

# Genska raznolikost populacija endemskih vrsta roda *Delminichthys* (Cyprinidae, Actinopterygii)

---

Rosandić, Sven

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:604907>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Sven Rosandić

**Genska raznolikost populacija endemskih vrsta roda *Delminichthys*  
(Cyprinidae, Actinopterygii)**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

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 magistra eksperimentalne biologije.

## ZAHVALA

---

*Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Buj koja mi je dala priliku raditi na ovako zanimljivom projektu te njenom strpljenju, stručnošću, voditeljstvu i pomoći pri radu u laboratoriju i na računalu.*

*Hvala dr. sc. Zoranu Marčiću na pomoći oko izrade potrebne karte, a posebno zahvaljujem asistenticama Luciji Ivić i Luciji Raguž na strpljenju, društvu i pomoći tijekom rada u laboratoriju.*

*Veliko hvala prijateljima s kvarta i kolegama s faksa koji su bili tu kad god mi je trebalo te ogromno hvala mojoj obitelji na strpljenju i pomoći kroz cijeli studij.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Genska raznolikost populacija endemskih vrsta roda *Delminichthys* (Cyprinidae, Actinopterygii)**

Sven Rosandić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Rod *Delminichthys* sadrži četiri vrste koje žive na području Hrvatske i Bosne i Hercegovine. To su: imotska gaovica (*Delminichthys adspersus* Steindachner, 1882), popovska gaovica (*Delminichthys ghetaldii* Heckel, 1843), jadovska gaovica (*Delminichthys jadovensis* Zupančić i Bogutskaya, 2002) te krbavska gaovica (*Delminichthys krbavensis* Zupančić i Bogutskaya, 2002). Ciljevi ovog istraživanja su bili potvrđivanje filogenetskog položaja svih vrsta unutar roda *Delminichthys* te utvrđivanje njihovih međusobnih srodstvenih odnosa, opisivanje intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti, procjena efektivne veličine pojedinih populacija, razine protoka gena između pojedinih populacija te konačno, utvrđivanje mogućih podzemnih migracijskih puteva između populacija istih vrsta. Kako bih analizirao filogenetsku strukturu roda *Delminichthys*, koristio sam programe MEGA-X, PAUP i Network. Metodama najveće parsimonije (MP), najveće vjerojatnosti (ML) i susjednog povezivanja (MJ) su se analizirale sekvence kontrolne regije (CR) i mitohondrijskog gena citokroma *b* (*cyt b*) kako bi se mogla izraditi filogenetska stabla i mreže kojima bi se utvrdila filogenetska struktura ovog roda. Potvrđena je struktura roda na četiri vrste, a pomoću programa DnaSP i MIGRATE su otkriveni visoki genski poliformizam na intraspecijskoj i intrapopulacijskoj razini, efektivne veličine populacija te protok gena između njih.

(53 stranice, 19 slika, 13 tablica, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Delminichthys*, filogenija, citokrom *b*, kontrolna regija, genska raznolikost

Voditeljica: dr. sc. Ivana Buj, doc.

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Buj, doc.

dr. sc. Duje Lisičić, izv. prof.

dr. sc. Zlatko Liber, prof.

Rad prihvaćen: 2.9.2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **Genetic diversity of the populations of endemic *Delminichthys* species (Cyprinidae, Actinopterygii)**

Sven Rosandić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Genus *Delminichthys* consists of four species that live on the territory of Croatia and Bosnia and Herzegovina. Those are: spotted minnow (*Delminichthys adspersus* Steindachner, 1882), southern dalmatian minnow (*Delminichthys ghetaldii* Heckel, 1843), jadova minnow (*Delminichthys jadovensis* Zupančič i Bogutskaya, 2002) and krbava minnow (*Delminichthys krbavensis* Zupančič i Bogutskaya, 2002). The aims of this study were confirming the phylogenetic position of all species within the *Delminichthys* genus and the phylogenetic relationships between them, the determination of the intraspecific and intrapopulation diversity, the estimation of the effective population sizes, rates of gene flow between the populations and finally, the determination of the possible underground migratory routes between the populations of the same species. In order to analyze the phylogenetic structure of the *Delminichthys* genus, I used programs MEGA-X, PAUP and Network. The sequences of the control region (CR) and the mitochondrial gene for the cytochrome *b* (*cyt b*) were analyzed with the maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and median-joining (MJ) methods in order to build the phylogenetic trees and the networks that would confirm the phylogenetic structure of this genus. I confirmed the structure of four species within the genus, and with the use of the programs DnaSP and MIGRATE, I discovered that the genetic polymorphism on both intraspecific and intrapopulation levels were high, while also determining their effective population sizes as well the gene flow between their populations.

(53 pages, 19 figures, 13 tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: *Delminichthys*, phylogeny, cytochrome *b*, control region, genetic diversity

Supervisor: Dr. sc. Ivana Buj, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Ivana Buj, Asst. Prof.

Dr. sc. Duje Lisičić, Asst. Prof.

Dr. sc. Zlatko Liber, Prof.

Thesis accepted: 2.9.2021.

## SADRŽAJ

---

1. UVOD .....	1
1.1. Bioraznolikost .....	1
1.2. Slatkovodna ihtiofauna u Hrvatskoj .....	3
1.3. Korist i ugroženost slatkovodne ihtiofaune .....	4
1.4. Značajke roda <i>Delminichthys</i> .....	7
1.4.1. Značajke vrste <i>Delminichthys adpersus</i> (Steindachner, 1882) .....	8
1.4.2. Značajke vrste <i>Delminichthys ghetaldii</i> (Heckel, 1843) .....	9
1.4.3. Značajke vrste <i>Delminichthys jadovensis</i> (Zupančič i Bogutskaya, 2002) .....	10
1.4.4. Značajke vrste <i>Delminichthys krbavensis</i> (Zupančič i Bogutskaya, 2002) .....	10
1.5. Značajke mitohondrijske DNA .....	11
1.5.1. Značajke citokroma <i>b</i> i kontrolne regije .....	12
1.6. Filogenija .....	12
1.7. Uvod u filogenetske i populacijsko genske metode .....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	14
3. MATERIJAL I METODE .....	15
3.1. Područje istraživanja .....	15
3.2. Prikupljanje uzoraka .....	22
3.3. Laboratorijske metode .....	25
3.3.1. Izolacija DNA .....	25
3.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....	26
3.3.3. Srađivanje sekvenci .....	28
3.3.4. Filogenetska rekonstrukcija .....	29
3.3.5. Intraspezijska i intrapopulacijska raznolikost .....	30
3.3.6. Protok gena .....	30
3.3.7. Efektivna veličina populacije .....	30
4. REZULTATI .....	31
4.1. Filogenetsko stablo i mreža .....	31
4.2. Intraspezijska i intrapopulacijska raznolikost .....	37
4.3. Protok gena i efektivna veličina populacija .....	39
5. RASPRAVA .....	41

6. ZAKLJUČAK.....	47
7. LITERATURA .....	48
8. ŽIVOTOPIS.....	55



# 1. UVOD

## 1.1. Bioraznolikost

Bioraznolikost je ukupna raznolikost živog svijeta na svim razinama, od gena do ekosustava, uključujući ne samo raznolikost između vrsta, nego i raznolikost između samih populacija istih vrsta (Frankham i sur. 2002). Na bioraznolikost najviše utječe genetička raznolikost koja, zahvaljujući ponajviše genetičkoj varijabilnosti te evolucijskim silama, dovodi do promjena i prilagodbi organizama na okoliš (Stange i sur. 2021). Raznolikost se stoga kroz vrijeme mijenja, a te promjene mogu biti i brze i spore. Čak i kod brzih promjena, bioraznolikost uvijek teži ravnoteži a dokaz tome je činjenica da nakon velikih izumiranja dolazi do perioda povećane diversifikacije (Purvis i Hector 2000).

Genetička raznolikost proizlazi iz evolucije do koje dolazi iz različitih razloga, poput pojave novih ili promjene već postojećih bolesti, različitih nametnika i parazita, pojave kompetitora i predatora te različitih okolišnih promjena poput pojave ozonskih rupa, efekta staklenika, zagađenja i sl. (Frankham 1996). Te promjene dovode do evolucije na način da se mutacije koje nastaju spontano, a pridonesu opstanku organizma u novonastalim uvjetima, prenesu na potomke bolje prilagođenih jedinki te time povećaju ukupnu gensku zalihu (eng. *gene pool*). Mutacije se zbog toga smatraju glavnim uzrokom genetičke varijabilnosti, a samim time i bioraznolikosti. Te male i nagle promjene mogu utjecati na jedan alel, ali i na cijele dijelove kromosoma, te se obično događaju tijekom replikacije DNA ili kao rezultat greške tijekom mejoze. Najčešće mutacije na jednom alelu su supstitucija, adicija te delecija nukleotida, duplikacija te insercija pokretnih DNA segmenata, transpozona. Najčešće kromosomske mutacije su duplikacija, delecija, inverzija, translokacija te poliploidija (Frankham i sur. 2002). Razina genetičke varijacije unutar vrste predstavlja ravnotežu između mutacije, genetičkog drifta i prirodne selekcije, koja tu varijaciju kroz vrijeme može povećati, ali i smanjiti ukoliko se fokusira na određeni alel iz bilo kojeg razloga (Frankham 1996).

Na genetičku raznolikost, pa samim time i na bioraznolikost, također utječu i faktori poput veličine organizma, populacija i staništa. Što je veće stanište na kojem živi neka vrsta te što su veće njezine populacije, to će biti i veća genetička raznolikost. Samim time, što je manja

populacija, manja je i raznolikost, kao što je slučaj kod ugroženih te otočnih vrsta (Frankham 1996).

Za čovjeka, bioraznolikost je iznimno važna, ne samo zbog toga što smo i sami dio Zemljinih ekosustava, nego i zbog svih prirodnih resursa koje koristimo, a rezultat su bioraznolikosti. Neke od osnovnih resursa su hrana, energija, različiti materijali koji se koriste za građevinsku industriju te resursi koji su neophodni za medicinu i biokemijsku industriju. Međutim, bioraznolikost ima ulogu i u brojnim, naizgled neprimjetnim procesima. Tako su neki mikroorganizmi iznimno važni za regulaciju čistoće zraka, proizvodnju kisika, te pročišćivanje vode. Zbog tih i mnogih drugih razloga, važno je ne samo očuvati prirodna staništa, nego i bioraznolikost unutar njih (Stange i sur. 2021).

Kako bi se bioraznolikost očuvala, često ju je potrebno moći izmjeriti. Međutim, ne postoji jedan, univerzalan način za izražavanje mjere bioraznolikosti na nekom prostoru. Bioraznolikost nekog prostora se najčešće mjeri brojem vrsta koje žive na istom području, no to ne znači da je prostor s više vrsta biološki raznolikiji od prostora s manje vrsta. U obzir se trebaju uzeti i omjeri veličina njihovih populacija jer postoje područja gdje, iako postoji više vrsta, jedna vrsta brojčano nadmašuje ostale vrste. To je bitno kod usporedbe različitih područja i njihovih bioraznolikosti, pogotovo kada se odlučuje o zaštiti pojedinih područja te o tome koja su područja prioritarna (Purvis i Hector 2000).

Da je zaštita životinja i biljaka zaista potrebna, pokazuje i podatak da se preko 50% vrsta kralješnjaka i 12.5% vrsta biljaka smatraju ugroženima. IUCN, odnosno Međunarodna udruga za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava, svakoj vrsti pridružuje određenu kategoriju koja opisuje stupanj njezine ugroženosti ili neugroženosti. Kada pričamo o ugroženosti, najbitnije kategorije su osjetljiva (VU), ugrožena (EN) te kritično ugrožena (CR) (Frankham i sur. 2002). Kada pričamo o ribama, prema podacima IUCN-a iz 2021., pretpostavlja se da u svijetu postoji 35797 vrsta riba, od kojih je čak 3210 ugroženih (<http://www.iucnredlist.org/>). S povećanjem ljudske populacije te ekonomskog rasta, povećava se i potreba za količinom ribe u različite svrhe, a ponajviše prehrambene. Osim nekontroliranog i prekomjernog izlova, na smanjenje populacija i broja vrsta riba utječu i različite ljudske aktivnosti od kojih su najizraženije gubitak i fragmentacija staništa, promjene vodenih tokova te zagađenje vodenih površina. Sve te aktivnosti dovode to smanjenja broja vrsta i populacija riba, što negativno utječe na cjelokupnu bioraznolikost živog svijeta (Clausen i York 2008).

## 1.2. Slatkovodna ihtiofauna u Hrvatskoj

U svijetu je do danas opisano gotovo 15 000 vrsta slatkovodnih riba, te se zbog njihove slabe istraženosti godišnje otkrije više od 100 novih vrsta. Smatra se da u Europi živi oko 560 vrsta slatkovodnih riba, dok na području Hrvatske obitava oko 140 vrsta slatkovodnih riba. Glavni razlog tome je povoljan geografski položaj Hrvatske koji obuhvaća dva riječna sustava: jadranski i crnomorski, ali i složeni procesi koji su se odvijali u geološkoj prošlosti. Zbog raznolikosti svoje slatkovodne ihtiofaune, Hrvatska je svrstana među jednu od ihtiološki najraznolikijih zemalja Europe te zauzima drugo mjesto u Europi po broju slatkovodnih riba, odmah nakon Turske (Ćaleta i sur. 2015).

Od 140 vrsta slatkovodnih riba na prostoru Hrvatske, 52 ih je endemskih. Endemska vrsta je ona koja živi na malom, često ograničenom prostoru. U slučajevima kada je taj prostor izrazito mali, radi se o stenoendemima. Endemska ihtiofauna Hrvatske se može podijeliti na tri zasebne cjeline: dunavski slijev, jadranski slijev te Jadransko more (Slika 1) (Ćaleta i sur. 2015).



**Slika 1.** Karta s prikazom dunavskog i jadranskog slijeva (Ćaleta i sur. 2015)

Dunavski ili crnomorski slijev Hrvatske nastanjuje 87 vrsta riba, od kojih je 67 autohtonih te 20 alohtonih vrsta. Neke od alohtonih vrsta su unesene dok su se neke samostalno proširile na to područje. 12 vrsta ovog slijeva su endemi. Jadranski slijev nastanjuje 80 vrsta od kojih je 70 autohtonih te 10 alohtonih. 38 vrsta jadranskog slijeva su endemske vrste (Ćaleta i sur. 2015).

