Rutilus*, kao i između filogenetskih linija procijenjena su Bayesovom MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) koalescentnom metodom pomoću računalnog programa BEAST 1.7.0 (Drummond i sur. 2012). BEAST je program za Bayesovu filogenetsku analizu molekularnih sekvenci koji procjenjuje ukorijenjenu, vremenom mjerenu filogeniju korištenjem modela molekularnog sata. Može se koristiti kao metoda rekonstrukcije filogenije, ali i kao okvir za testiranje evolucijskih hipoteza (Drummond i sur. 2012). Broj MCMC koraka (duljina lanca) bio je 20 milijuna. Kalibriranje molekularnog sata provedeno je na temelju stope divergencije citokroma *b* od 0.4% na milijun godina, utvrđenoj za ovu porodicu (Perea i sur.).

3.5. Intrapopulacijska i intraspecijska genska raznolikost i različitost

Polimorfizam na razini DNA nastaje kao rezultat mutacija i pogreški prilikom replikacije, a upravo je razvojem tehnika analize DNA omogućeno istraživanje tih varijacija (Okumuş i Çiftci 2003). Određivanjem mjera DNA polimorfizma procijenjena je razina genske raznolikosti unutar pojedinih populacija, kao i unutar vrsta *Rutilus aula* i *Rutilus basak* korištenjem programa DnaSP 6 (Rozas i sur. 2017).

Određene su sljedeće mjere:

- N – broj sekvenci
- S – broj polimorfničkih mjesta
- η – ukupan broj mutacija
- h – broj haplotipova
- H_d – raznolikost haplotipova

- π – nukleotidna raznolikost
- k – prosječan broj razlika nukleotida

Izračunavanjem navedenih parametara u računalnom programu DnaSP, to jest podacima za gensku raznolikost kako za populacije, tako i za vrste na temelju broja prisutnih haplotipova, procjenjuje se njihova raznolikost. Statistički testovi interspecijske genske različitosti provedeni su u istom programu, pri čemu su dali detaljnije podatke o tome koje su populacije genski iste, a koje se razlikuju.

3.6. Procjena efektivne veličine populacija i broja migranata po generaciji

Kroz mehanizam genetičkog drifta, male populacije često su izložene velikom riziku od gubljenja genetičke raznolikosti, što rezultira ugrožavanjem egzistencije tih populacija. Obična procjena veličine populacije ne pruža dovoljno informacija o njihovoj ranjivosti, stoga se koristi efektivna veličina populacije koja ovisi o relativnom reproduktivnom uspjehu mužjaka i ženki, kao i o varijancama tih reproduktivnih uspjeha (Šolić 2005). Pomoću programa MIGRATE 3.2.1 (Beerli 2009) korištenjem Bayesove metode, procijenjena je efektivna veličina pojedinih populacija, kao i protok gena prisutan među populacijama (broj jedinki koje migriraju po generaciji s jednog lokaliteta na drugi).

Za procjenu efektivne veličine populacije koriste se parametri:

$$N_e = \Theta/\mu$$

N_e - efektivna veličina populacije

Θ - parametar TETA

μ - stopa mutacije (0,000002 po generaciji koja vrijedi za rod *Rutilus* – stopa mutacije od 0.4% uspoređujući dvije sekvence na milijun godina)

Za procjenu stupnja protoka gena koriste se parametri:

$$Nm = M \cdot \Theta$$

Nm = stupanj protoka gena

M – koeficijent migracije (brojčano pokazuje važnost imigracija u odnosu na mutacije u unošenju varijabilnosti u populaciju)

Θ - parametar TETA

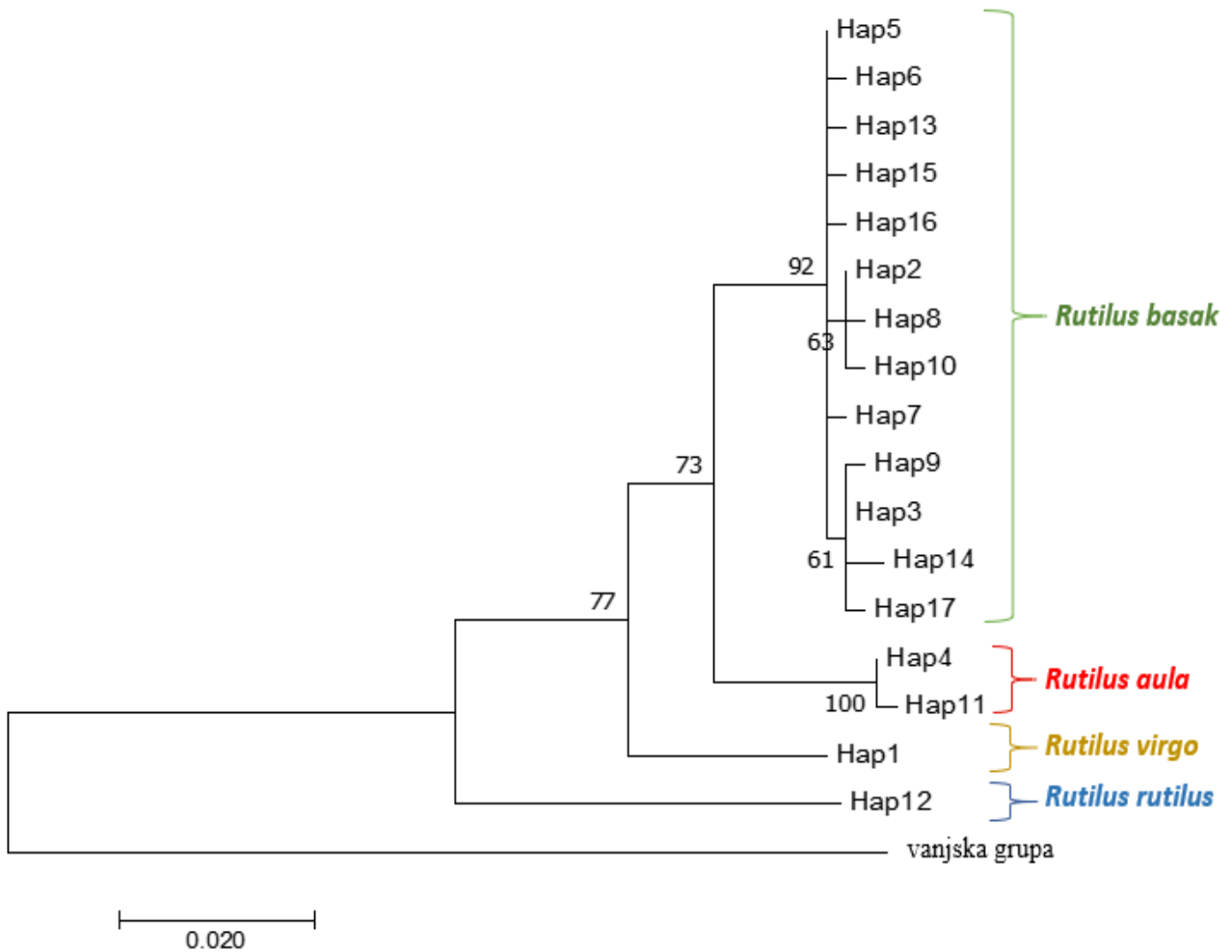
4. REZULTATI

4.1. Filogenetska rekonstrukcija

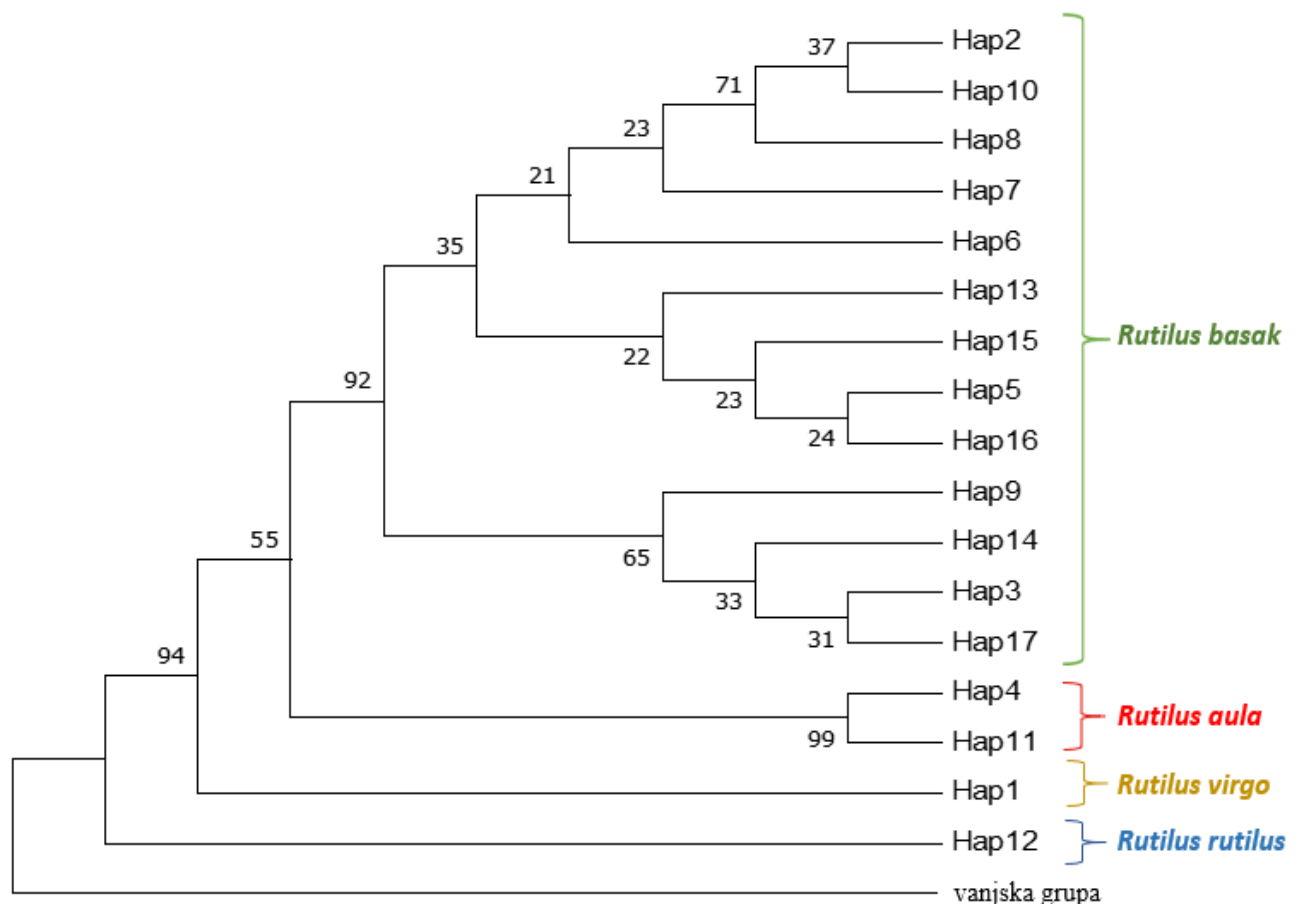
Filogenetska rekonstrukcija temeljena je na sekvencama gena za citokrom *b* (*cyt b*) dugim 511 parova baza, od kojih je 402 konstantnih, 77 varijabilnih parsimonijskih neinformativnih i 32 parsimonijskih informativnih mjesta. Analize su provedene na 79 skraćenih sekvenci vrsta roda *Rutilus* prikupljenih s različitih lokaliteta u Hrvatskoj pri čemu se kao vanjska grupa (engl. *outgroup*) koristila sekvencu vrste *Scardinius plotizae*, koja pripada istoj porodici, ali različitom rodu u odnosu na vrste roda *Rutilus*. U prikupljenom uzorku utvrđeno je ukupno 17 različitih haplotipova roda *Rutilus*.

Stabla dobivena metodom najveće vjerojatnosti (ML) (Slika 20.) i metodom najveće parsimonije (MP) (Slika 21.) pokazuju sličnu topologiju. Rezultat oba stabla prikazuje izdvajanje vrste *Rutilus rutilus* iz Jadove (Hap12), kao i izdvajanje vrste *Rutilus virgo* iz Bregane (Hap1), odvajanje vrste *Rutilus basak* od vrste *Rutilus aula* te velika podržanost u razdvajanju populacija jedinki vrste *Rutilus aula* iz Raše (Hap11) i Vlačina (Hap4).

Stablo dobiveno metodom najveće parsimonije ukazuje na prisutnost dviju sestrinskih linija vrste *Rutilus basak* koje jasno potvrđuju zajedničku evolucijsku povijest, dok se grananja nakon razdvajanja tih dviju grana ne mogu uzeti u obzir kao ispravna, isto kao što je slučaj i sa stablom dobivenim metodom najveće vjerojatnosti koje je u tom dijelu grananja različito od stabla dobivenog metodom parsimonije.