Dunavski slijev zauzima 62% površine kopnenih voda Hrvatske, a njime dominiraju rijeke Sava, Drava i Dunav. Raznolikost ihtiofaune ovog područja je najveća u Europi te je to jedini prostor u Europi s većim brojem endema. Nastanjuju ga 103 vrste riba, a značajno je i da je slatkovodna fauna ovog prostora vrlo homogena (Ćaleta i sur. 2015). Jadranski slijev čine tri cjeline, a to su područje istarskih rijeka, Dalmacije te područje Gorskog Kotara i Like. Za područje Istre je značajan mali broj endema, ponajviše zbog manjka trajnih vodotoka, ali i onečišćenja njezinih rijeka (Mrakovčić i sur. 1995). Područje Dalmacije je zbog svoje bogate ihtiološke raznolikosti najzanimljivije hrvatsko, ali i europsko područje. Ovo područje broji gotovo 40 endemskih vrsta riba no zbog čovjekova utjecaja na njihova vrlo specijalizirana staništa, upitan je njihov opstanak. Područje Gorskog Kotara i Like siromašno je autohtonom ihtiofaunom no bogato je stenoendemima. Općenito, rijeke jadranskog slijeva su kratke i izolirane te često teku kroz duboke kanjone, čime stvaraju brojne slapove i jezera. Prolaskom kroz krška polja, te rijeke usporavaju te su im tada obale plitke, a dna korita mekana i obrasla vodenom vegetacijom. Ljeti mogu presušiti dok u jesenjem i proljetnom razdoblju obiluju vodom (Ćaleta i sur. 2015).

Bez obzira na važnost slatkovodne ihtiofaune u Hrvatskoj, brojne skupine riba su vrlo slabo istražene. Njihova rasprostranjenost nije u potpunosti poznata, a taksonomija im se vrlo često mijenja otkrivanjem novih vrsta ili korištenjem boljih, novih i naprednijih molekularnih metoda na temelju kojih se vrste koje su donedavno bile svrstane u jednu vrstu, odvajaju u zasebne vrste (Buj i sur. 2010).

### **1.3. Korist i ugroženost slatkovodne ihtiofaune**

Slatkovodne ribe su zbog preopterećenosti slatkovodnih ekosustava najugroženija skupina kralješnjaka, a neki znanstvenici procjenjuju da bi u idućih 20 godina moglo nestati čak 20% slatkovodnih vrsta riba (Ćaleta i sur. 2015).

Slatkovodna ihtiofauna je značajna iz brojnih razloga. Jedan od njih je i njihova upotreba kao bioindikatora u istraživanju i mjerenju okolišnih stresora i pritisaka koji proizlaze iz ljudske

aktivnosti (Antonović i Treer 2015). Ribe, kroz različite biološke odgovore poput promjene brzine rasta te promjene rasporeda i brojnosti mogu ukazati na probleme poput onečišćenja, degradacije staništa, eutrofikacije, toksičnosti, promjena temperature i dostupnosti hrane (Ćaleta i sur. 2015). Osim toga, slatkovodne ribe su vrlo često i kišobranske vrste koje se koriste u zaštiti cjelokupne faune slatkih voda (Mustafić i Mrakovčić 2017), a bitne su i kao pokusne životinje u različitim znanstvenim istraživanjima zbog velikog fekunditeta, male veličine te jednostavnog i ekonomičnog držanja. Koriste se kao modelni organizam za proučavanje filogenije, specijacije, evolucije, biogeografije i ekologije, a korisne su i u biotehnologiji s ciljem očuvanja kvalitete vode ili uništenja uzročnika pojedinih bolesti kao što su malarija i šistosomijaza. Osim znanstvenog značaja, slatkovodne ribe su kroz povijest bile bitne i kao inspiracija u umjetnosti, literaturi i društvu (Ćaleta i sur. 2015).

Vjerojatno najveća korist slatkovodnih riba za čovjeka je njihov ekonomski značaj, ponajviše u prehrambenoj industriji. One su važan izvor proteina te je radi toga ribarstvo danas jedno od najbitnijih industrija u svijetu. Nažalost, ribarstvo je danas i jedan od uzroka smanjenja raznolikosti ihtiofaune (Ćaleta i sur. 2015). Ribarstvo može uzrokovati i potpuno izumiranje nekih vrsta na nekom području, bez obzira radi li se o komercijalnom ili sportskom ribolovu (Maitland 1995). Prekomjerno ribarstvo i štete koje nanosi se očituju kroz smanjenje ulova te promjene strukture zajednice riba, pa tako u ulovu prevladavaju jedinke male veličine, dok izostaju velike jedinke. Još jedan problem koji uzrokuje promjene u strukturi populacija riba je i unos i širenje stranih, odnosno alohtonih vrsta (Ćaleta i sur. 2015). To su vrste koje su evoluirale na nekom drugom području nakon čega ih je čovjek slučajno ili namjerno svojim aktivnostima prenio u drugo područje. Takve vrste često mogu postati invazivne čime narušavaju bioraznolikost i stabilnost ekosustava područja na koja su prenesena, a mogu dovesti i do izumiranja autohtonih vrsta riba.

Do izumiranja može doći i zbog melioracije te regulacije vodotoka. Vodotoci su povezani na različite načine kroz četiri "dimenzije": longitudinalno (izvor - riječni tok - ušće), lateralno (rijeka - poplavno područje), vertikalno (rijeka - podzemne vode) i vremenski (vremenska ljestvica). Hidrološki i geomorfološki dinamizam koje stvara neki prostor je od velike važnosti za opstanak brojnih vrsta riba, no čovjekov utjecaj ih je na brojnim rijekama smanjio.

Odvajanjem rijeka od poplavnih područja te nestankom laguna, ritova i rukavaca, utječe se na zajednice riba koje to područje koriste kao povremena ili stalna staništa. Problem su i brane

čijom izgradnjom dolazi do prekida riječne cjelovitosti i onemogućavanja longitudinalnih migracija riba (Ćaleta i sur. 2015).

Sve je veći problem i onečišćenje vodotoka, najčešće zbog urbanizacije i industrijalizacije. Njihove posljedice su opterećenost voda otopljenim solima, nutrijentima, teškim metalima, pesticidima i sličnim kemikalijama. Te kemikalije mogu direktno ili indirektno utjecati na ribe, a često mogu uzrokovati i pomore riba (Ćaleta i sur. 2015). U slučaju slatkih voda, često najveća onečišćenja dolaze iz velikih gradova koji u okolne rijeke ispuštaju kemikalije poput pesticida, koji se zbog slabe biorazgradnje akumuliraju u ribama, što ima negativni utjecaj ne samo na ribe, nego i na cijeli okolni ekosustav jer su ribe jedan od glavnih izvora hrane. Tako se kemikalije putem riba ili slobodno u vodi mogu širiti vrlo daleko u područje koje okružuje grad, pogotovo ako postoje podzemni sustavi ili kompleksne sustavi vodotoka koji povezuju okolna područja (Bosnić i sur. 2007). Danas, jedan od potencijalno najvećih problema i prepreka s kojim se susreće slatkovodna ihtiofauna su klimatske promjene. Velike promjene u temperaturi će dovesti do potrebe za migracijom životinja koje za neke vrste riba često neće biti moguće. To se posebno odnosi na stenoendeme poput naših, koji žive na malom području. Takve populacije su često osjetljive i na male promjene u temperaturi te se njihova adaptacija i opstanak ne mogu lako predvidjeti (Jackson i Mandrak 2002).

Razlozi ugroženosti slatkovodne ihtiofaune su brojni, a njezina važnost je velika. Stoga je potrebno prepoznati vrste kojima je zaštita najpotrebnija te provesti uspješnu zaštitu koja se zasniva na tri osnovna načela: znanstvenim spoznajama, zakonodavstvu te upravljanju i provođenju zakona. Ta tri načela djeluju unutar socijalnog, političkog i ekonomskog okvira te ukoliko je njihovo djelovanje usklađeno, zaštita vode može biti uspješna. Procjena stabilnosti i vijabilnosti vrsta i populacija riba je složen zadatak te je uočeno da održanje rijetkih i endemskih vrsta riba zahtijeva stalno nadgledanje i praćenje njihovog stanja (Ćaleta i sur. 2015). To je posebno važno kod vrsta koje imaju male i izolirane populacije jer je kod njih prisutan mali protok gena, zbog čega im je smanjena i genetička raznolikost. Ona dovodi do slabije mogućnosti prilagodbe na promjene u okolišu te im je zaštita i više nego potrebna (Buj i sur. 2021).

#### 1.4. Značajke roda *Delminichthys*

Vrste roda *Delminichthys* su se donedavno ubrajale u rod *Phoxinellus*, no istraživanjima koja su uključivala i molekularne i morfološke analize, zaključeno je da se radi o posebnom rodu. Ime roda je izvedenica od *Delminium*, glavnog grada Ilira iz predrimskog doba na području današnjeg Tomislavgrada i grčke riječi za ribu, *ichthys*. (Freyhof i sur. 2006) Rod sadrži četiri vrste a to su imotska gaovica (*Delminichthys adspersus* Steindachner, 1882), popovska gaovica (*Delminichthys ghetaldii* Heckel, 1843), jadovska gaovica (*Delminichthys jadovensis* Zupančić i Bogutskaya, 2002) te krbavska gaovica (*Delminichthys krbavensis* Zupančić i Bogutskaya, 2002). Radi se uglavnom o malim ribama koje imaju vretenasto, bočno spljošteno tijelo s bočnom prugom koja može biti cjelovita ili prekinuta te obično završava na repnom dršku (Ćaleta i sur. 2015).

Osnovne morfološke značajke roda po kojima se razlikuju od ostalih riba roda u kojem su prethodno bile svrstane su terminalna ili subterminalna usta, nepravilni točkasti uzorak, veliki postkleitrum, povećan broj prekaudalnih pterigiofora te povećana genitalna kvržica kod ženki (Freyhof i sur. 2006). Među vrstama ovog roda najveća je imotska gaovica, dok su popovska i krbavska gaovica najmanje. Kod nekih vrsta su primijećene razlike u veličinama između populacija na različitim područjima, što je vjerojatno prilagodba na ekološke uvjete (Mustafić i sur. 2017). Inače nastanjuju nizinske krške vodotoke. Tijekom ljetnih mjeseci se povlače u podzemlje ili se zakopavaju u supstrat zbog presušivanja vode, te se u jesen ponovno pojavljuju kada vode nabujaju. Tijekom zime se pak udružuju u jata te miruju u podzemlju. U proljeće ponovno izlaze na površinu te se tada mrijeste i razmnožavaju. Hrane se vodenim beskralješnjacima te se smatra da zbog načina života imaju i razvijene prilagodbe na dulje gladovanje. Sve vrste se smatraju ugroženima, a osnovni razlozi za njihovu ugroženost su fragmentacija i nestajanje njihovih staništa u krškim poljima zbog onečišćenja i isušivanja krških vodotoka te unos alohtonih vrsta (Ćaleta i sur. 2015). Brojni vodotoci se pretvaraju i u ravne kanale, pri čemu se uklanja sva vegetacija, a muljevito dno se zamjenjuje betonskim i kamenim dnom. Takvi kanali su nepovoljni za život te predstavljaju opasnost za opstanak osjetljivih i endemskih vrsta poput onih roda *Delminichthys* (Jelić i Jelić 2015).

Taksonomski položaj vrsta unutar roda *Delminichthys*:

**Carstvo:** Animalia (životinje)

**Koljeno:** Chordata (svitkovci)

**Potkoljeno:** Vertebrata (kralješnjaci)

**Razred:** Actinopterygii (zrakoperke)

**Red:** Cypriniformes (šaranke)

**Porodica:** Cyprinidae (šarani)

**Potporodica:** Leuciscinae

**Rod:** *Delminichthys*

**Vrste:** *Delminichthys adspersus* (Steindachner, 1882)

*Delminichthys ghetaldii* (Heckel, 1843)

*Delminichthys jadovensis* (Zupančič i Bogutskaya, 2002)

*Delminichthys krbavensis* (Zupančič i Bogutskaya, 2002)

#### **1.4.1. Značajke vrste *Delminichthys adspersus* (Steindachner, 1882)**

Imotska gaovica (*Delminichthys adspersus*) je endem jadranskog slijeva te živi na području Crvenog jezera, Rastočkog polja, Matice, Vrljike, Baćinskih jezera, Norina te Neretve. Obično živi u bistroj vodi vodotoka, jezera te izvora rijeka, a tijekom suhih razdoblja i zime vrijeme provode u podzemlju (Slika 2). Mogu doseći dužinu i do 12 cm, a ženke su obično veće od mužjaka (Ćaleta i sur. 2015; Kottelat i Freyhof 2007). Kod imotske gaovice su dokazane i migracije jedinki podzemnim, krškim putevima. Te migracije su bitne za održavanje protoka gena između populacija koje površinski nisu povezane te se time povećava njihova ukupna genska zaliha što dovodi do bolje prilagodbe na promjene u okolišu (Palandačić i sur. 2012).





**Slika 2.** Imotska gaovica (*Delminichthys adspersus*) (Autor: Z. Marčić)

#### **1.4.2. Značajke vrste *Delminichthys ghetaldii* (Heckel, 1843)**

Popovska gaovica (*Delminichthys ghetaldii*) je stenoendem slijeva Trebišnjice te je endem jadranskog slijeva (Slika 3). Može narasti do 13 cm, a njena rasprostranjenost uključuje Popovo polje, Bunu, potok Kasindolk, Dabarsko i Fatničko polje u Bosni i Hercegovini te izvor Omble u Hrvatskoj. IUCN je smatra osjetljivom vrstom te je strogo zaštićena (Čaleta i sur. 2015; Kottelat i Freyhof 2007). Najviše vremena provodi u podzemnim vodama krškog područja, a na površinu izlaze zbog mrijesta tijekom jeseni i proljeća kada dolazi do poplavljanja u okolna, nizinska područja. Tamo provode nekoliko mjeseci te se povlačenjem vode i one vraćaju u podzemlje (Dekić i sur. 2016).



**Slika 3.** Popovska gaovica (*Delminichthys ghetaldii*) (Autor: Z. Marčić)

#### 1.4.3. Značajke vrste *Delminichthys jadovensis* (Zupančič i Bogutskaya, 2002)

Jadovska gaovica (*Delminichthys jadovensis*) je endem jadranskog slijeva ta nastanjuje Jadovu (Slika 4). IUCN ju smatra osjetljivom te je kod nas strogo zaštićena. Kao i ostale vrste ovog roda, obitava čiste vodotoke a zimi zbog niskih vodotoka odlazi u podzemnu vodu ili se skriva u pijesku (Ćaleta i sur. 2015; Kottelat i Freyhof 2007).



**Slika 4.** Jadovska gaovica (*Delminichthys jadovensis*) (Autor: Z. Marčić)

#### 1.4.4. Značajke vrste *Delminichthys krbavensis* (Zupančič i Bogutskaya, 2002)

Krbavska gaovica (*Delminichthys krbavensis*) je stenoendem Krbavskog polja te endem Dunava (Ćaleta i sur. 2019) (Slika 5). Nastanjuje bistre i spore vodotoke te veći dio godine, a pogotovo tijekom lošeg vremena, provodi u podzemnim vodama. Na Crvenom popisu IUCN-a je svrstana kao kritično ugrožena vrsta te je zakonom zaštićena u Hrvatskoj. Kao i ostale vrste ovog roda, mrijesti se u razdoblju između svibnja i srpnja, kada ženke ispuštaju i do 1200 jaja (Mihinjač i sur. 2015).



**Slika 5.** Krbavska gaovica (*Delminichthys krbavensis*) (Autor: Z. Marčić)

### **1.5. Značajke mitohondrijske DNA**

Mitohondriji su stanični organeli koji sudjeluju u proizvodnji energije koja je stanici potrebna za pravilno funkcioniranje, a specifični su i po tome što imaju vlastitu DNA. Mitohondrijska DNA (mtDNA) je cirkularna DNA molekula te u mitohondriju kod svih vrsta životinja osim nekih izuzetaka dolazi u samo jednoj kopiji, dok ukupan broj istih kopija po organelu varira (Wolstenholme 1992).

Mitohondrijska DNA ima određeni broj gena koji kodiraju proteine te je taj broj različit ovisno o vrsti koju se proučava. Tako je primjerice mtDNA vrste *Plasmodium falciparum* (Trager and Jensen, 1976) veličine samo 6 kb te kodira samo 3 proteina, dok vrsta *Reclinomonas americana* Flavin & Nerad, 1993 ima mtDNA veličine 69 kb koja kodira čak 67 proteina (Cooper i Hausman 2007). Kao i svaka DNA molekula, ona prolazi kroz promjene te mutira. Opće mišljenje je da, što je bitnija funkcija određenog djela kodirajuće DNA, to ona sporije evoluirá, međutim to nije slučaj i kod mitohondrijske DNA (Brown i sur. 1979). Ona evoluirá vrlo brzo te nakuplja veliki broj mutacija u relativno kratkom vremenskom periodu. Osim toga, uglavnom se prenosi preko majke pri čemu ne dolazi do rekombinacije. Zbog toga se danas upravo ona najčešće koristi u filogeografskim istraživanjima (Avisé 1998). MtDNA je danas idealan molekularni marker u istraživanjima zbog svog malog genoma jednostavne strukture i organizacije, velikog broja kopija u stanici što njenu izolaciju čini vrlo jednostavnom te zbog svoje mozaične strukture koja na nekim dijelovima mutira brže a na nekima sporije (Zhang i Hewitt 1996).

### 1.5.1. Značajke citokroma *b* i kontrolne regije

Kod filogenetičkih istraživanja te istraživanja vezanih uz populacijsku genetiku riba, najčešće se koriste mitohondrijski gen za citokrom *b* (*cyt b*) i kontrolna regija (CR). Gen za citokrom *b* kodira protein te evoluirao relativno sporo, dok nekodirajuća kontrolna regija evoluirala puno brže. Dapače, smatra se da kontrolna regija, među svim regijama mitohondrijske DNA, ima najveću stopu supstitucijskih mutacija (Tang i sur. 2006).

Citokrom *b* je transmembranski protein mitohondrija. Središnja je komponenta  $bc_1$  kompleksa, enzima koji sudjeluje u lancu prijenosa elektrona, te je neophodan za normalno odvijanje procesa staničnog disanja (Degli Esposti i sur. 1993). Zbog velike dostupnosti početnica potrebnih za umnažanje gena ovog proteina PCR reakcijom, jednostavnog sravnjivanja njegovih DNA sekvenci kod različitih vrsta te mogućnosti jednostavne usporedbe tih sekvenci sa sekvencama iz prethodnih istraživanja, gen citokroma *b* je danas jedan od najčešće korištenih gena za potrebe istraživanja i proučavanja evolucije riba (Kocher i Stepien 1997).

Kontrolna regija mtDNA je nekodirajuća DNA što znači da ne sudjeluje u kodiranju proteina. Ona ima ulogu u kontroli i regulaciji replikacije mtDNA te transkripcije RNK. Dio kontrolne regije zauzima i D-petlja (eng. *D-loop*, *displacement loop*), koja ima specifičnu strukturu kod koje se između dva lanca DNA provlači još jedan, treći lanac DNA. Kontrolna regija je kod riba često vrlo duga te sadrži ponavljajuće segmente. Smatra se da njezina velika varijabilnost proizlazi iz selektivne neutralnosti te je radi toga također korisna u proučavanju evolucije (Kocher i Stepien 1997).

## 1.6. Filogenija

Filogenija je grana biologije koja se bavi proučavanjem evolucije i srodstvenih odnosa između organizama. Ti odnosi se mogu proučavati uz pomoć različitih nasljednih karakteristika, poput morfoloških i genetičkih. Njena osnovna tvrdnja je da postoji stablo koje kroz evoluciju obuhvaća i povezuje sve žive organizme (Wiley i Lieberman 2011).

Takva stabla se zovu filogenetička stabla, a sastoje se od čvorova koji su povezani granama. Čvorovi predstavljaju zajedničke pretke dok grane predstavljaju njihove potomke između kojih postoji određeni stupanj razlike u nekoj karakteristici poput genetičke ili morfološke. Metode kojima se dobivaju stabla su različite, a najčešće se koriste metoda najveće parsimonije,

metoda susjednog povezivanja, metoda najveće vjerojatnosti te Bayesova metoda (Barracough i Nee 2001). Njihova preciznost ovisi o tome koliko se taksonomske jedinice koje se koriste za stablo poklapaju s onima koje su zaista postojale u prošlosti, te o tome je li odvajanje bilo potpuno, bez daljnjeg protoka gena između potomaka. Također je bitno da preci prikazanih potomaka više ne postoje. Ako se ti uvjeti ne mogu zadovoljiti, onda se umjesto stabla može koristiti filogenetska mreža (Emerson i Hewitt 2005).

### **1.7. Uvod u filogenetske i populacijsko genske metode**

Sve metode zahtijevaju sekvence genetskih markera koje iz uzoraka dobivamo umnažanjem pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR reakcija). PCR je molekularna “*in vitro*” metoda kojom se sintetiziraju određene sekvence DNA pomoću dvije oligonukleotidne početnice koje su komplementarne krajevima DNA od interesa. PCR se odvija kroz određeni broj ciklusa tijekom kojih se temperatura preparata konstantno povećava i smanjuje. Povećanjem temperature se vrši denaturacija, odnosno razdvajanje lanaca DNA. Nakon toga se početnice vežu za krajeve lanaca, nakon čega se spuštanjem temperature i djelovanjem polimeraze povezuju nukleotidi za novi, kopirani lanac, odnosno dolazi do elongacije. Ti ciklusi se ponavljaju kako bi na kraju bio dobiven broj isječaka dovoljno velik za daljnje analize (Erlich 1989).

Dobivene sekvence se dalje uređuju u programu BioEdit. To je program koji prihvaća datoteke različitih formata iz kojih iščitava sekvence te omogućuje njihovo sravnjivanje. Također služi i za uređivanje i popravljivanje grešaka u iščitanim sekvencama te za različite druge molekularne analize (Hall i sur. 2011).

DnaSP je program koji može provesti velike genetičke analize na DNA sekvenci te se pritom vrši njihova usporedba. Ovaj program daje detaljan uvid u obrasce i varijacije koji se pojavljuju između analiziranih DNA sekvenci na različitim vremenskim razinama koristeći polimorfne varijante, podatke o divergenciji ili kombinaciji tog dvoje. Na taj način se mogu odrediti intraspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost zadanih vrsta i populacija (Rozas i sur. 2017).

Filogenetska stabla se izrađuju pomoću programa MEGA-X v10.2.4 (Kumar i sur. 2018) i PAUP v4.0a169 (Swofford, 2002) koji za izradu stabala koriste metodu najveće parsimonije (eng. *maximum parsimony*) i metodu najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*). Metoda najveće parsimonije je filogenetska metoda koja podrazumijeva najmanji mogući broj evolucijskih

promjena koje bi kao rezultat dalo dobiveno filogenetsko stablo (Takahashi i Nei 2000), dok metoda najveće vjerojatnosti daje stablo koje je najvjerojatnije dovelo do promatranog seta vrsta, odnosno uzoraka (Jin i sur. 2006).

Efektivna veličina populacije je veličina populacije sposobne za daljnje razmnožavanje te se ona računa pomoću programa MIGRATE 3.7.2 (Beerli 2009). Ovaj program računa populacijske parametre poput efektivne veličine populacija i broja migranata između populacija. To radi pomoću genetičkih podataka kao što su mikrosatelitnih markera i DNA sekvenci (Beerli 2004).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Vrste roda *Delminichthys* žive na vrlo malom području, ali predstavljaju značajan dio bioraznolikosti koja nastanjuje naše područje. Zbog svoje ugroženosti i ograničene mogućnosti prilagodbe na promjene u okolišu, potrebno je provesti istraživanja na njima kako bi se mogle što adekvatnije zaštititi te time spriječiti još veća ugroženost te njihovo izumiranje.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Potvrđivanje filogenetskog položaja svih vrsta unutar roda *Delminichthys*
2. Utvrđivanje intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti
3. Procjena efektivne veličine pojedinih populacija
4. Procjena razine protoka gena između pojedinih populacija
5. Utvrđivanje mogućih podzemnih migracijskih puteva između populacija istih vrsta

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Područje istraživanja

Jedna od specifičnosti Hrvatske je krški reljef. Dapače, smatra se da on prekriva oko pola teritorija Hrvatske (<https://geografija.hr/>). Krš je specifičan reljef kojeg čine topive stijene poput vapnenca. Obilježava ga posebna cirkulacija vode u kojoj dolazi do korozije vapnenca pri čemu se kalcijev karbonat pretvara u kalcijev bikarbonat, koji je topiv u vodi. Korozijom nastaju pukotine koje se proširuju te povezuju, stvarajući kompleksan sustav podzemnih šupljina i kanala koji mogu prodirati duboko u zemlju, čak i ispod morske razine. Krški reljef obiluje različitim površinskim krškim oblicima, a neki od njih su ponikve, škrape, uvale i krška polja. Krški reljef također može biti i gol i pošumljen. Površinski vodeni tokovi koji poniru u tlo kroz krške pukotine se nazivaju ponornicama (<https://www.enciklopedija.hr/>).

Krški reljef je prepoznatljiv i ispod površine tla gdje vodeni tokovi otapaju vapnenac i stvaraju brojne špilje i jame. Špilje su uglavnom horizontalni, neravni sustavi kanala i dvorana. Neke od tih dvorana nemaju prirodne ulaze pomoću kojih bi im čovjek mogao pristupiti te tada govorimo o kavernama. Najčešće postoji jedan glavni kanal koji se i odvaja u brojne bočne kanale koji tvore kompleksan, i često vrlo dugačak špiljski sustav (<https://priodahrvatske.com>).

Krški reljef prekriva dio sjeverozapadne i istočne Hrvatske, no najveći dio hrvatskog krša se nalazi na području Dinarida (<https://geografija.hr/>). Krš Dinarida je u svijetu poznat kao klasični tip krša, te su na njemu provedena i prva znanstvena istraživanja krša. Zbog svojih jedinstvenih prirodnih obilježja i geoloških karakteristika, on danas pripada svjetskoj prirodnoj baštini. Inače, Dinaridi su nastali taloženjem karbonatnih stijena na Jadransko - dinarskoj karbonatnoj platformi. Sedimentacija je trajala 150 milijuna godina, tijekom razdoblja jure i krede. Sudarom struktura bivše Jadransko - dinarske karbonatne platforme sa strukturama Euroazije tijekom mlađeg eocena, došlo je do izdizanja istaloženih karbonatnih stijena te nastajanja planinskog lanca, odnosno današnjih Dinarida (<http://np-krka.hr>).

Dinaridi se protežu kroz središnju i južnu Hrvatsku. Središnju Hrvatsku čine Gorski kotar i Lika. Oni su najviši dio Hrvatske pa ih zato obilježavaju niže temperature i veće količine padalina naspram drugih dijelova Hrvatske. Sami vodeni tokovi Like imaju vrlo veliku važnost za privredni razvoj te su bili glavna osnova tradicionalne energetike sve do novijeg doba. Danas su vode ovog prostora bitne ne samo zbog svog hidroenergetskog potencijala, nego i zbog svog turističkog



potencijala. Svejedno, mora se uspostaviti ravnoteža između prirode i čovjekovog djelovanja kako bi se ovo područje maksimalno očuvalo. Središnja i južna Hrvatska ima sličan krški sastav u kojem prevladavaju vapnenci. Vapnenci središnje Hrvatske su mezozojske i paleogene starosti, dok su vapnenci južne Hrvatske jurske i kredne starosti. Južna Hrvatska, kao i ostala područja Hrvatske prekrivena krškim reljefom, ima malobrojne i relativno duge površinske tokove vode, ali zato obiluje podzemnim vodama (Crkvenčić i sur. 1974).

Slijede opisi lokaliteta s kojih su uzeti uzorci riba za istraživanje.

### **Baćinska jezera**

Baćinska jezera se nalaze na samom jugu Hrvatske, u mjestu Baćina, pokraj grada Ploča te blizu delte rijeke Neretve (Slika 6). To područje čine kriptodepresije koje su ispunjene slatkom vodom, a sastoje se od šest spojenih jezera te jednog odvojenog jezera, a to su Oćuša, Crniševo, Podgora, Sladinac, Šipak, Plitko jezero i Vrbnik. Najveće jezero je Oćuša, a najdublje je Crniševo. Vrbnik je najmanje, te jedino odvojeno jezero. Baćinska jezera su dio ekološke mreže Natura 2000 te samim time i važno područje za divlje svojte i stanišne tipove (<https://zastita-prirode-dnz.hr/>).

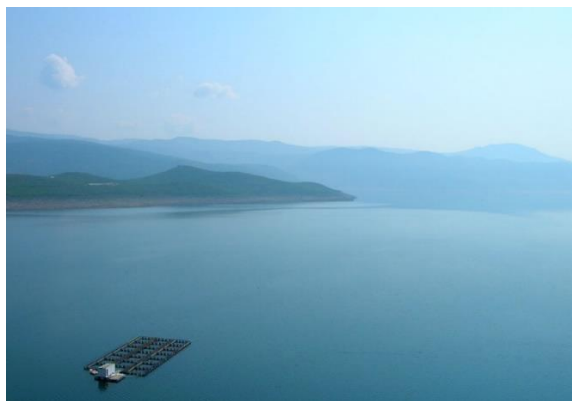


**Slika 6.** Baćinska jezera (Autor: Z. Marčić)



## Bilečko jezero

Bilečko jezero je umjetno jezero na rijeci Trebišnjici (Slika 7). Ima površinu od 33 kvadratna kilometra a dubine je oko 100 metara na najdubljim dijelovima. Dužine je oko 20 kilometra a nastalo je izgradnjom brane Grančarevo 1968. godine (<http://putokaz.me/>).



**Slika 7.** Bilečko jezero (Preuzeto s: [https://hr.wikipedia.org/wiki/Bile%C4%87ko\\_jezero](https://hr.wikipedia.org/wiki/Bile%C4%87ko_jezero))

## Jadova

Jadova je mala rijeka na području Like (Slika 8). Izvire na području Gornje Ploče te je desna pritoka rijeke Like. Njen tok je nestabilan i ima značajne oscilacije. U rano proljeće i kasnu jesen izrazito nabuja (<https://zop-lsz.hr/>), dok tijekom ljeta potpuno presuše pa vrste koje žive u njoj preživljavaju povlačenjem u podzemne vode ili u manjim, lokaliziranim jezercima. (Mustafić i sur. 2008).