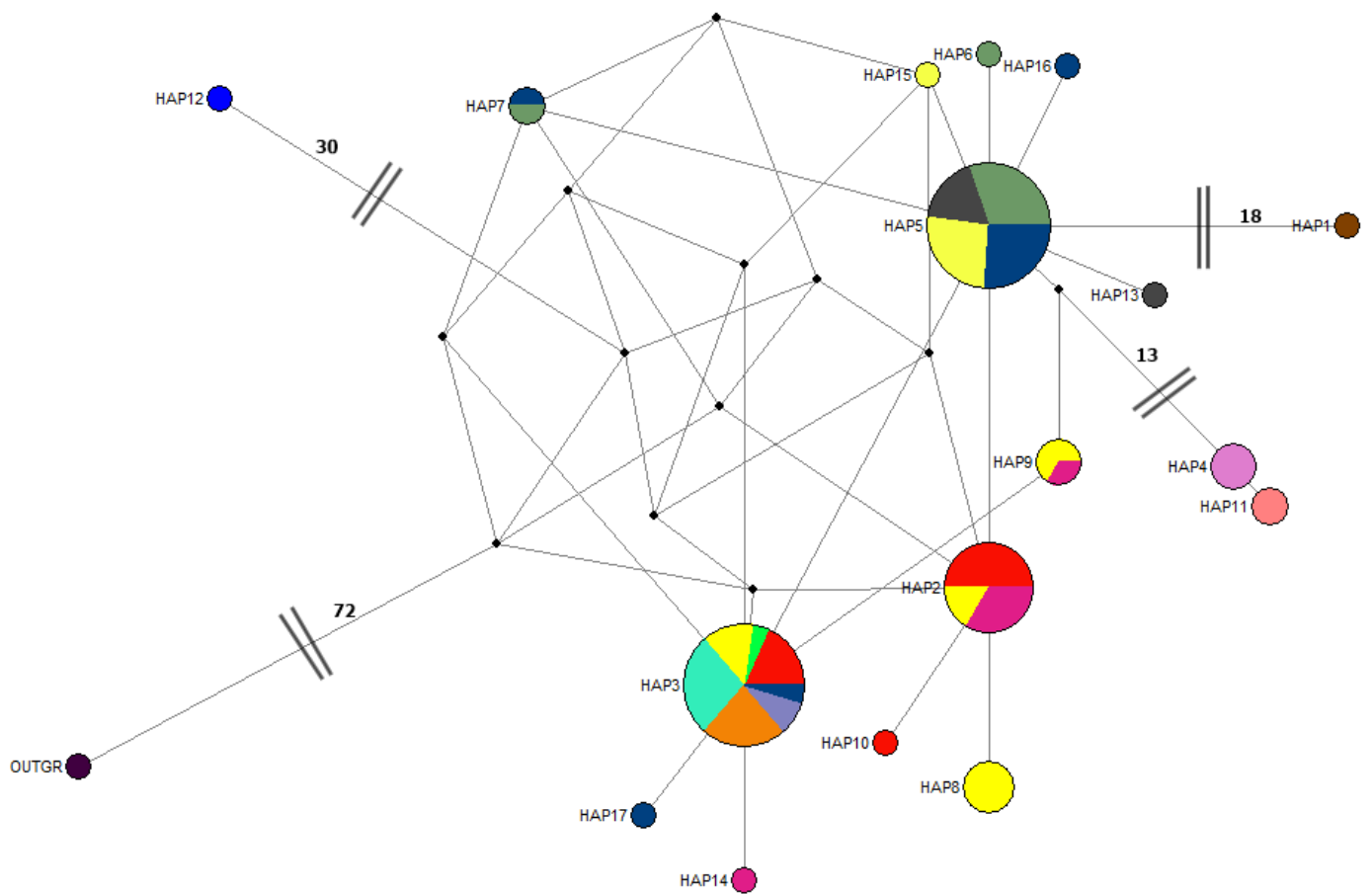


Slika 20. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju *cyt b* gena koje prikazuje haplotipove označene s Hap s pridruženim brojem te pripadajućim vrstama. Brojevi pored grananja označuju podržanost pojedinih čvorova na stablu.



Slika 21. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju cyt *b* gena koje prikazuje haplotipove označene s Hap s pridruženim brojem te pripadajućim vrstama. Brojevi pored grananja označuju podržanost pojedinih čvorova na stablu.

Iako je filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja (MJ) ukazala na velike nedostatke u skupu podataka, odnosno nužnost daljnjih istraživanja (izuzetno je velik broj neprimijećenih haplotipova), ona je ipak potvrdila je najvažnije rezultate na koje su ukazala i filogenetska stabla. Dakle, pokazala je odvajanje vrste *Rutilus basak* od *Rutilus aula*, zaseban položaj vrsta *Rutilus rutilus* iz Jadove i *Rutilus virgo* iz Bregane te odvajanje jedinki vrste *Rutilus aula* iz Raše i Vrljike, a također se može primijetiti i strukturiranost unutar vrste *Rutilus basak* (Slika 22).



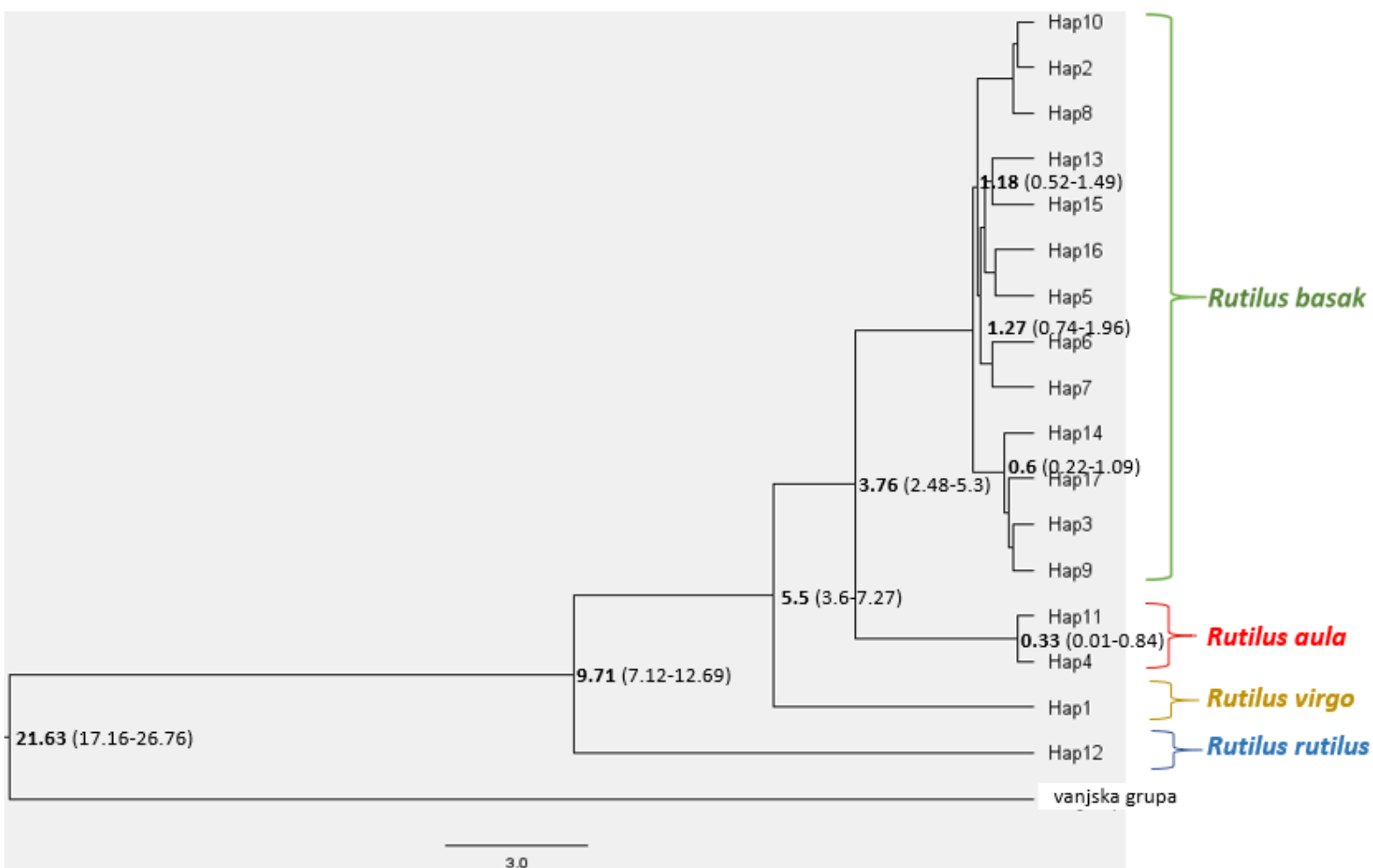
- Bregana } *Rutilus virgo*
- Jadova } *Rutilus rutilus*
- Raša } *Rutilus aula*
- Vlačine } *Rutilus aula*
- Miljašić Jaruga } *Rutilus basak*
- Ruda } *Rutilus basak*
- Prološko blato } *Rutilus basak*
- Vrljika } *Rutilus basak*
- Matica } *Rutilus basak*
- Rastočko polje } *Rutilus basak*
- Bačinska jezera } *Rutilus basak*
- Modro oko } *Rutilus basak*
- Norin } *Rutilus basak*
- Neretva } *Rutilus basak*
- Kuti } *Rutilus basak*
- OUTGR - vanjska grupa

Slika 22. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog sparivanja (MJ) s pridruženom legendom. Brojevi na linijama označavaju broj mutacija ako ih je ≥ 3 . Veličina obojenih točaka proporcionalna je broju sekvenci svakog haplotipa, a njihova obojenost označava lokalitete

sadržane unutar svakog haplotipa (sekvence s različitih lokaliteta), dok crne točke predstavljaju neprimjećene haplotipove.