**Slika 8.** Jadova (Autor: Z. Marčić)

## **Krbava**

Krbava je rijeka ponornica u Krbavskome polju, a duga je oko 20 kilometara (Slika 9). Izvire na jugoistočnom dijelu polja, blizu sela Visuć, a ponire uz rub središnjeg dijela polja. Ljeti često presušuje (<https://www.enciklopedija.hr/>).



**Slika 9.** Krbava (Autor: Z. Marčić)

## **Matica**

Matica je rijeka ponornica koja prolazi Hrvatskom i Bosnom i Hercegovinom (Slika 10). Duga je oko 14 kilometara te je pritoka rijeke Neretve. Ulijeva se u ponor kod jezera Nuga, a ponekad poplavljuje dijelove Imotskog polja. Obično se u ranu jesen povlači dok u kasno proljeće ponovno poplavljuje okolne nizine (Alerić 1996).



**Slika 10.** Matica (Autor: Z. Marčić)

## **Ombla**

Ombla je rijeka ponornica koja izvire kao dio rijeke Trebišnjice (Slika 11). Ima tipičan estuarij obalnog dijela Hrvatske a dužine je između 30 i 60 metara, ovisno o godišnjem dobu, što je čini jednom od najkraćih rijeka u svijetu, ako ne i najkraćom rijekom (<https://hr.wikipedia.org/>).



**Slika 11.** Ombla (Preuzeto s: <https://bankwatch.org/project/ombla-hydropower-plant-croatia>)

## Prološko blato

Prološko blato je poplavno i močvarno polje u kršu, a nalazi se u zapadnom djelu Imotskog polja (Slika 12). Manji dio tog područja je stalno i duboko jezero dok je ostali dio veći dio godine poplavljen. Dotok vode najviše ovisi o količini padalina. Poplavni dio je djelomično obrastao s vrbom i drugom vegetacijom, dok su uz sam nasip zasađene vrbe koje mu služe kao zaštita (<http://www.moreikrs.hr/>).



**Slika 12.** Prološko blato (Preuzeto s: <https://www.prirodoslovni.hr/>)

## Ravno

Ravno je krško polje u Bosni i Hercegovini, smješteno blizu rijeke Trebišnjice (Slika 13) (<https://hr.wikipedia.org/>).



**Slika 13.** Ravno (Autor: Z. Marčić)



## Sija

Vodotok Sija je odvodni kanal iz Prološke retencije u koji se kontrolirano ispušta voda koja se odvodi u rijeku Vrljiku. Ukupna dužina vodotoka iznosi 7.22 kilometara te se dijeli na više dionica i poddionica. Na jednom dijelu vodotoka su izgrađeni i obrambeni nasipi (<https://www.voda.hr>).

## Vrljika

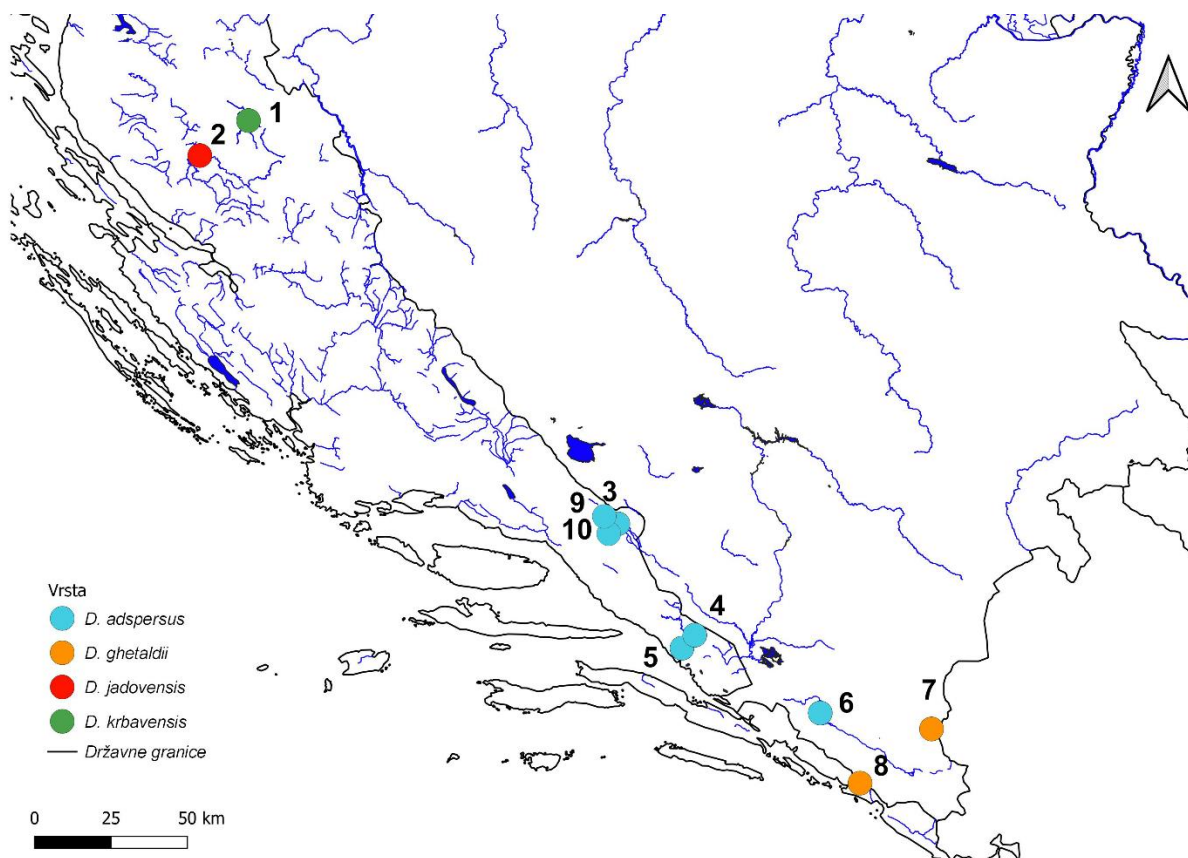
Rijeka Vrljika je imotska ponornica te Neretvina pritoka (Slika 14). Izvire između Glavine i Prološca na izvorima: Dva oka, Utopišće, Opačac, Jauk i Duboka draga. Kroz Imotsko polje prolazi dužinom od 22 kilometra (Dragun i Ujević 2014).



**Slika 14.** Vrljika (Autor: Z. Marčić)

### 3.2. Prikupljanje uzoraka

Uzorke su prethodno prikupili djelatnici Zoologijskog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na području Hrvatske i Bosne i Hercegovine (Slika 15).



**Slika 15.** Karta djelomičnog prikaza Hrvatske i Bosne i Hercegovine s označenim lokacijama na kojima su prikupljeni uzorci za istraživanje. Vrste pronađene na tim lokalitetima su označene bojama, a lokaliteti s brojevima (1 - Krbava, 2 - Jadova, 3 - Prološko blato, 4 - Matica, 5 - Baćinska jezera, 6 - Ravno, 7 - Bilečko jezero, 8 - Ombla, 9 - Vrljika, 10 - Sija).

Ribe su ulovljene pomoću mreža te su s njihovih trbušnih peraja odrezani mali komadići tkiva koji su potom pohranjeni u epruvete s 96%-tnim etanolom. Jedinke su vraćene u vodotok a epruvete su označene kodovima te spremljene u zamrzivač.



**Tablica 1.** Nastavak

Ravno	X = 494898 Y = 5085852	<i>D. ghetaldii</i> <i>D. adspersus</i>	DERA1 DERA3
Jadova	X = 418054 Y = 4932982	<i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i> <i>D. jadovensis</i>	DEJA1 DEJA2 DEJA3 DEJA4 DEJA5 DEJA6 DEJA7 DEJA8 DEJA9 DEJA10 DEJA11 DEJA12 DEJA13 DEJA14
Krbava	X = 442721 Y = 4933539	<i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i> <i>D. krbavensis</i>	DEKR1 DEKR2 DEKR3 DEKR4 DEKR5 DEKR11 DEKR7 DEKR8 DEKR9 DEKR6 DEKR12 DEKR13 DEKR14 DEKR15
Bilečko jezero	X = 657570 Y = 4745298	<i>D. ghetaldii</i> <i>D. ghetaldii</i> <i>D. ghetaldii</i> <i>D. ghetaldii</i> <i>D. ghetaldii</i> <i>D. ghetaldii</i> <i>D. ghetaldii</i> <i>D. ghetaldii</i> <i>D. ghetaldii</i> <i>D. ghetaldii</i>	DEAD1 DEAD2 DEAD3 DEAD4 DEAD5 DEAD6 DEAD7 DEAD8 DEAD9 DEAD10



**Tablica 1. Nastavak**

Ombla	X = 634083 Y = 4727431	<i>D. ghetaldii</i>	DEOM2
		<i>D. ghetaldii</i>	DEOM3
		<i>D. ghetaldii</i>	DEOM4
		<i>D. ghetaldii</i>	DEOM5
		<i>D. ghetaldii</i>	DEOM6
		<i>D. ghetaldii</i>	DEOM7
		<i>D. ghetaldii</i>	DEOM8
		<i>D. ghetaldii</i>	DEOM9
		<i>D. ghetaldii</i>	DEOM10

### 3.3. Laboratorijske metode

#### 3.3.1. Izolacija DNA

DNA sam izolirao iz izrezanih komadića peraja riba pomoću kemikalija iz kompleta za izolaciju DNA, “DNeasy Blood and Tissue”, prema protokolu koji je došao s kompletom, a koji sam malo prilagodio prema potrebi. Komadići peraja su prethodno bili spremljeni u male Eppendorf epruvetice, odnosno epruvetice, u zamrzivaču. Za potrebe izolacije DNA sam pripremio nove epruvetice koje sam označio jednim slovom i brojem. Cijeli proces sam ponavljao više puta te sam svaki put koristio sljedeće slovo abecede kako ne bi došlo do pogreške u praćenju i popisivanju uzoraka. Nakon pripreme novih epruvetica, škalicama sam izrezao maleni komadić svakog uzorka peraje, veličine nekoliko milimetara, te sam ga prebacio u novu epruveticu. Nakon svakog rezanja uzorka sam škalice i pincetu prebrisao papirnatim ubrusom kako ne bi došlo do kontaminacije. Zatim sam prema prethodno spomenutom protokolu koji je došao s kompletom kemikalija izolirao DNA kroz sljedeće korake:

1. U nove epruvetice s uzorkom sam dodao 180  $\mu$ l pufera ATL (eng. *ATL Buffer*). ATL pufer služi za razgradnju tkiva uzorka.
2. Zatim sam u epruveticu pipetom dodao 20  $\mu$ l Proteinaze K koja služi za razgradnju staničnih membrana.

3. Uzorke sam stavio u vodenu kupelj na 56 °C te sam ih ostavio preko noći kako bi se tkivo i stanične membrane u potpunosti razgradili.
4. Sljedeći dan sam uzorke najprije stavio na miješalicu na 10-ak sekundi kako bi se sadržaj dobro promiješao te sam dodao 200 µl pufera AL. Pufer AL ima slično djelovanje na tkivo kao i pufer ATL, a sve kako bi se DNA omogućio ulazak u tekućinu. Nakon dodavanja pufera sam epruvetice ponovno stavio na miješalicu na 10-ak sekundi.
5. U epruvetice sam dodao 200 µl etanola te sam sadržaj ponovno pomiješao miješalicom.
6. Iz epruvetice sam ispipetirao 650 µl uzorka i stavio ih u posebne epruvetice s membranom koju sam dobio u QIAGEN kit-u, a koje sam označio isto kao i epruvetice s uzorkom. Nakon svakog prebacivanja sadržaja sam mijenjao nastavke za pipete (tipse) kako ne bi došlo do kontaminacije.
7. Uzorke sam stavio na centrifugu s postavkama od 8000 rpm (eng. *rotation per minute*) na jednu minutu.
8. Donio dio epruvetice s membranom sam bacio, a membranu sam prenio u novi donji dio te sam u takvu epruveticu dodao 500 µl pufera AW1 koji služi za ispiranje uzorka.
9. Uzorke sam ponovno stavio na centrifugu s istim postavkama, na 8000 rpm te na jednu minutu.
10. Zatim sam u epruvetice dodao 500 µl pufera AW2 te sam ih ponovno stavio na centrifugu, ovaj put s postavkama od 14000 rpm na tri minute.
11. Donji dio epruvetice s membranom sam odlio a membranu sam prenio u novu epruveticu koju sam označio pripadajućom oznakom.
12. Uzorcima sam dodao 150 µl pufera AE. Pufer AE utječe na membranu na način da propušta DNA kroz nju.
13. Uzorke sam ostavio jednu minutu na sobnoj temperaturi nakon čega sam ih stavio na centrifugu s postavkama od 8000 rpm na jednu minutu.
14. Membranu sam zatim bacio, a epruvetice s izoliranom DNA sam zatvorio i na njih nalijepio etikete s odgovarajućom oznakom, nakon čega sam ih spremio u zamrzivač.

### **3.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)**

PCR reakcijom (eng. *Polymerase chain reaction*) umnažamo određeni dio sekvence DNA kako bismo ju mogli koristiti u daljnjim analizama. Za PCR je potrebno pripremiti smjesu koja se potom stavlja u PCR uređaj. Potrebna smjesa se sastoji od mješavine kemikalija dobivene od

proizvođača, mješavine početnica i DNA. Mješavina početnica sastoji se od 2 početnice i vode, s time da se umjesto vode, ista količina volumena može zamijeniti volumenom DNA kako bi dobili bolje rezultate. To se obično radi kada uzorka DNA nema mnogo ili dovoljno, ili kada su uzorci iz kojih smo izolirali DNA stari jer se DNA s vremenom oštećuje. Početnice su kratke oligonukleotidne sekvence te su komplementarne krajevima djela DNA koji želimo umnožiti. U ovom istraživanju sam umnažao gen citokroma *b* (*cyt b*) i kontrolnu regiju (CR), a početnice za njih smo nabavili iz tvrtke Macrogen Inc. Ukupni volumen mješavine s uzorkom je 25 µl, od čega je 12.5 µl mješavine kemikalija, 8.5 µl mješavine početnica te 4 µl DNA. Mješavinu početnica sam pripremio miješanjem 2 µl svake od dviju početnica te 4.5 µl vode (Tablica 2. i Tablica 3.).

**Tablica 2.** Popis početnica korištenih za umnažanje gena citokroma *b*

Ime početnice	Sekvenca početnice
GluF	5'-GAA GAA CCA CCG TTG TTA TTC AA-3'
ThrR	5'-ACC TCC RAT CTY CGG ATT ACA-3'

**Tablica 3.** Popis početnica korištenih za umnažanje kontrolne regije

Ime početnice	Sekvenca početnice
L15923	5'-TTA AAG CAT CGG TCT TGT AA-3'
H16500	5'-GCC CTG AAA TAG GAA CCA GA-3'

Nakon što sam izračunao potrebne količine sastojaka, ispipetirao sam ih u epruvice te ih sve zajedno stavio u PCR uređaj na postavljeni program koji se sastoji od ciklusa zagrijavanja i hlađenja smjese DNA kako bi se ona umnožila. Programi za različite gene se mogu razlikovati jer su drugačiji uvjeti optimalni za različite genetske markere. U ovom istraživanju, uvjeti PCR reakcije za citokrom *b* i kontrolnu regiju su isti (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Uvjeti PCR reakcije za gene citokrom *b* i kontrolnu regiju

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
------------	---

Nakon završene PCR reakcije, njezinu uspješnost sam provjerio pomoću elektroforeze na agaroznom gelu. Elektroforeza na gelu je tehnika pomoću gela na kojem se odvajaju fragmenti DNA, RNA ili proteina pomoću električnog polja koje se stvara u aparaturi za elektroforezu. DNA, RNA i proteini su električno nabijene molekule koje se u takvom gelu na koji djeluje električno polje pomiču u smjeru pozitivne anode ovisno o veličini molekule, pa se tako manje molekule kreću brže dok se veće molekule kreću sporije.