4.2. Vrijeme divergencije vrsta roda *Rutilus* i evolucijskih linija u Hrvatskoj

Filogenetsko stablo dobiveno Bayesovom MCMC metodom s vremenom odvajanja pojedinih linija prikazano je na Slici 23. Filogenetski položaj vrsta i linija na stablu gotovo je isti kao i filogenetski položaj dobiven metodom najveće izglednosti (ML) s jedinim razlikama u grananju unutar vrste *Rutilus basak*. Prikazani brojevi u milijunima godina sugeriraju da je divergencija unutar roda *Rutilus* započela u miocenskoj epohi te je trajala do pleistocenske epohe.



Slika 23. Procjena vremena divergencije bazirana na genima za citokrom *b* vrsta roda *Rutilus*. Podebljani brojevi označavaju srednju vrijednost odvajanja čvorova u milijunima godina, dok

brojevi u zagradama označavaju minimalnu i maksimalnu vrijednost pri čemu je 95% vjerojatnost da se u tom rasponu dogodilo razdvajanje.

4.3. Intrapopulacijska i intraspecijska genska raznolikost i interspecijska genska različitost

Analizom sekvenci cyt *b* gena utvrđena je intrapopulacijska i intraspecijska genska raznolikost te interspecijska genska različitost vrsta *Rutilus aula* i *Rutilus basak*. Osnovne mjere genskog polimorfizma utvrđene na temelju cyt *b* gena za populacije sa svakog lokaliteta, kao i ukupno za vrste *Rutilus aula* i *Rutilus basak* navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Mjere genskog polimorfizma na temelju cyt *b* gena. N – broj sekvenci, S – broj polimorfnihi mjesta, η - ukupan broj mutacija, h – broj haplotipova, Hd – raznolikost haplotipova, π - nukleotidna raznolikost, k – prosječan broj razlika nukleotida.

populacije	N	S	η	h	Hd	π	k
Raša	2	0	0	1	0	0	0
Vlačine	3	0	0	1	0	0	0
Miljašić Jaruga	6	0	0	1	0	0	0
Ruda	5	0	0	1	0	0	0
Prološko blato	2	0	0	1	0	0	0
Matica	10	3	3	3	0,644	0,00248	1,267
Rastočko polje	11	4	4	4	0,800	0,00377	1,927
Baćinska jezera	6	5	5	3	0,600	0,00404	2,067
Modro oko	10	4	4	5	0,667	0,00187	0,956
Norin	7	1	1	2	0,286	0,00056	0,286
Neretva	5	1	1	2	0,400	0,00078	0,400
Kuti	9	2	2	3	0,417	0,00087	0,444
<i>Rutilus aula</i>	5	1	1	2	0,600	0,00117	0,600
<i>Rutilus basak</i>	73	26	26	14	0,809	0,00466	2,380

Analize su pokazale umjerenu gensku raznolikost vrste *Rutilus aula* i visoku gensku raznolikost prisutnu unutar vrste *Rutilus basak*. Rezultati čija je dobivena vrijednost 0 za pojedine lokalitete su zabrinjavajući jer ukazuju na gotovo nikakvu gensku raznolikost, što je

za lokalitete Raša, Vlačine i Prološko blato vrlo vjerojatno posljedica premalog broja sakupljenih jedinki, stoga rezultati možda nisu realni. Niska genska raznolikost prisutna je na lokalitetima Norin, Neretva i Kutu, umjerena na lokalitetima Matica, Baćinska jezera i Modro oko, dok je visoka genska raznolikost utvrđena u Rastočkom polju gdje su prisutna četiri haplotipa.

Provedeni su i testovi genske različitosti (Tablica 4.) koji ukazuju na postojanje genski iste populacije (rezultati nisu statistički značajni) vrste *Rutilus aula*. Populacija vrste *Rutilus basak* tek se nešto razlikuje (rezultati statistički značajni) zbog vjerojatno dvije linije koje su se razdvojile u evolucijskoj povijesti.

Tablica 4. Rezultati testova genske različitosti za populacije vrsta *Rutilus aula* i *Rutilus basak*.

VRSTA	ANALIZA	IZNOS VRIJEDNOSTI	ZNAČAJ
<i>Rutilus aula</i>	χ^2	5,000	Statistički značajno
	H _{ST}	1,00000	Nije statistički značajno
	K _{ST}	1,00000	Nije statistički značajno
	K _{ST} *	1,00000	Nije statistički značajno
	Z	1,50000	Nije statistički značajno
	Z*	0,91629	Nije statistički značajno
	S _{nn}	1,00000	Nije statistički značajno
<i>Rutilus basak</i>	χ^2	182,064	Statistički značajno
	H _{ST}	0,36176	Statistički značajno
	K _{ST}	0,30628	Statistički značajno
	K _{ST} *	0,30713	Statistički značajno
	Z	949,12502	Statistički značajno
	Z*	6,45767	Statistički značajno
	S _{nn}	0,26175	Statistički značajno

Obje analize nisu provedene za populacije na lokalitetima Bregana, Jadova i Vrljika, kao ni za vrste *Rutilus virgo* i *Rutilus rutilus* zbog nedovoljno sakupljenih jedinki.

4.4. Procjena efektivne veličine populacija i broja migranata po generaciji

Procjena efektivnih veličina populacija za vrstu *Rutilus aula* jednake su za oba lokaliteta pri čemu je dobivena vrijednost manja od 100, što je izrazito mala efektivna veličina populacija (Tablica 5.).

Tablica 5. Procjena efektivne veličine populacija (N_e) vrste *Rutilus aula*, pri čemu je Θ - parametar TETA, a μ stopa mutacije.

POPULACIJA	Θ	μ	$N_e (\Theta/\mu)$
Raša	0,00003	0,000002	15
Vlačine	0,00003	0,000002	15

Rezultati procjene broja migranata po generaciji za vrstu *Rutilus aula* ukazuju da migracija nema (Tablica 6.), što je i očekivano jer su lokaliteti Raša u Istri i Vlačine u okolici Zadra geografski udaljeni, a očito je tako bilo i tijekom duljeg geološkog vremena.

Tablica 6. Procjena broja migranata po generaciji (N_m) u populacijama za vrstu *Rutilus aula*, POPULACIJA+ - populacija koja prima jedinke, M – koeficijent migracije, Θ - parametar TETA.

POPULACIJA+	POPULACIJA	M	Θ	$N_m (M*\Theta)$
Vlačine	Raša	903,7	0,00003	0
Raša	Vlačine	107,7	0,00003	0

Rezultati procjene efektivne veličine populacija vrste *Rutilus basak* pokazuju različite vrijednosti za populacije (Tablica 7.), od kojih je najmanja procijenjena efektivna veličina za Prološko blato i iznosi svega 15, a najveća za Norin – 31315. Prema Frankham i sur. (2014), populacije čija je efektivna veličina $N_e < 1000$ neće biti odmah osuđene na izumiranje, međutim njihova sposobnost evoluiranja s ciljem suočavanja s promjenama u okolišu će se s vremenom smanjiti, što će smanjiti njihovu dugoročnu vijabilnost. Dobiveni rezultati procjene ukazuju na moguću ugroženost analiziranih populacija na lokalitetima Miljašić Jaruga, Prološko blato, Matica i Baćinska jezera.

Tablica 7. Procjena efektivne veličine populacija (N_e) vrste *Rutilus basak*, pri čemu je Θ - parametar TETA, a μ stopa mutacije.

POPULACIJA	Θ	μ	$N_e (\Theta/\mu)$
Miljašić Jaruga	0,00097	0,000002	485
Ruda	0,00657	0,000002	3285
Prološko blato	0,00003	0,000002	15
Matica	0,00063	0,000002	315
Rastočko polje	0,00210	0,000002	1050
Baćinska jezera	0,00097	0,000002	485
Modro oko	0,00217	0,000002	1085
Norin	0,06263	0,000002	31315
Neretva	0,01337	0,000002	6685
Kuti	0,05837	0,000002	29185

Prema procjeni broja migranata iz pojedine populacije u ostale (Tablica 8.), populacije Norin i Kuti ističu se kao populacije koje "primaju" najveći broj imigranata po generaciji iz ostalih populacija. Poneka imigracija događa se još i u Rudu, Rastočko polje, Modro oko i Neretvu, dok prema dobivenim rezultatima u ostale populacije nema imigracija.

Tablica 8. Procjena broja migranata po generaciji (Nm) u populacijama za vrstu *Rutilus basak*, POPULACIJA+ - populacija koja prima jedinke, M – koeficijent migracije, Θ - parametar TETA.

POPULACIJA+	POPULACIJA	M	Θ	Nm (M* Θ)
Miljašić Jaruga	Ruda	108,3	0,00097	0
Miljašić Jaruga	Prološko blato	449	0,00097	0
Miljašić Jaruga	Matica	51	0,00097	0
Miljašić Jaruga	Rastočko polje	225	0,00097	0
Miljašić Jaruga	Baćinska jezera	0,3	0,00097	0
Miljašić Jaruga	Modro oko	227	0,00097	0
Miljašić Jaruga	Norin	213,7	0,00097	0
Miljašić Jaruga	Neretva	7	0,00097	0
Miljašić Jaruga	Kuti	583	0,00097	0
Ruda	Miljašić Jaruga	152,3	0,00657	1
Ruda	Prološko blato	258,3	0,00657	1
Ruda	Matica	0,3	0,00657	0
Ruda	Rastočko polje	635	0,00657	4
Ruda	Baćinska jezera	32,3	0,00657	0
Ruda	Modro oko	266,3	0,00657	1
Ruda	Norin	128,3	0,00657	0
Ruda	Neretva	194,3	0,00657	1
Ruda	Kuti	113	0,00657	0
Prološko blato	Miljašić Jaruga	99	0,00003	0
Prološko blato	Ruda	188,3	0,00003	0
Prološko blato	Matica	251,7	0,00003	0
Prološko blato	Rastočko polje	630,3	0,00003	0
Prološko blato	Baćinska jezera	274,3	0,00003	0
Prološko blato	Modro oko	447	0,00003	0
Prološko blato	Norin	0,3	0,00003	0
Prološko blato	Neretva	300,3	0,00003	0
Prološko blato	Kuti	328,3	0,00003	0
Matica	Miljašić Jaruga	861	0,00063	0
Matica	Ruda	0,3	0,00063	0
Matica	Prološko blato	981,7	0,00063	0
Matica	Rastočko polje	430,3	0,00063	0
Matica	Baćinska jezera	310,3	0,00063	0
Matica	Modro oko	985	0,00063	0
Matica	Norin	355,7	0,00063	0
Matica	Neretva	364,3	0,00063	0
Matica	Kuti	939	0,00063	0
Rastočko polje	Miljašić Jaruga	714,3	0,0021	1
Rastočko polje	Ruda	391	0,0021	0
Rastočko polje	Prološko blato	329,7	0,0021	0
Rastočko polje	Matica	890,3	0,0021	1
Rastočko polje	Baćinska jezera	219,7	0,0021	0
Rastočko polje	Modro oko	0,3	0,0021	0
Rastočko polje	Norin	61	0,0021	0

Tablica 8. (Nastavak) Procjena broja migranata po generaciji (Nm) u populacijama za vrstu *Rutilus basak*, POPULACIJA+ - populacija koja prima jedinke, M – koeficijent migracije, Θ - parametar TETA.

Rastočko polje	Neretva	647,7	0,0021	1
Rastočko polje	Kuti	690,3	0,0021	1
Baćinska jezera	Miljašić Jaruga	376,6	0,00097	0
Baćinska jezera	Ruda	261,7	0,00097	0
Baćinska jezera	Prološko blato	933,7	0,00097	0
Baćinska jezera	Matica	0,3	0,00097	0
Baćinska jezera	Rastočko polje	471,7	0,00097	0
Baćinska jezera	Modro oko	15,7	0,00097	0
Baćinska jezera	Norin	794,3	0,00097	0
Baćinska jezera	Neretva	985	0,00097	0
Baćinska jezera	Kuti	441	0,00097	0
Modro oko	Miljašić Jaruga	535,7	0,00217	1
Modro oko	Ruda	985	0,00217	2
Modro oko	Prološko blato	540,3	0,00217	1
Modro oko	Matica	347	0,00217	0
Modro oko	Rastočko polje	121,7	0,00217	0
Modro oko	Baćinska jezera	136,3	0,00217	0
Modro oko	Norin	983,7	0,00217	2
Modro oko	Neretva	383	0,00217	0
Modro oko	Kuti	205	0,00217	0
Norin	Miljašić Jaruga	779,7	0,06263	48
Norin	Ruda	989,7	0,06263	61
Norin	Prološko blato	370,9	0,06263	23
Norin	Matica	797,7	0,06263	50
Norin	Rastočko polje	427	0,06263	26
Norin	Baćinska jezera	15	0,06263	0
Norin	Modro oko	499,7	0,06263	31
Norin	Neretva	958,3	0,06263	60
Norin	Kuti	983,7	0,06263	61
Neretva	Miljašić Jaruga	41	0,01337	0
Neretva	Ruda	111	0,01337	1
Neretva	Prološko blato	205	0,01337	2
Neretva	Matica	265	0,01337	3
Neretva	Rastočko polje	93	0,01337	1
Neretva	Baćinska jezera	124,3	0,01337	1
Neretva	Norin	226,3	0,01337	3
Neretva	Modro oko	50,3	0,01337	0
Neretva	Kuti	21	0,01337	0
Kuti	Miljašić Jaruga	105,7	0,05837	6
Kuti	Ruda	573,7	0,05837	33
Kuti	Prološko blato	239,7	0,05837	14
Kuti	Matica	149	0,05837	8
Kuti	Rastočko polje	568,3	0,05837	33
Kuti	Baćinska jezera	59	0,05837	3
Kuti	Norin	355,7	0,05837	20
Kuti	Modro oko	157,7	0,05837	9
Kuti	Neretva	515,7	0,05837	30

5. RASPRAVA

Obzirom na nedostatak znanstvenih istraživanja na temu molekularne filogenije i populacijske genetike vrsta roda *Rutilus* u Hrvatskoj, nije bilo moguće usporediti i sa sigurnošću potvrditi dobivene rezultate s dosadašnjima u Hrvatskoj, stoga su rezultati uspoređivani s postojećim istraživanjima ovog roda u Europi i rezultatima istraživanja srodnog roda *Telestes*.