Najprije sam pripremio 1%-tni agarozni gel na način da sam u Erlenmeyerovu tikvicu stavio dvije tablete agaroze i 100 ml TAE pufera. Smjesu sam ostavio četiri minute na sobnoj temperaturi kako bi se tablete otopile. Tikvicu sam zatim lagano pomiješao i potom zagrijao u mikrovalnoj pećnici na dvije minute. Nakon toga sam je izvadio iz pećnice i ostavio na sobnoj temperaturi pet minuta kako bi se ohladila. U tikvicu sam dodao oko 7  $\mu$ l boje za gel te je dobro promiješao kružnim pokretima. Takav gel sam ulio u kadicu koja je dio aparature za elektroforezu a samu kadicu sam stavio u okvir kako gel ne bi iscurio te sam na predviđena mjesta umetnuo češljice koji su potrebni kako bi se formirale jažice. Gel sam ostavio 20 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se ohladio i stvorio želatinasti gel s jažicama. Češljice sam na kraju izvadio, a kadicu sam uklonio iz okvira. U svaku jažicu sam stavio po 4  $\mu$ l uzorka, a u završnu jažicu, prvu iza zadnjeg uzorka, sam stavio 4  $\mu$ l genskog biljega (eng. *gene ruler*) koji služi kao referenca za veličinu fragmenata koji se ispituje. Potom sam proveo elektroforezu na 120 V, 30 minuta. Gel sam zatim slikao pod UV svjetlom te potvrdio uspješnost PCR reakcije.

Uzorke sam prebacio u nove epruvetice te sam ih poslao na pročišćivanje i sekvenciranje u tvrtku Macrogen Inc.

### 3.3.3. Sravnjivanje sekvenci

Sekvence koje sam dobio su bile različitih dužina i ponegdje s greškama pa sam ih uredio i sravnio u programu BioEdit 7.2.5. Najprije sam provjerio postoje li mjesta na kromatogramu sekvenci gdje se pojavljuju dva nukleotida na istom mjestu, takve sekvence nisam koristio jer se radi o greškama koje daju netočnu sekvencu. Zatim sam provjerio ponavljaju li se igdje nukleotidi zbog greške program u očitavanju sekvence te sam takva mjesta ručno ispravio. Na kraju sam sekvence odrezao na istim mjestima kao i prvu, referentnu sekvencu te sam ih sve spremio u istu

datoteku koju sam koristio za daljnje analize. Na kraju sekvenciranja i sravnjivanja sam sveukupno imao 70 sekvenci kontrolne regije te 84 sekvenci za gen citokroma *b*.

### 3.3.4. Filogenetska rekonstrukcija

Za potrebe filogenetske rekonstrukcije stabala mi je potrebna vanjska grupa kako bi se stabla mogla ukorijeniti. Za stablo izrađeno na temelju sekvenci kontrolne regije sam kao vanjsku grupu koristio DNA sekvencu vrste *Telestes souffia* (Risso, 1827), a za stablo izrađeno na temelju sekvenci gena za citokrom *b* sam kao vanjsku grupu koristio DNA sekvencu vrste *Telestes miloradi* (Bogutskaya, Zupančič, Bogut & Naseka, 2012). Obje sekvence sam izvadio iz Banke Gena.

Pomoću programa DnaSP v6.12.03 (Librado i Rozas, 2009) sam iz sekvenci koje sam sravnio izvukao haplotipove, nakon čega sam od njih izradio filogenetska stabla pomoću programa MEGA-X v10.2.4 (Kumar i sur. 2018) i PAUP v4.0a169 (Swofford 2002).

Za izradu stabla pomoću sekvenci gena citokroma *b* sam koristio program PAUP (Swofford, 2002) a za izradu stabla pomoću sekvenci kontrolne regije sam koristio program MEGA-X (Kumar i sur. 2018). Za oba genetska markera sam izradio stabla pomoću metoda najveće vjerojatnosti (ML) i maksimalne parsimonije (MP). Sve analize su provedene pod heurističkim modelom uz 100 ponavljanja. Početna stabla su uzimana stupnjevitim dodavanjem a samo dodavanje taksi je bilo nasumično. Sva mjesta kodona i sve nukleotidne supstitucije su imale jednaku težinu. Za algoritam izmjene grana je bio postavljen TBR (eng. *tree-bisection-reconnection*), što znači da su se podstabla od glavnog stabla odvajala te su se njihovi krajevi pokušali povezati na sve moguće načine (Takahashi i Nei 2000). Podržanost grananja unutar filogenetskih stabala (eng. *bootstrap*) sam odredio pomoću analize samopodržanja s postavkom od 1000 ponavljanja i 10 replika dodatnih sekvenci. Stabla sam na kraju ukorijenio te im pridodao odgovarajuće vrijednosti podržanosti na čvorištima.

Filogenetsku mrežu na temelju oba genetska markera sam izradio u programu NETWORK 10.2.0.0. (Fluxus Technology Ltd.) metodom susjednog povezivanja (MJ) koristeći prethodno izdvojene haplotipove.

### 3.3.5. Intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost

Intraspecijsku i intrapopulacijsku raznolikost sam analizirao pomoću programa DnaSP v6.12.03 (Librado i Rozas 2009). Izračunao sam niz parametara koji opisuju raznolikost samih vrsta ali i populacija na različitim područjima. Parametri koje sam analizirao su:

1. Broj sekvenci u skupini (N)
2. Broj polimorfnih mjesta (S)
3. Ukupan broj mutacija u setu podataka (Eta)
4. Broj haplotipova (h)
5. Raznolikost haplotipova (Hd)
6. Nukleotidna raznolikost (Pi)
7. Prosječan broj razlika nukleotida (k)

### 3.3.6. Protok gena

Pomoću programa MIGRATE 3.7.2 (Beerli 2009) sam provjerio postoji li protok gena između populacija, odnosno migriraju li jedinke iz jedne populacije u drugu. Napravio sam dvije analize, jednu za gen citokroma *b*, te jednu za kontrolnu regiju. Sve sekvence sam unio u program te sam metodom najveće vjerojatnosti (ML) te kroz računalnu analizu dobio podatke o stopi migracije (M) te sam dobio i vrijednosti za parametar Theta ( $\Theta$ ). Pomoću tih podataka sam izračunao broj migranata (m) prema formuli:  $m = M * \Theta$ .

### 3.3.7. Efektivna veličina populacije

Pomoću podataka o parametru Theta koji sam prethodno dobio u analizi protoka gena, izračunao sam i efektivnu veličinu populacije za svaku od populacija, jednom za gen citokroma *b* a drugi put za kontrolnu regiju. Efektivnu veličinu populacije ( $N_e$ ) sam izračunao pomoću stope mutacije ( $\mu$ ) koja iznosi 0.0000011 i parametra Theta ( $\Theta$ ) prema formuli:  $N_e = \Theta / \mu$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Filogenetsko stablo i mreža

Za kontrolnu regiju ukupno je sekvencirano 70 uzoraka u kojima je pronađeno 18 različitih haplotipova a duljina sekvenci je 320 nukleotida, dok je gen za citokrom *b* bio dug 1140 nukleotida te je za njega sekvencirano 84 uzoraka u kojima su pronađena 43 različita haplotipa (Tablica 5 i 6).

**Tablica 5.** Popis haplotipova za kontrolnu regiju s pridruženim odgovarajućim oznakama haplotipova i kodovima sekvenci s istim haplotipom

Oznaka haplotia	Broj uzoraka unutar haplotipa	Kodovi sekvenci
ADS1	1	DEBA2
ADS2	9	DEBA3, DEBA5, DEMA1, DEMA4, DEMA7, DEMA8, DEMA9, DEMA15, DEMA17
ADS3	1	DEBA4
ADS4	15	DEMA5, DEMA10, DEMA14, DEMA18, DEVR1, DEVR3, DEVR4, DEVR5, DEVR6, DEVR7, DEVR8, DEVR9, DEVR10, DEVR11, DEVR12
ADS5	1	DEMA6
ADS6	2	DEMA13, DEMA16
GHE1	8	DERA1, DEAD2, DEAD4, DEOM3, DEOM4, DEOM5, DEOM8, DEOM9
JAD1	13	DEJA1, DEJA2, DEJA3, DEJA4, DEJA6, DEJA7, DEJA8, DEJA9, DEJA10, DEJA11, DEJA12, DEJA13, DEJA14
JAD2	1	DEJA5
KRB1	2	DEKR1, DEKR15
KRB2	2	DEKR2, DEKR4
KRB3	2	DEKR3, DEKR7
KRB4	5	DEKR5, DEKR8, DEKR9, DEKR12, DEKR14
GHE2	1	DEAD1
GHE3	2	DEAD3, DEAD8
GHE4	1	DEAD9
GHE5	1	DEAD10
GHE6	3	DEOM2, DEOM6, DEOM10

**Tablica 6.** Popis haplotipova za gen citokroma *b* s pridruženim odgovarajućim oznakama haplotipova i kodovima sekvenci s istim haplotipom

Oznaka haplotipa	Broj uzoraka unutar haplotipa	Kodovi sekvenci
GHE1	1	DEAD1
GHE2	1	DEAD2
GHE3	2	DEAD3, DEAD7
GHE4	1	DEAD4
GHE5	1	DEAD5
GHE6	1	DEAD6
GHE7	1	DEAD8
GHE8	1	DEAD9
GHE9	1	DEAD10
GHE10	1	DEOM2
GHE11	5	DEOM3, DEOM4, DEOM7, DEOM8, DEOM9
GHE12	1	DEOM5
GHE13	2	DEOM6, DERA1
GHE14	1	DEOM10
ADS1	1	DERA3
ADS2	15	DEBA2, DEMA1, DEMA2, DEMA5, DEMA6, DEMA7, DEMA10, DEMA12, DEMA15, DEMA17, DEMA18, DEVR1, DEBA3, DEBA5, DERP2
ADS3	2	DEMA3, DEMA16
ADS4	1	DEMA4
ADS5	1	DEMA8
ADS6	1	DEMA9
ADS7	2	DEMA11, DEMA13
ADS8	1	DEMA14
ADS9	2	DEV2, DEV7
ADS10	4	DEV3, DEV4, DEV6, DEV8
ADS11	2	DEV5, DEV12
ADS12	1	DEV9
ADS13	1	DEPB1
ADS14	1	DESII
ADS15	1	DEBA4
KRB1	1	DEKR1
KRB2	3	DEKR2, DEKR7, DEKR11
KRB3	1	DEKR3



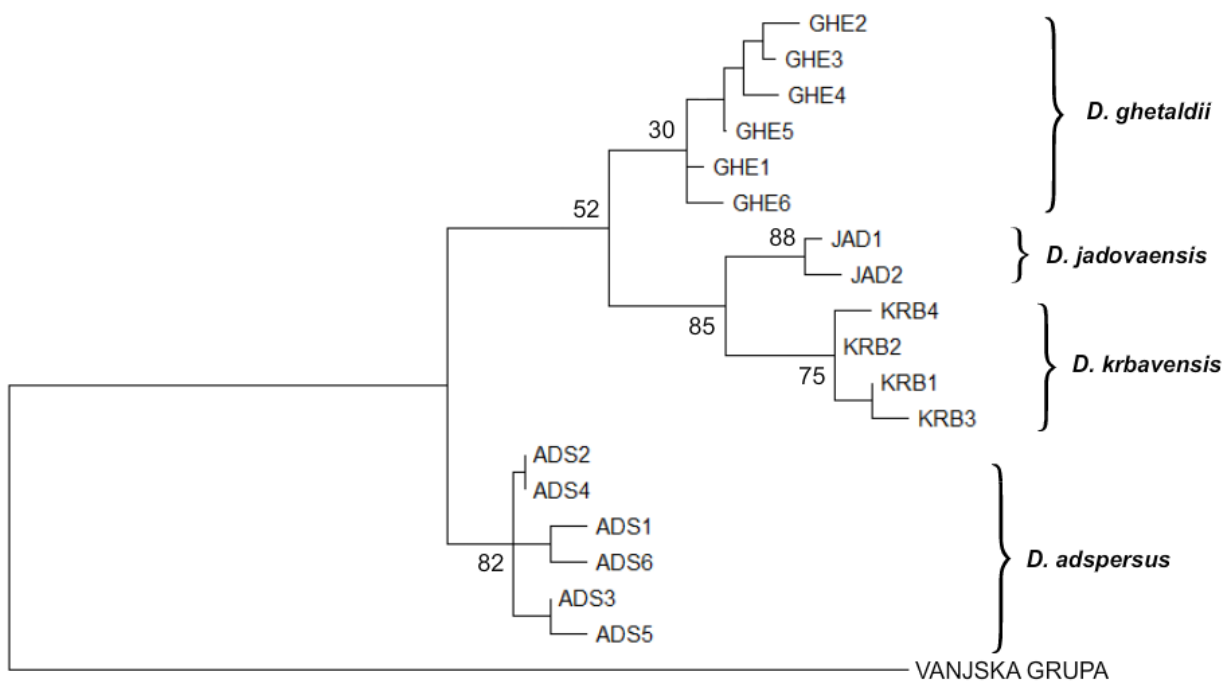
**Tablica 6.** Nastavak

KRB4	1	DEKR4
KRB5	1	DEKR5
KRB6	3	DEKR6, DEKR12, DEKR13
KRB7	2	DEKR8, DEKR14
KRB8	1	DEKR9
KRB9	1	DEKR15
JAD1	6	DEJA1, DEJA3, DEJA4, DEJA5, DEJA9, DEJA13
JAD2	1	DEJA2
JAD3	4	DEJA6, DEJA8, DEJA11, DEJA14
JAD4	2	DEJA7, DEJA10