Istraživanje je obuhvatilo populacije četiri vrste roda *Rutilus* u Hrvatskoj, pri čemu su filogenetska stabla i filogenetska mreža pokazali odvajanje svake od tih vrsta, što se podudara s filogenetskom rekonstrukcijom roda *Rutilus* u Europi prema Ketmaier i sur. (2008). Stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti dobivenim vrijednostima pokazuje veću podržanost linija od stabla dobivenog metodom parsimonije, ima bolju rezoluciju, kao i veću povezanost. Za razliku od stabala koja prikazuju jasnu i lako razumljivu filogenetsku rekonstrukciju vrsta roda *Rutilus* u Hrvatskoj, filogenetska mreža ne daje baš relevantne rezultate, čak je pomalo zbunjujuća. Moguće pretpostavke zbog kojih je filogenetska mreža dala takve rezultate su nedovoljan broj uzoraka ili posljedica davnih grananja linija.

Prema istraživanju Perea i sur. (2010) bitno je naglasiti kako su rodovi potporodice Leuciscinae (kojoj pripada rod *Rutilus*) iz Mediterana nastali i diverzificirali u oligocenu (prije 33.9 – 23 milijuna godina). Diverzifikacija rodova bila je određena paleoklimatskom i hidrogeološkom poviješću mediteranske regije, a sam rod *Rutilus* se od drugih rodova potporodice Leuciscinae vjerojatno odvojio prije 21 milijun godina.

Na temelju rezultata filogenetske rekonstrukcije i vremena divergencije istraživanih vrsta roda *Rutilus*, Ketmaier i sur. (2008) su predložili mogući scenarij iz prošlosti o evoluciji roda. Podrijetlo roda *Rutilus* vrlo vjerojatno datira u srednji miocen (Zardoya i Doadrio 1999; Schultz-Mirbach i Reichenbacher 2006). Iako još uvijek nedostaje točan uzorak kojim bi se moglo povezati vrijeme i geografsko porijeklo roda *Rutilus*, ipak postoji mnogo dokaza koji sugeriraju da je sadašnja europska fauna riba sjeverno – azijskog podrijetla (Bianco 1990). Mogući je scenarij da je predak roda došao do Mediterana u srednjem miocenu preko Paratetis mora kada je ono bilo oligosalino, a ujedno i glavna "ruta" kojom je omogućeno rasprostranjivanje slatkovodnih taksona. Potom je nastupila mesinska kriza saliniteta (Krijgsam i sur. 1999) koja je tijekom većeg dijela svoga trajanja bila karakterizirana hiperslanim jezerima na dnu današnjeg Mediterana, a njena zadnja faza (Lago Mare faza), koje je bila kratkotrajna, rezultirala je formacijom boćatih jezera. Postoji mogućnost da je upravo mesinska kriza

saliniteta uzrokovala masovan ulazak jedinki roda *Rutilus*, ali i drugih taksona u to područje. Nakon ponovnog otvaranja Gibraltara, nakon kojeg je uslijedilo uspostavljanje normalnijih uvjeta saliniteta, došlo je do izoliranosti mediteranskih rijeka jednih od drugih, što je vjerojatno uzrokovalo glavna odvajanja unutar roda (Bianco 1990).

Što se tiče evolucijske povijesti roda *Rutilus* na istraživanom prostoru, evolucijski događaji odvajanja vrste *Rutilus rutilus* (prije 12.6 -7.1 milijuna godina), pa potom vrste *Rutilus virgo* (prije 7.2 – 3.6 milijuna godina) prema dobivenim rezultatima dogodili su se u drugoj polovici miocena (*Rutilus rutilus*) i početkom pliocena (*Rutilus virgo*). Na prijelazu te dvije epohe dogodila se maloprije spomenuta mesinska kriza saliniteta, međutim za odvajanje ovih dviju vrsta od ostalih iz istog roda s istraživanog područja, vjerojatno je najzaslužnija tektonska aktivnost izdizanja Dinarida, kao i nastanak dinarskih sustava jezera. Smatra se da je u prošlosti dinarski sustav bazena bio sustav tektonskih jezera ispunjen slatkom vodom i smješten u zapadnom dinarskom pojasu (Buj i sur. 2015, Jiménez - Moreno i sur. 2008). Fragmentacija tih jezera i u konačnici njihov nestanak mogli su potpomognuti odvajanje tih dviju vrsta od ostalih iz istog roda, kao i unaprijediti daljnju specijaciju (Perea i sur. 2010). Sljedeći važan evolucijski događaj odvajanja vrste *Rutilus basak* od vrste *Rutilus aula* (prije 2.4 – 5.3 milijuna godina) datira u pliocen, pa čak i početak pleistocena (odvajanja unutar vrste *Rutilus basak*). Postoji mogućnost da je upravo na ove dvije vrste jadranskog slijeva, koje više dolaze u donjim dijelovima vodotoka, mesinska kriza saliniteta imala najveći utjecaj zbog promjena u razini Jadranskog mora koje su se tada dešavale preko spajanja i razdvajanja rijeka.

Uspoređujući evolucijsku povijest vrsta roda *Rutilus* s istraživanih lokaliteta s, primjerice, vrstama roda *Telestes* koje također pripadaju potporodici Leuciscinae, s 14 vrsta koje su većim dijelom rasprostranjene u rijekama Mediterana (Buj i sur. 2017), ali i ostalim istraživanim vrstama s tog područja u Hrvatskoj primijećene su razlike. Naime, za većinu istraživanih vrsta do sada mesinska kriza saliniteta nije imala gotovo nikakav utjecaj na evolucijsku povijest, dok se s vrstama roda *Rutilus* iz jadranskog slijeva dobro poklapa. Jedina sličnost jest ta što su razdvajanja unutar roda *Telestes* s tog područja, isto kao i unutar roda *Rutilus*, započela sredinom miocena.

Iako se očekivalo da će genska raznolikost biti visoka, obzirom na starost vrste, rezultati su pokazali kako je ona za vrstu *Rutilus aula* ipak umjerena, što može biti posljedica fragmentacije, većeg djelovanja na donje dijelove vodotoka ili nekih drugih utjecaja. Stanje genske raznolikosti masnice trebalo bi se iz tog razloga pratiti jer bi smanjivanje iste moglo ukazivati na prijetnju njenom opstanku zbog nemogućnosti suočavanja s promjenama u okolišu, što je

obično posljedica antropogenog utjecaja koji uključuje uništavanje staništa, onečišćenje voda, ali i unašanje invazivnih vrsta. Također, treba napomenuti kako je masnica točkasto rasprostranjena te se do dan danas ne zna koja su točna područja koja nastanjuje, stoga postoji mogućnost da je to jedan od razloga (Mrakovčić i sur. 2006) ovakvih rezultata genske raznolikosti, zatim premalen broj uzoraka ove vrste korišten u istraživanju koji bi omogućio realan prikaz rezultata, ali i moguća prisutnost nekog od navedenih antropogenih utjecaja u populacijama koji pritišću vrstu.

Ukupna genska raznolikost vrste *Rutilus basak* je visoka te je prisutan veći broj haplotipova unutar populacija, od kojih je najveća raznolikost primijećena na lokalitetima Modro oko i Rastočko polje. Mogući razlog većeg broja haplotipova na lokalitetima Modro oko i Rastočko polje, uspoređujući ih s ostalim lokalitetima, je karakteristično krško stanište koje pogoduje životu jedinki. Unatoč tome, na lokalitetima Raša, Vlačine, Miljašić Jaruga, Ruda i Prološko blato genska raznolikost je niska, s jednim haplotipom po lokalitetu gdje varijabilnosti ni nema što je izuzetno zabrinjavajuće. Genska raznolikost u rijeci Miljašić Jaruga po dosadašnjim saznanjima iznenađujuće je niska, čiji je mogući uzrok poribljavanje na tom lokalitetu koje je doprinijelo uništavanju njenih prirodnih populacija, ali vjerojatno i ostalih jedinki drugih populacija koje tamo žive.