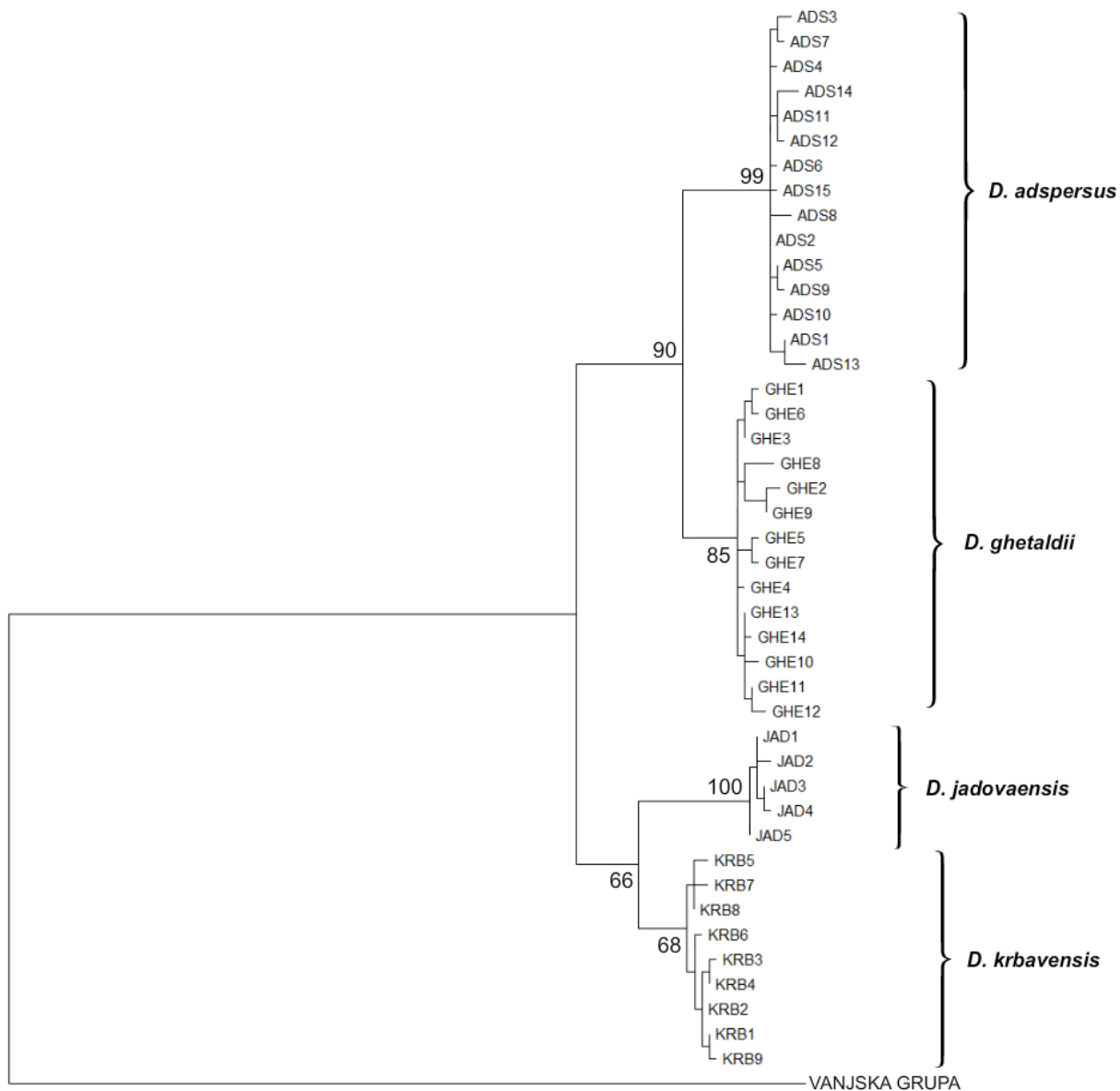
Metodom najveće vjerojatnosti (ML) dobivena su filogenetska stabla na temelju kontrolne regije i gena za citokrom *b* (Slike 16 i 17). Dobivena stabla imaju sličnu topologiju i visoku podržanost stabla.

Kod kontrolne regije, korišteno je 70 sekvenci, među kojima je pronađeno 18 različitih haplotipova. Dužina sekvenci je 320 nukleotida, odnosno parova baza (pb), od kojih je 273 konstantnih, 29 varijabilnih te 18 parsimonijski značajnih. Kod gena za citokrom *b*, korišteno je 1140 parova baza od kojih je 907 konstantnih, 150 varijabilnih te 83 parsimonijski značajnih.

Na oba stabla se jasno grupiraju četiri skupine haplotipova koji predstavljaju četiri različite vrste: *D. adpersus*, *D. ghetaldii*, *D. jadovensis* i *D. krbavensis*. Kod stabla na temelju gena za citokrom *b* se kao sestrinske vrste vide *D. jadovensis* i *D. krbavensis*, odnosno *D. adpersus* i *D. ghetaldii*. Jedina razlika je grananje koje u slučaju gena za citokrom *b* jasno prikazuje dva odvojena pretka iz kojih su evoluirale vrste, dok u slučaju kontrolne regije sestrinske vrsta *D. jadovensis* i *D. krbavensis* dijele istog pretka s vrstom *D. ghetaldii*.

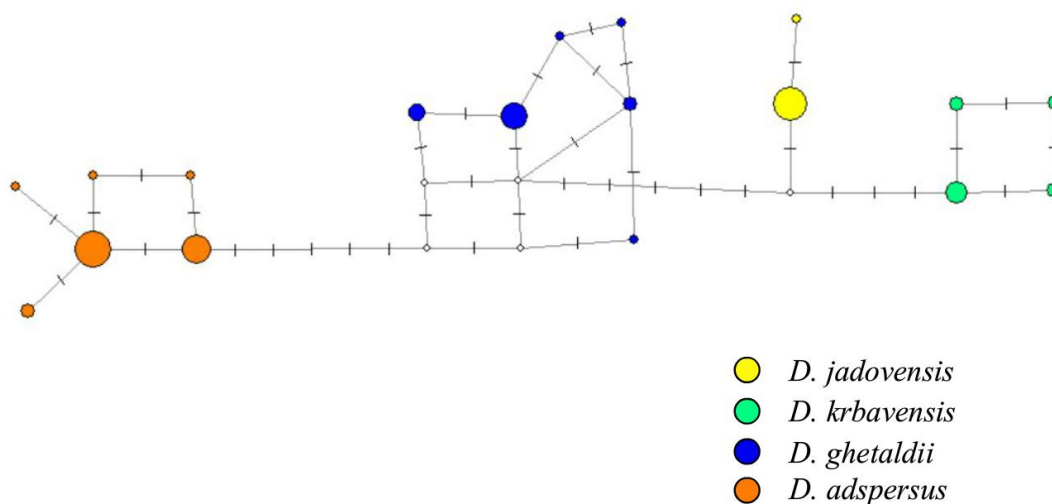


**Slika 16.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (MP) na temelju kontrolne regije u programu MEGA-X (Kumar i sur. 2018). Brojevi na čvorovima označavaju stupanj podržanosti stabla u postocima. Vitičastim zagradama su označeni haplotipovi koji pripadaju pojedinoj vrsti.

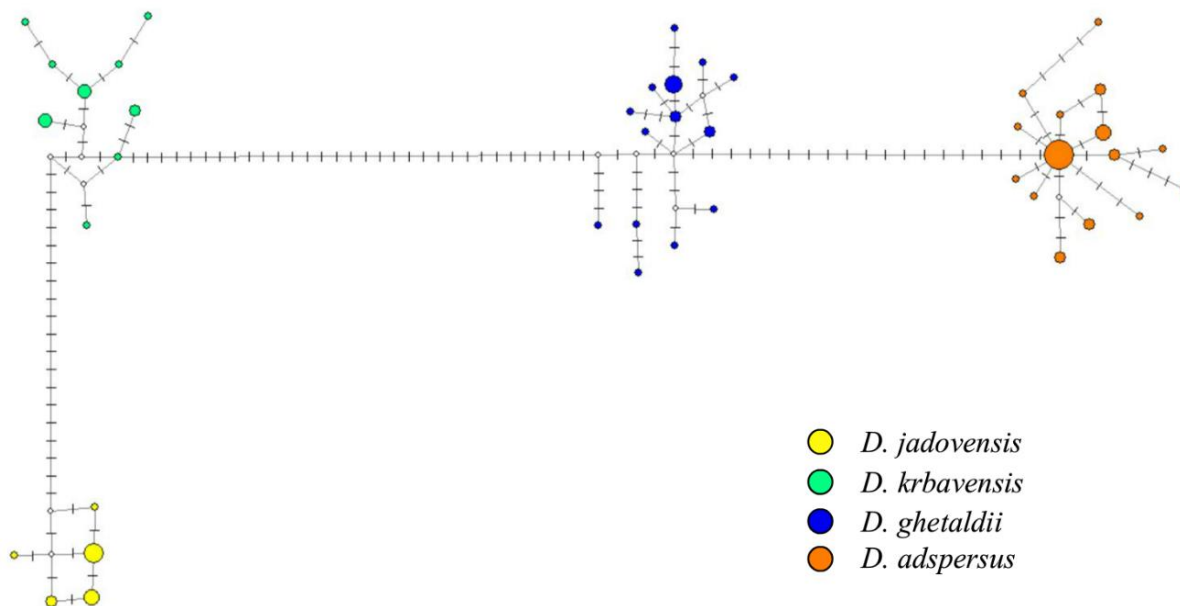


**Slika 17.** Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (MP) na temelju gena za citokrom *b* u programu PAUP (Swofford 2002). Brojevi na čvorovima označavaju stupanj podržanosti stabla u postocima. Vitičastim zagradama su označeni haplotipovi koji pripadaju pojedinoj vrsti.

Pomoću programa MIGRATE 3.7.2 (Beerli 2009), metodom susjednog sparivanja (MJ) dobio sam filogenetsku mrežu roda *Delminichthys*. Napravljene su dvije mreže, jedna na temelju mitohondrijskog markera kontrolne regije a druga na temelju gena za citokrom *b* (Slike 18 i 19). Na mreži, kao i na stablima, je vidljivo da je rod jasno podijeljen na četiri grupe haplotipova koje predstavljaju četiri različite vrste. Neki haplotipovi su učestaliji od drugih, što je prikazano veličinom krugova.



**Slika 18.** Filogenetska mreža izrađena metodom susjednog sparivanja (MJ) na temelju genetskog markera kontrolne regije. Veličina krugova označava brojnost uzoraka unutar jednog haplotipa, a njihova boja označava vrstu kojoj krug pripada. Bijeli kružići predstavljaju pretpostavljene haplotipove zajedničkih potomaka koji nisu pronađeni među uzorcima, a kratke crtice označavaju mutacijske korake između haplotipova.



**Slika 19.** Filogenetska mreža izrađena metodom susjednog sparivanja (MJ) na temelju gena za citokrom *b*. Veličina krugova označava brojnost uzoraka unutar jednog haplotipa, a njihova boja označava vrstu kojoj krug pripada. Bijeli kružići predstavljaju pretpostavljene haplotipove zajedničkih potomaka koji nisu pronađeni među uzorcima, a kratke crtice označavaju mutacijske korake između haplotipova.

#### 4.2. Intraspecijska i intrapopulacijska raznolikost

Odvojenim analizama sekvenci kontrolne regije i gena za citokrom *b* su izračunate mjere genskog polimorfizma na intraspecijskoj (Tablice 7 i 8) i intrapopulacijskoj razini (Tablice 9 i 10). Kod sekvenci oba gena najviše haplotipova je pronađeno kod vrsta *D. adspersus* i *D. ghetaldii*, dok najveću raznolikost haplotipova, kao i nukleotidnu raznolikost, imaju *D. krbavensis* i *D. ghetaldii*. Na razini populacija, najviše haplotipova je pronađeno u populacijama Matice i Bilećkog jezera. Za sve analizirane mjere, najvišu vrijednost ima populacija Bilećkog jezera. Na lokalitetu Jadova živi jedino vrsta *D. jadovensis*, dok na lokalitetu Krbava živi jedino vrsta *D. krbavensis*, te su to jedini lokaliteti na kojima te vrste žive unutar promatranih lokaliteta u ovom istraživanju. Stoga je u tim slučajevima intrapopulacijski genski polimorfizam jednak intraspecijskom. Zbog toga su ti lokaliteti isključeni iz analize za genski polimorfizam jer bi im vrijednosti bile iste kao i

kod njihovih vrsta. Sekvence kontrolne regije dobivene iz uzoraka prikupljenih sa lokaliteta Prološko blato, Sija i Ravno, te sekvence gena za citokrom *b* dobivene iz uzoraka prikupljenih sa lokaliteta Prološko blato, Sija, Ravno i Baćinska jezera su isključene iz analize jer zbog malog broja uzoraka s tih lokaliteta ne bi mogli dobiti realne vrijednosti genskog polimorfizma.

**Tablica 7.** Mjere genskog polimorfizma unutar vrsta roda *Delminichthys* na temelju kontrolne regije (N - broj sekvenci u skupini, S - broj polimorfnih mjesta,  $\eta$  - ukupan broj mutacija u setu podataka, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova,  $\pi$  - nukleotidna raznolikost, k - prosječan broj razlika nukleotida).

Vrsta	N	S	$\eta$	h	Hd	$\pi$	k
<i>D. adspersus</i>	29	4	4	6	0.65	0.00251	0.803
<i>D. jadvovensis</i>	14	1	1	2	0.143	0.00045	0.143
<i>D. krbavensis</i>	11	2	2	4	0.764	0.00318	1.018
<i>D. ghetaldii</i>	15	4	5	6	0.762	0.00438	1.4

**Tablica 8.** Mjere genskog polimorfizma unutar vrsta roda *Delminichthys* na temelju gena za citokrom *b* (N - broj sekvenci u skupini, S - broj polimorfnih mjesta,  $\eta$  - ukupan broj mutacija u setu podataka, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova,  $\pi$  - nukleotidna raznolikost, k - prosječan broj razlika nukleotida).

Vrsta	N	S	$\eta$	h	Hd	$\pi$	k
<i>D. adspersus</i>	32	21	21	13	0.823	0.00191	2.179
<i>D. jadvovensis</i>	14	4	4	5	0.758	0.00103	1.176
<i>D. krbavensis</i>	14	12	12	9	0.923	0.00299	3.407
<i>D. ghetaldii</i>	19	24	24	14	0.936	0.00374	4.269

**Tablica 9.** Mjere genskog polimorfizma unutar pojedinih populacija vrsta roda *Delminichthys* na temelju kontrolne regije (N - broj sekvenci u skupini, S - broj polimorfnih mjesta,  $\eta$  - ukupan broj mutacija u setu podataka, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova,  $\pi$  - nukleotidna raznolikost, k - prosječan broj razlika nukleotida).

Lokalitet	N	S	$\eta$	h	Hd	$\pi$	k
Baćinska jezera	4	3	3	3	0.833	0.00469	1.5
Matica	14	3	3	4	0.692	0.00295	0.945
Vrljika	11	0	0	1	0	0	0
Bilećko jezero	7	3	4	5	0.905	0.00461	1.476
Ombla	8	1	1	2	0.536	0.00167	0.536

**Tablica 10.** Mjere genskog polimorfizma unutar pojedinih populacija vrsta roda *Delminichthys* na temelju gena za citokrom *b* (N - broj sekvenci u skupini, S - broj polimorfnih mjesta,  $\eta$  - ukupan broj mutacija u setu podataka, h - broj haplotipova, Hd - raznolikost haplotipova,  $\pi$  - nukleotidna raznolikost, k - prosječan broj razlika nukleotida).