Kako se razlozi evolucijske povijesti vrsta roda *Rutilus* ne poklapaju s vrstama roda *Telestes*, tako se i istraživana genska raznolikost prema Buj i sur. (2017) također ne poklapa. Za vrste roda *Telestes*, istočna jadranska obala je "hot spot" s izraženom visokom genskom raznolikošću, koja se posebno ističe u središnjoj Dalmaciji (Krka i Cetina).

Rezultati pokazuju da ne postoji genska različitost između populacija vrste *Rutilus aula*, dok se kod vrste *Rutilus basak* ona nešto razlikuje zbog malo većeg protoka gena.

Neki od mogućih uzroka koji dovode do manje efektivne veličine populacije u prirodi od stvarnog broja, kakva je rezultatima dobivena za populacije vrste *Rutilus aula*, kao i za neke populacije vrste *Rutilus basak* su razlika među spolovima u broju jedinki koje se pare, razlika u broju gameta kojima se doprinosi sljedećoj generaciji, parenje u srodstvu, variranje starosne strukture populacije, kao i variranje brojnosti populacije u vremenu (Charlesworth 2009). Kao mogući dodatni uzrok treba uzeti u obzir što je u istraživanje uključeno možda premalo uzoraka koji bi mogli pokazati realnije brojke. Dakle, rezultati sugeriraju da baš i nema sustava metapopulacija.

Treba napomenuti kako su za obje vrste gotovo svi provedeni testovi ukazali na isti zaključak, što zapravo govori da je dobiveni rezultat realan.

Pošto su masnica, basak i plotica endemske vrste koje su, kao i sve endemske vrste, posebno osjetljive, a uz to imaju i malu sposobnost prilagodbe na promjene vanjskih čimbenika, rasprostranjene su u nekadašnjim glacijalnim refugijima i usko vezane uz okoliš koji naseljavaju. Stoga, degradacije staništa, melioracije i regulacije vodotoka, onečišćenje vodotoka, klimatske promjene, ribarstvo i turizam (Čaleta i sur. 2015) dakako su mogli uzrokovati one rezultate koji su zabrinjavajući.

Na IUCN-ovom Crvenom popisu je 15 vrsta roda *Rutilus*. Od toga njih 10 je u kategoriji najmanje zabrinjavajuće (LC), jedna u kategoriji gotovo ugrožene (NT), dvije u kategoriji osjetljive (VU) i dvije u kategoriji ugrožene (EN). Za većinu vrsta roda *Rutilus* stanje populacija nije poznato zbog njihove rasprostranjenosti. Prema IUCN-ovim podacima najveća prijetnja masnice koja je u ovom istraživanju pokazala moguću zabrinutost za konzervaciju (genska raznolikost niža od predviđene, nedostatak genske različitosti, kao i protoka gena te male efektivne veličine populacija) jest unošenje alohtonih vrsta (babuške, amura, soma i šarana), što je zabilježeno u Sloveniji i Italiji. Nema zabilježenih konzervacijskih mjera za ovu vrstu (www.iucnredlist.org), međutim rezultati istraživanja ukazuju na potrebu razmatranja istih.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata koji uključuju filogenetska stabla i mrežu, evolucijsku povijest, testove genske raznolikosti i različitosti, efektivnu veličinu populacija i broj migranata po generaciji vrsta roda *Rutilus* u Hrvatskoj, može se zaključiti sljedeće:

- Svaka vrsta roda *Rutilus* ima zaseban položaj unutar filogenetskih stabala te predstavlja filogenetski odvojen i evolucijski nezavisnu jedinicu.
- Divergencija unutar roda *Rutilus* u Hrvatskoj započela je u miocenu i trajala je do pleistocena.
- Populacije vrste *Rutilus basak* tek se nešto genski razlikuju i visoke su genske raznolikosti, dok su populacije vrste *Rutilus aula* genski iste te su umjerene genske raznolikosti.
- Efektivne veličine populacija vrste *Rutilus aula* su niske, a ujedno i nerealne zbog najvjerojatnije premalog broja uzorka, a migracija nema, dok su efektivne veličine nekih populacija vrste *Rutilus basak* visoke, a neke niske te postoje migracije između pojedinih populacija.

Dobiveni rezultati mogli bi pomoći, a možda i potaknuti znanstvenike na detaljnije istraživanje roda *Rutilus* u Hrvatskoj, posebno razmatrajući programe zaštite i monitoringa za ove vrste, a posebno za endemsku vrstu *Rutilus aula* za čiji je opstanak ovo istraživanje pokazalo moguću zabrinutost.

7. LITERATURA

Banović, M. (2014): Određivanje glavne krivulje recesije izvora Rude (Doctoral dissertation, University of Split. Faculty of Civil Engineering, Architecture and Geodesy. Department of Hydrology.).

Benac, Č., Rubinić, J., & Radišić, M. (2017): Geomorfološka evolucija riječnih dolina i ušća na istarskom poluotoku. *Hrvatske vode*, **25** (100), 71-80.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2013): *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb, 1026.

Beerli, P. (2009): How to use Migrate or why are *Markov Chain Monte Carlo* programs difficult to use? *Population Genetics for Animal Conservation, Conservation Biology* (volume 17), Cambridge University Press, Cambridge.

Bianco, P. G. (1990): Potential role of the palaeohistory of the Mediterranean and Paratethys basins on the early dispersal of Euro-Mediterranean freshwater fishes. *Ichthyological exploration of freshwaters. Munchen*, **1** (2), 167-184.

Bianco, P. G., Aprea, G., Balletto, E., Capriglione, T., Fulgione, D., & Odierna, G. (2004): The karyology of the cyprinid genera *Scardinius* and *Rutilus* in southern Europe. *Ichthyological Research*, **51**(3), 274-278.

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), e0131580.

Buj, I., Marčić, Z., Čaleta, M., Šanda, R., Geiger, MF., Freyhof, J., Machordom, A., & Vukić, J. (2017): Ancient connections among the European rivers and watersheds revealed from the evolutionary history of the genus *Telestes* (Actinopterygii; Cypriniformes). *PLoS ONE* **12** (12): e0187366.

Charlesworth, B. (2009). Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews*, **10**, 195-205.

Collard, Y. C. B., Jahufer, Z. Z. M., Brouwer, B. J. i Pang, E. C. K. (2004): An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* vol **142**: 169–196.

Cooper, G. M., Hausman, R. E., & Hausman, R. E. (2000): *The cell: a molecular approach* (Vol. **10**). Washington, DC: ASM press.

Ćaleta, M., Buj, I., Mrakovčić, M., Mustafić, P., Zanella, D., Marčić, Z., Duplić A., Mihinjač, T., Katavić, I. (2015): *Hrvatske endemske ribe*. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb, 116 str.

Dowell, K. (2008): *Molecular Phylogenetics: An introduction to computational methods and tools for analyzing evolutionary relationships*. *Mol. Phylogenetics*, 1-19.

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.

Duplić, A. (2008): *Slatkovodne ribe*. Priručnik za inventarizaciju in praćenje stanja. Zagreb, Državni zavod za zaštitu prirode.

Emerson B., Hewitt G. (2005): *Phylogeography*. *Current Biology* **15** (10): 367-371.

Frankham, R., Bradshaw, C. J.A., Brook B.W. (2014): *Genetics in conservation management: Revised recommendations for 50/500 rules, Red list criteria and population viability analyses*. *Biological Conservation* **170**: 56-63.

Gulam, V. (2012): *The erosion of flysch badlands in the Central Istria* (Doctoral dissertation, Rudarsko-geološko-naftni fakultet, Sveučilište u Zagrebu).

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.

Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1997): *Principles of population genetics* (Vol. **116**). Sunderland, MA: Sinauer associates.

Holder, M., & Lewis, P. O. (2003): *Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches*. *Nature reviews genetics*, **4** (4), 275.

Jelić, D., Duplić, A., Ćaleta, M., & Žutinić, P. (2008): *Endemske vrste riba jadranskog sliva*. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb, 78 pp.

Jiménez-Moreno, G., Mandić, O., Harzhauser, M., Pavelić, D., & Vranjković, A. (2008): *Vegetation and climate dynamics during the early Middle Miocene from Lake Sinj (Dinaride Lake System, SE Croatia)*. *Review Paleobot Palyno* **152**:237–245.

- Ketmaier, V., Bianco, P. G., & Durand, J. D. (2008): Molecular systematics, phylogeny and biogeography of roaches (Rutilus, Teleostei, Cyprinidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, **49**(1), 362-367.
- Kottelat M., Freyhof J. (2007): Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin.
- Krijgsman, W., Hilgen, F. J., Raffi, I., Sierro, F. J., & Wilson, D. S. (1999): Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, **400** (6745), 652.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, **33** (7), 1870-1874.
- Maitland, P. S. (2000): Guide to freshwater fish of Britain and Europe (p. 256). *London: Hamlyn*.
- Domagoj Vranješ (2018): MONITORING: Elaborat zaštite okoliša za ocjenu o potrebi procjene utjecaja na okoliš za zahvat: Uređenje ušća vodotoka Miljašić Jaruge u Ninu. VITA PROJEKT d.o.o.
- Mrakovčić, M., Brigić, A., Buj, I., Čaleta, M., Mustafić, P., & Zanella, D. (2006): Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske.
- Mrakovčić, M., Duplić, A., Mustafić, P., Marčić, Z. (2008): Conservation status of genus *Cobitis* and related genera in Croatia. *Folia Zoologica* **57**, 1, 35-41.
- Mrakovcic, M., Misetić, S., & Povz, M. (1995): Status of freshwater fish in Croatian Adriatic river systems. *Biological Conservation*, **72**(2), 179–185.
- Nakhleh L., Guohua J., Fengmei Z., Mellor-Crummey J. (2005): Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony. *IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB'05)*.
- Nei, M. (1986): Stochastic errors in DNA evolution and molecular phylogeny. In *Evolutionary perspectives and the new genetics* (H. Gershowitz, ed.), pp. 133-147. Alan R. Liss, New York.
- Nei, M. (1987): *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000): *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press.
- Okasha, S. (2006). *Population genetics*.

- Okumuş, İ., & Çiftçi, Y. (2003): Fish population genetics and molecular markers: II-molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **3** (1), 51-79.
- Perea, S., Böhme, M., Zupancic, P., Freyhof, J., Sanda, R., Ozulug, 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. *BMC evolutionary biology*. 10. 265. 10.1186/1471-2148-10-265.
- Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A. (2014): Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2014.
- Posada D., Crandall K.A. (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* **16** (1): 37-45.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017): DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, **34** (12), 3299-3302.
- Rubinić, J. (1994): Hidrološka analiza bilansa i mutnoća vode izvora Rakonek. Drugi stručni skup Sekcije za vodoopskrbu i odvodnju, Zbornik radova. (ur. Makvić, Ž., Vančina, F.). Hrvatsko društvo za zaštitu voda i mora, Zagreb.
- Schönhuth, S., Vukić, J., Šanda, R., Yang, L., & Mayden, R. L. (2018): Phylogenetic relationships and classification of the Holarctic family Leuciscidae (Cypriniformes: Cyprinoidei). *Molecular phylogenetics and evolution*, **127**, 781-799.
- Schulz-Mirbach, T., Reichenbacher, B. (2006): Reconstructuon of Oligocene and Neogene freshwater fish faunas – an actualistic study on cypriniform otoliths. *Acta Paoaeontologica Polonica* **51**, 283-304.
- Štambuk-Giljanović, N. (2000): The study of the water quality of the Norin River which is used for water supply system Neretva-Pelješac-Korčula-Lastovo.
- Zardoya, R., & Doadrio, I. (1999): Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of molecular evolution*, **49** (2), 227-237.
- Zhang D. X., Hewitt G. M. (1996): Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution* **11** (6): 247-251.

Internetski izvori:

<https://frisco-project.eu/hr/slivna-podrucja-rijeka/bregana/>, pristupljeno: 5.6.2019.

<https://www.istrapedia.hr/hrv/819/rasa-rijeka/istra-a-z/>, pristupljeno: 5.6.2019.

https://www.google.com/search?q=milja%C5%A1i%C4%87+jaruga&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi32b-UvdLiAhWn14sKHf5QDhgQ_AUIECgB&biw=1366&bih=657#imgdii=jekhqVV3l6tvnM:&imgsrc=PHmPZ0ldgCF7YM:, pristupljeno: 5.6.2019.

<http://www.haop.hr/hr>, pristupljeno: 5.6.2019.

<https://www.zadarskilist.hr/clanci/19062010/sustav-vlacine-ponovno-u-funkciji>, pristupljeno: 5.6.2019.

<http://www.dalmatian-nature.hr/znacajni-krajobraz/ruda>, pristupljeno: 5.6.2019.

<http://www.dalmatian-nature.hr/znacajni-krajobraz/prolosko-blato>, pristupljeno: 5.6.2019.

www.bacinskajezero.com, pristupljeno: 5.6.2019.

<https://skolski.hrt.hr/emisije/71/neretva>, pristupljeno: 5.6.2019.

<https://www.adriatic.hr/hr/vodic/dalmacija-rivijera-usce-neretve/ri-83>, pristupljeno: 5.6.2019.

<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=34804>, pristupljeno: 5.6.2019.

<https://zastita-prirode-dnz.hr/zastita-mocvarnog-podrucja-kuti-u-kategoriji-posebnog-ornitološkog-rezervata/>, pristupljeno: 5.6.2019.

<http://natura2000.dzpz.hr/reportpublish/reportproxy.aspx?paramSITECODE=HR2001315>, pristupljeno: 30.6.2019.

<http://www.bioportal.hr/gis/>, pristupljeno: 30.6.2019.

<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=41489>, pristupljeno: 30.6.2019.

<http://prirodahrvatske.com/jezero/>, pristupljeno: 30.6.2019.

www.iucnredlist.org, pristupljeno: 18.7.2019.

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Dora Žigrović

Mjesto rođenja: Zagreb

Email: dzigrovic@stud.biol.pmf.hr

Obrazovanje:

2017. – 2019. PMF, Biološki odsjek, diplomski studij eksperimentalne biologije – smjer zoologija

2014. – 2017. Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku, preddiplomski studij biologije

2010. – 2014. Opća gimnazija Sveti Ivan Zelina

Radno iskustvo:

srpanj 2017. – kolovoz 2019. rad preko Student Servisa - Zoo city, suradnica u trgovini

lipanj 2018. – srpanj 2019. rad preko Student Servisa - Zagrebačka županija, izvršavanje administrativnih poslova

Aktivnosti vezane uz obrazovanje:

2017. i 2018. Noć biologije

2016. Biolog-i-ja

Vještine:

engleski (aktivno), njemački (pasivno)

vozačka dozvola B kategorije