Lokalitet	N	S	$\eta$	h	Hd	$\pi$	k
Matica	18	10	10	7	0.693	0.00146	1.66
Vrljika	10	4	4	5	0.822	0.00136	1.556
Bilećko jezero	10	19	19	9	0.978	0.00468	5.333
Ombla	9	5	5	5	0.722	0.00136	1.556

### 4.3. Protok gena i efektivna veličina populacija

Protok gena je izračunat metodom najveće vjerojatnosti (ML) posebno za svaki genetski marker (Tablica 11). Na temelju analize sekvenci gena za citokrom *b*, utvrđene su migracije između Baćinskih jezera i Matice te Bilećkog jezera i Omble. Analizom sekvenci kontrolne regije nisu dobivene realne vrijednosti pomoću kojih bi se mogao izračunati protok gena.

Efektivne veličine populacija su izračunate posebno na temelju svakog genskog markera (Tablice 12 i 13). Iz analize su zbog nerealne procjene parametra Theta izbačene vrijednosti efektivne veličine populacija iz Bilećkog jezera i Baćinskih jezera kod analize kontrolne regije te iz Baćinskih jezera za gen citokroma *b*. Analiza kontrolne regije ukazala je da su najveće

vrijednosti efektivnih veličina populacija na lokalitetima Matica i Krbava, dok je analiza gena za citokrom *b* ukazala da su najveće vrijednosti efektivnih veličina populacija na lokalitetima Matica, Krbava i Bilećko jezero. Slične vrijednosti na temelju oba genska markera dobivene su za Maticu, Jadovu i Krbavu dok su te vrijednosti vrlo različite za Vrljiku i Omblu.

**Tablica 11.** Protok gena između populacija dobivenih metodom najveće vjerojatnosti (ML) ( $M_{7 \rightarrow 6}$  - iz Omble u Bilećko jezero,  $M_{1 \rightarrow 2}$  - iz Baćinskih jezera u Maticu)

Migracije	Broj migranata (m)
$M_{7 \rightarrow 6}$	8.22
$M_{1 \rightarrow 2}$	41

**Tablica 12.** Prosječna efektivna veličina populacija vrsta roda *Delminichthys* izračunata na temelju sekvenci kontrolne regije

Populacija	Efektivna veličina populacije ( $N_e$ )
Matica	2818.18
Vrljika	22.09
Jadova	909.09
Krbava	4000.00
Ombla	272.73

**Tablica 13.** Prosječna efektivna veličina populacija vrsta roda *Delminichthys* izračunata na temelju sekvenci gena citokroma *b*

Populacija	Efektivna veličina populacije ( $N_e$ )
Matica	2272.73
Vrljika	545.45
Jadova	1272.73
Krbava	2545.45
Bilećko jezero	23000.00
Ombla	2000.00



## 5. RASPRAVA

Ovo je prvo istraživanje koje ciljano istražuje genetsku strukturu i raznolikost roda *Delminichthys* u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini, zbog čega je literatura ograničena. Postojanje ovog roda kao zasebnog je još prije utvrđeno kada se molekularnim metodama analizirao rod *Phoxinellus* koji je tada obuhvaćao i rod *Delminichthys*. Zaključeno je da četiri vrste tog roda pripadaju zasebnoj evolucijskoj liniji te se ta linija taksonomski odvojila kao rod *Delminichthys* (Palandačić i sur. 2012). Ovim istraživanjem se potvrđuje filogenetski položaj svih vrsta tog roda. Analizom sekvenci kontrolne regije i mitohondrijskog gena za citokrom *b*, izradio sam filogenetsko stablo koje jasno pokazuje podjelu roda na četiri vrste: *D. adspersus*, *D. ghetaldii*, *D. jadovensis* i *D. krbavensis*. Stabla izračunata za oba gena pokazuju veliku podržanost na čvorovima iako je ta podržanost nešto manja na stablu izrađenom na temelju kontrolne regije. Uzrok tome je vjerojatno limitiranost analize koja proizlazi iz kraćih sekvenci. Analizirane sekvence gena za citokrom *b* su bile duge 1140 parova baza dok su sekvence kontrolne regije bile duge samo 320 parova baza.

Stabla pokazuju da vjerojatno postoji zajednički predak iz kojeg su se ove vrste razvile. Stablo napravljeno pomoću gena za citokrom *b* sugerira da se linija tog pretka odvojila u dvije sestrinske linije iz kojih su se razvile *D. jadovensis* i *D. krbavensis*, odnosno *D. adspersus* i *D. ghetaldii*. Međutim, postoji i mogućnost da su se iz jednog ancestralnog haplotipa razvili *D. adspersus* i haplotip iz kojeg se odvojila linija *D. ghetaldii* i linija iz koje su se konačno razvile *D. jadovensis* i *D. krbavensis*, kao što to pokazuje stablo napravljeno na temelju sekvenci kontrolne regije. S jedne strane, stablo napravljeno na temelju gena za citokrom *b* ima veću podržanost, dok s druge strane, stablo napravljeno na temelju kontrolne regije, iako ima manju podržanost stabla, bolje objašnjava evolucijske događaje s obzirom na raznolikost haplotipova vrsta te njihovu geografsku raspoređenost. Potrebna se detaljnija istraživanja kako bi se moglo izraditi jasnije filogenetsko stablo te točnije odrediti položaj svih vrsta na njemu.

Pretpostavlja se da se rod *Delminichthys* od roda *Pseudophoxinus* odvojio za vrijeme miocena, te da je ostao zarobljen na području Dalmacije uslijed izdizanja Dinarida (Freyhof i sur. 2006). Vrste *D. adspersus* i *D. ghetaldii* žive na području koje nije bilo pod jačim utjecajem prethodnih ledenih doba te su se bile u mogućnosti neometano razvijati. To objašnjava zvjezdoliki oblik grupe haplotipova vrste *D. adspersus* na filogenetskoj mreži izrađenoj na

temelju gena za citokrom *b*. Čak 15 uzoraka ove vrste ima haplotip ADS2 te su svi ostali haplotipovi proizašli iz njega što sugerira brzu evoluciju koja se dogodila nedavno. Sličnu strukturu ima i vrsta *D. ghetaldii*, što sugerira da su te dvije vrste dugo vremena bile pod pritiskom te se nisu mogle razvijati ili su bile pod snažnim pritiskom koji je izbrisao do tada razvijenu raznolikost. Tek nakon toga, popuštanjem pritiska dolazi do brze divergencije te pojave različitih haplotipova.

Vrste *D. jadovensis* i *D. krbavensis* žive na području koje je vjerojatno bilo zahvaćeno procesima glacijacije. Mnoge skupine riba koje žive na područjima koja su bila zahvaćena glacijacijama imaju vrlo malu gensku raznolikost, najvjerojatnije zbog utjecaja efekta uskog grla. To je naziv procesa tijekom kojeg preživljava samo mali dio populacije, čime se raznolikost često reducira na mali broj nasumično izabranih haplotipova čime se smanjuje mogućnost preživljavanja vrste (Buj i sur. 2017).

Tako je primjerice provedeno istraživanje vezano za efekt uskog grla na vrsti *Sousa sahalensis* (Jefferson and Rosenbaum, 2014). Analizama sekvenci mitohondrijske DNA te mikrosatelita su procijenjene efektivne veličine populacija kroz određeni vremenski period. Promjenom efektivne veličine populacije te vrste kroz vrijeme, utvrđen je efekt uskog grla koji se kod te vrste dogodio prije 50 do 150 generacija, što je dovelo do značajnog smanjenja genske raznolikosti, pa tako i njihove mogućnosti prilagodbe na promjene u ekološkim uvjetima (Parra i sur. 2018). Slično istraživanje se provelo i u Hrvatskoj na vrsti *Cobitis jadovaensis* (Mustafić & Mrakovčić, 2008). Među analiziranim uzorcima je utvrđena niska genska raznolikost, koja je u kombinaciji sa dominacijom jednog haplotipa ukazivala na djelovanje efekta uskog grla na tu vrstu u prošlosti (Buj i sur. 2015).

Iako vrste *D. jadovensis* i *D. krbavensis* nemaju veliku raznolikost samih haplotipova, njihove populacije svejedno imaju veliku gensku raznolikost. Moguće je da su populacije ovih vrsta djelomično bile pod utjecajem glacijacije, dok ostale vrste nisu toliko bile pod njezinim utjecajem jer se led nije prostirao toliko daleko prema jugu. Moguća nepovoljna razdoblja glacijacije vrlo vjerojatno su preživljavale u podzemnim vodama što im omogućava krški reljef koji je poznat po velikim i kompleksnim podzemnim vodenim sustavima (Crkvenčić i sur. 1974). U podzemnim vodama su vjerojatno preživljavale te se neometano razvijale što dokazuju njihove relativno visoke vrijednosti genskog polimorfizma.

Na evoluciju faune koja je živjela na prostoru koji je bio zahvaćen ledom tijekom ledenih doba, općenito su procesi glacijacije imala velik utjecaj, no slatkovodna ihtiofauna je bila pod posebno jakim utjecajem jer slatkovodne ribe vrlo često nemaju mogućnost migracije u staništa pogodnija za preživljavanje. Rijeke i jezera su obično izolirana te ribe ostaju zarobljene na tim područjima. Poznato je da su na području Hrvatske, ali i južnije, na području dinarskog krša, odnosno na jugoistoku Europe, postojali brojni glacijalni refugiji. Na tim područjima su različite vrste preživljavale nepovoljne uvjete koji su bili rezultat periodičnog širenja i povlačenja leda (Csapó i sur. 2020). Neke vrste su u potpunosti izumrle, dok su neke jedva preživjele, no zbog efekta uskog grla i efekta osnivača su često imale male populacije male genetske raznolikosti. Zbog toga mnoge vrste srednje i sjeverne Europe imaju slične, a ponekad čak i identične haplotipove onima u južnoj Europi. Tako je primjerice u Hrvatskoj poznato da je rijeka Dunav bila refugij mnogim vrstama slatkovodnih riba koje su se u postglacijalnom razdoblju ponovno proširile u sjevernije dijelove Europe (Durand i sur. 1999). S obzirom na vrijeme nastanka roda *Delminichthys*, moguće je da se populacija roda *Pseudophoxinus* odvojila netom prije uzdizanja Dinarida.

U nekim istraživanjima je potvrđeno širenje populacija nekih rodova iz južne Europe u srednju i sjevernu Europu. Tako se primjerice kod vrsta roda *Cobitis* pretpostavlja da njihova evolucija i raspostranjenost prati evoluciju sustava Dinaridskih jezera (eng. *Dinaric Lake system*), ponajviše tijekom ranog miocena. To je sustav slatkovodnih jezera na području Dinarida koji je kroz povijest evoluirao. Njegova jezera su neko vrijeme bila povezana što je utjecalo na distribuciju i migraciju životinja koja su u njima živjela (Buj i sur. 2015). Slično istraživanje je provedeno i na vrstama roda *Telestes* te je zaključeno da su se vrste tog roda najvjerojatnije širile s prostora jugoistočne Europe prema sjeveru i zapadu tijekom razdoblja kopnene povezanosti, dok su tijekom razdoblja odvojenosti morem te vrste, odnosno populacije evolucijski divergirale (Buj i sur. 2017).

Moguće je da je prethodno spomenuta populacija roda *Pseudophoxinus* prošla kroz sličnu evoluciju te da je tijekom miocena, nakon izdizanja Dinarida došlo do prekida kontakta te populacije sa izvornom populacijom. U tom slučaju bi uslijed efekta osnivača, tijekom kojeg geografski odvojena populacija u početku gubi svoju gensku raznolikost te konačno oblikuje novu evolucijsku liniju, iz takve populacije mogao nastati rod *Delminichthys*. Za pretpostaviti je da je dio novonastalih populacija migrirao u sjevernija područja no zbog otežanog migriranja

kroz kompleksni dinarski krš, ali i zbog djelovanja glacijacijskih procesa, te su populacije bile ograničene na područjima na kojima danas žive *D. jadovensis* i *D. krbavensis*. One su s vremenom genetički divergirale u te dvije, odvojene vrste. To bi značilo da je moguće da su primjerice krški podzemni prostori koji su povezani s Jadovom i Krbavom služili kao svojevrsni refugiji.

Sve četiri vrste ovog roda imaju visok genski polimorfizam unutar svojih populacija. Kod analiza sekvenci kontrolne regije, raznolikost haplotipova vrsti iznosi između 0.143 i 0.764, dok na temelju analize sekvenci gena za citokrom *b* ona iznosi između 0.758 i 0.936. Sve vrste imaju relativno visok broj polimorfniha mjesta. Najmanje vrijednosti ima vrsta *D. jadovensis*, a moguć razlog tome je areal manji od areala drugih vrsta te manji broj analiziranih uzoraka. Također je moguće da su uzrok tome bila i ledena doba, koja su zbog niske temperature i zaleđenosti na tu vrstu vršile efekt uskog grla, kao što je to bilo i u slučaju istraživanja utjecaja efekta uskog grla na vrstu *C. jadovaensis* (Buj i sur. 2015). Također, sve vrijednosti genskog polimorfizma su manje kod analize na temelju sekvenci kontrolne regije, a razlog tome je najvjerojatnije puno kraća DNA sekvenca, koja kod kontrolne regije iznosi 320 parova baza dok kod gena za citokrom *b* iznosi 1140 parova baza.

Bez obzira na svoju geografsku izoliranost, zbog velikog genskog polimorfizma, vrste ovog roda imaju bolju mogućnost prilagodbe za razliku od vrsta koje imaju mali genski polimorfizam, do te mjere da su primijećene i male morfološke razlike između populacija istih vrsta. Tako primjerice jedinke populacije vrste *D. adspersus* koje žive u Vrljici imaju svijetlo zeleno obojeni leđni dio tijela, dok jedinke populacije iste vrste koje žive u Prološkom Blatu i Matici imaju tamniju zelenu obojenost (Mustafić i sur. 2017).

Vrste *D. adspersus* i *D. ghetaldii* imaju veći broj polimorfniha mjesta, ukupan broj mutacija te broj haplotipova od druge dvije vrste. Ti rezultati su očekivani jer te dvije vrste nastanjuju područje koje nije bile pod toliko jakim glacijacijskim utjecajem. Nalaze se na puno više lokaliteta, odnosno imaju veći areal, a samim time i veće populacije, što im omogućava i veće i brže nakupljanje mutacija, čija je posljedica i razvijanje različitih haplotipova.

Zanimljivo je da je efektivna veličina populacije vrste *D. krbavensis* puno veća od efektivne veličine populacije vrste *D. jadovensis*. Iako je to samo jedan od mogućih razloga zašto su mjere genskog polimorfizma za vrstu *D. krbavensis* veće, te dvije vrste žive na područjima koja su međusobno relativno blizu, pa se postavlja pitanje zašto je razlika populacija toliko

velika. Razlozi tome mogu biti različiti. Moguće je da su uvjeti u Krbavi bolji za razmnožavanje, pa su samim time i njezine populacije riba veće. Također je moguće, s obzirom na to da obje vrste dio vremena provode u podzemlju, da su podzemne vode koje su povezane s Krbavom pogodnije za preživljavanje i razmnožavanje od onih koje su povezane s Jadovom.

Krški reljef je zbog svojeg sustava pukotina jedinstven po tome što ima mogućnost podzemnog povezivanja područja koja inače nisu povezana površinskim vodenim tokovima. U nedavnom istraživanju je vrsta *D. adspersus* korištena u istraživanju povezanosti vodenih površina podzemnim putevima. Analizirani su uzorci različitih područja među kojima su bila i Prološko Blato, Vrljika i Matica. Na temelju molekularnih analiza sekvenci gena za citokrom *b* ustanovljeno je da ne postoji u potpunosti izolirana populacija, što sugerira mogućnost njihove povezanosti podzemnim putevima (Palandačić i sur. 2012). U ovom istraživanju, tri su uzorka ribe ulovljena na lokalitetu Ravno. Dva uzorka su pripadala vrsti *D. adspersus*, dok je treći uzorak pripadao vrsti *D. ghetaldii*, što potvrđuje mogućnost povezanosti površinskih voda ovog područja podzemnim tokovima. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se utvrdilo postoji li zaista podzemna povezanost lokaliteta Ravno s okolnim lokalitetima.

Na temelju analize protoka gena, utvrđene su migracije vrste *D. adspersus* iz Baćinskih jezera u Maticu te vrste *D. ghetaldii* iz Omble u Bilećko jezero. Analiza protoka gena ne utvrđuje migraciju u suprotnom smjeru koji bi bio logičan, pogotovo u slučaju vrste *D. adspersus* pošto se voda iz Matice kreće u smjeru Baćinskih jezera, međutim moguće je da je razlog tome nerealna vrijednost za parametar Theta. Mogućnost da te vrste ipak i aktivno migriraju u suprotnim smjerovima krškim podzemnim putevima postoji te bi se daljnjim istraživanjima ona mogla i potvrditi.

Bez obzira na visok genski polimorfizam vrsta roda *Delminichthys*, činjenica je da su sve četiri vrste endemske te ugrožene. Njihovo preživljavanje je onoliko uspješno koliko to dopuštaju ekološki uvjeti. Glavni razlozi njihove ugroženosti su onečišćenje i isušivanje vodenih površina u kojima žive. Brojni vodotoci su pretvoreni u kanale koji nemaju iste životne uvjete potrebne ovim vrstama za život kao što to imaju njihova izvorna staništa. Njihova staništa su pod stalnim utjecajem fragmentacije a činjenica da brojni vodotoci područja na kojima one žive dio godine presuše dodatno otežava njihovo preživljavanje. Brojna onečišćenja vodotoka, ali i tla, imaju potencijalno negativniji učinak nego što se to isprva čini jer ne možemo točno znati koliko i na koji način se ta onečišćenja šire u podzemlje koje je vrlo važno vrstama ovog roda za

preživljavanje, pogotovo zato što im služi kako bi preživjele nepogodne površinske uvjete poput suša ili preniskih temperatura. Postoje različiti načini kojima bi se ove vrste mogle zaštititi od izumiranja. Potrebno je osmisliti, razviti i implementirati mjere zaštite očuvanja njihovih staništa. Invazivne vrste treba ukloniti, a onečišćenja čim prije sanirati, ukloniti, te uvesti mjere kojima bi se ista spriječila i potencijalno što efikasnije uklonila ukoliko do njih opet dođe. Rod *Delminichthys* je slabo istražen rod pa bi bilo korisno i povećati broj istraživanja na njemu te povećati monitoring njegovih vrsta. Konačno, potrebno je provesti efikasniju edukaciju stanovništva, pogotovo na područjima na kojima ove vrste žive, te pronaći način na koji bi se stanovništvo moglo aktivno uključiti u njihovu zaštitu.

## 6. ZAKLJUČAK

- Potvrđena je jasna struktura roda *Delminichthys* te njegova jasna podijeljenost na četiri vrste: *D. adspersus*, *D. ghetaldii*, *D. jadovensis* i *D. krbavensis*.
- Potvrđeno je postojanje zajedničkog pretka iz kojeg su se razvile vrste ovog roda, vjerojatno u vrijeme miocena.
- Vrste *D. adspersus* i *D. ghetaldii* imaju veliki broj haplotipova što znači da su se kroz povijest nesmetano razvijale.
- Vrste *D. jadovensis* i *D. krbavensis* imaju mali broj haplotipova ali veliki genski polimorfizam što sugerira dobre uvjete njihovog preživljavanja u podzemlju.
- Postoji mogućnost da su podzemne vode koje su u doticaju s rijekama Jadova i Krbava bile svojevrsni refugiji tijekom glacijacijskih procesa.
- Bez obzira na ograničenost njihovog areala, sve četiri vrste imaju visok genski polimorfizam.
- Utvrđene su migracije vrste *D. adspersus* iz Baćinskih jezera u Maticu te vrste *D. ghetaldii* iz Omble u Bilećko jezero.
- Utvrđena je mogućnost povezanosti vodenih površina na kojima žive vrste *D. adspersus* i *D. ghetaldii* podzemnim putevima krškog reljefa na području lokaliteta Ravno.
- Vrste roda *Delminichthys* ugrožavaju fragmentacija, reduciranje te onečišćavanje staništa, prelov te unos invazivnih vrsta.
- Potrebno je razviti mjere zaštite, provesti monitoring i češća istraživanja te uložiti resurse u edukaciju o vrstama ovog roda, kao i o njihovoj ugroženosti.

## 7. LITERATURA

Alerić, D. (1996). Imotski toponimi *Vrlika* ili *Vrljika* i *Matica*. *Rasprave: Časopis Instituta za hrvatski jezik i jezikoslovlje*, 22 (1), 5-15.

Antonović, I., & Treer, T. (2015). A review of freshwater ichthyofauna research published in the Croatian Journal of Fisheries since 1938. *Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo*, 73(4), 176-182.

Avise, J. C. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7(4), 371-379.

Barracough, T. G., & Nee, S. (2001). Phylogenetics and speciation. *Trends in ecology & evolution*, 16(7), 391-399.

Beerli, P. (2004). Migrate documentation. *School of Computational Science and Department of Biological Science. Florida State University, Tallahassee, FL*.

Bosnir, J., Puntaric, D., Smit, Z., Klaric, M., Grgic, M., & Kosanovic, L. M. (2007). Organochlorine pesticides in freshwater fish from the Zagreb area. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 58(2), 187.

Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1967-1971.

Buj, I., Marčić, Z., Čaleta, M., Šanda, R., Geiger, M. F., Freyhof, J., ... & 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.

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., Raguž, L., Marčić, Z., Čaleta, M., Duplić, A., Zanella, D., ... & Karlović, R. (2021). Plitvice Lakes National park harbors ancient, yet endangered diversity of trout (genus *Salmo*). *Journal of Applied Ichthyology*, *37*(1), 20-37.

Buj, I., Vukić, J., Šanda, R., Perea, S., Čaleta, M., Marčić, Z., ... & Mrakovčić, M. (2010). Morphological comparison of bleaks (*Alburnus*, Cyprinidae) from the Adriatic Basin with the description of a new species. *Journal of Vertebrate Biology*, *59*(2), 129-141.

Clausen, R., & York, R. (2008). Global biodiversity decline of marine and freshwater fish: a cross-national analysis of economic, demographic, and ecological influences. *Social Science Research*, *37*(4), 1310-1320.

Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The cell: a molecular approach* (Vol. 4). Washington, DC: ASM press.

Crkvenčić, I., Friganović, M., Pavić, R., Rogić, V., Sić, M. 1974: Geografija SR Hrvatske II, Središnja Hrvatska. Školska knjiga, Zagreb.

Csapó, H., Krzywoźniak, P., Grabowski, M., Wattier, R., Bączela-Spychalska, K., Mamos, T., ... & Rewicz, T. (2020). Successful post-glacial colonization of Europe by single lineage of freshwater amphipod from its Pannonian Plio-Pleistocene diversification hotspot. *Scientific reports*, *10*(1), 1-15.

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

Ćaleta, M., Marčić, Z., Buj, I., Zanella, D., Mustafić, P., Duplić, A., & Horvatić, S. (2019). A review of extant Croatian freshwater fish and lampreys annotated list and distribution. *Croatian Journal of Fisheries*, 77(3), 137-234.

Degli Esposti, M., De Vries, S., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., & Meyer, A. (1993). Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1143(3), 243-271.

Dekić, R., Friščić, J., Ivanc, A., & Kukavica, B. (2016). Characterization of Proteins from Popovo Minnow (*Delminichthys ghetaldii* Steindachner, 1882) Muscle. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(3), 637-642.

Dragun V., Ujević B. (2014): Legende imotskog krša, Agencija za odgoj i obrazovanje; Škola za dizajn, grafiku i održivu gradnju, Zagreb/Split, 2014.

Durand, J. D., Persat, H., & Bouvet, Y. (1999). Phylogeography and postglacial dispersion of the chub (*Leuciscus cephalus*) in Europe. *Molecular ecology*, 8(6), 989-997.

Emerson, B. C., & Hewitt, G. M. (2005). Phylogeography. *Current biology*, 15(10), R367-R371.

Erlich, H. A. (1989). *PCR technology* (Vol. 246). New York: Stockton press.

Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. and McInnes, K. H. (2002) *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge, Cambridge University Press.

Frankham R. (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, 10(6), 1500–1508.

Freyhof, J., Lieckfeldt, D., Bogutskaya, N. G., Pitra, C., & Ludwig, A. (2006). Phylogenetic position of the Dalmatian genus *Phoxinellus* and description of the newly proposed genus *Delminichthys* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(2), 416-425.

Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. (2011). BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, 2(1), 60-61.

Jackson, D. A., & Mandrak, N. E. (2002). Changing fish biodiversity: predicting the loss of cyprinid biodiversity due to global climate change. In *American fisheries society symposium* (str. 89-98). American Fisheries Society.

Jelić, D., & Jelić, M. (2015). *Telestes miloradi* Bogutskaya, Zupancic, Bogut & Naseka, 2012 and *Delminichthys ghetaldii* (Steindachner, 1882) re-discovered in Croatia, requiring urgent protection. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(6), 1133-1136.

Jin, G., Nakhleh, L., Snir, S., & Tuller, T. (2006). Maximum likelihood of phylogenetic networks. *Bioinformatics*, 22(21), 2604-2611.

Kocher, T. D., & Stepien, C. A. (Eds.). (1997). *Molecular systematics of fishes*. Elsevier.

Kottelat, M., & Freyhof, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat.

Librado P., Rozas J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452.

Maitland, P. S. (1995). The conservation of freshwater fish: past and present experience. *Biological Conservation*, 72(2), 259-270.

Mihinjač, T., Marčić, Z., Buj, I., Zanella, D., Mustafić, P., Mrakovčić, M., & Čaleta, M. (2015). Ugrožene vrste riba u svijetu: *Delminichthys krbavensis* (Zupančić & Bogutskaya, 2002)(Cyprinidae). *Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo*, 73(1), 33-34.

Mrakovcic, M., Misetic, S., & Povz, M. (1995). Status of freshwater fish in Croatian Adriatic river systems. *Biological Conservation*, 72(2), 179-185.

Mustafić, P., Buj, I., Opašić, M., Zanella, D., Marčić, Z., Čaleta, M., ... & Mrakovčić, M. (2017). Morphological comparison of *Delminichthys ghetaldii* (Steindachner, 1882), *D. adspersus* (Heckel, 1843), *D. jadovensis* (Zupančić & Bogutskaya, 2002) and *D. krbavensis* (Zupančić & Bogutskaya, 2002), endemic species of the Dinaric karst, Croatia. *Journal of Applied Ichthyology*, 33(2), 256-262.

Mustafić, P., Marčić, Z., Duplić, A., Mrakovčić, M., Čaleta, M., Zanella, D., ... & Dolenc, Z. (2008). A new loach species of the genus *Cobitis* in Croatia. *Folia Zoologica*, 57(1-2), 4-9.

Mustafić, P., & Mrakovčić, M. (2017). Biodiversity status of and threats to freshwater fish of Croatia and Eastern Adriatic Countries. In: Berillis, P. (ed), *Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health*, Bentham Science Publishers-Sjarjah, UAE, str. 23-41.

Palandačić, A., Matschiner, M., Zupančić, P., & Snoj, A. (2012). Fish migrate underground: the example of *Delminichthys adspersus* (Cyprinidae). *Molecular Ecology*, 21(7), 1658-1671.

Parra, G. J., Cagnazzi, D., Jedensjö, M., Ackermann, C., Frere, C., Seddon, J., ... & Krützen, M. (2018). Low genetic diversity, limited gene flow and widespread genetic bottleneck effects in a threatened dolphin species, the Australian humpback dolphin. *Biological Conservation*, 220, 192-200.

Purvis, A., & Hector, A. (2000). Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 405(6783), 212-219.

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.

Stange, M., Barrett, R. D., & Hendry, A. P. (2021). The importance of genomic variation for biodiversity, ecosystems and people. *Nature Reviews Genetics*, 22(2), 1-17.

Swofford D.L. (2002): PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods), Version 4 [Computer software and manual]. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Takahashi, K., & Nei, M. (2000). Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Molecular biology and evolution*, 17(8), 1251-1258.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.

Tang, Q., Liu, H., Mayden, R., & Xiong, B. (2006). Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). *Molecular phylogenetics and evolution*, 39(2), 347-357.

Wiley, E. O., & Lieberman, B. S. (2011). *Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics*. John Wiley & Sons.

Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International review of cytology*, 141, 173-216.

Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in ecology & evolution*, 11(6), 247-251.

### **Internetski izvori:**

<http://www.iucnredlist.org/> (preuzeto 29.6.2021.)

<https://geografija.hr/geomorfologija-krsa-papuka-kap-krsa-u-srcu-slavonije/> (preuzeto 5.8.2021.)

<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=34221/> (preuzeto 5.8.2021.)

<https://prirodahrvatske.com/krsko-podzemlje/> (preuzeto 5.8.2021.)

<http://np-krka.hr/stranice/podzemni-svijet-krsa-dinaridi/610.html/> (preuzeto 5.8.2021.)

<https://hr.wikipedia.org/> (preuzeto 5.8.2021.)

<https://bankwatch.org/project/ombla-hydropower-plant-croatia/> (preuzeto 5.8.2021.)

<https://www.prirodoslovni.hr/> (preuzeto 5.8.2021.)

<https://www.voda.hr/> (preuzeto 5.8.2021.)

<https://zastita-prirode-dnz.hr/> (preuzeto 5.8.2021.)

<http://putokaz.me/> (preuzeto 5.8.2021.)

<https://zop-lsz.hr/> (preuzeto 5.8.2021.)

<http://www.moreikrs.hr/> (preuzeto 5.8.2021.)

## 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci:

Ime i prezime: Sven Rosandić

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje:

2009. - 2013. - X. gimnazija, Zagreb

2013. - 2017. - PMF, Biološki odsjek, preddiplomski studij Znanosti o okolišu, Zagreb

2017. - 2021. - PMF, Biološki odsjek, diplomski studij Eksperimentalna biologija, Modul Zoologija, Zagreb

### Volontiranje:

2013. - 2017. - Zoološki vrt Grada Zagreba

2013. - 2017. - UNICEF

### Profesionalne aktivnosti:

2014. - 2015. - PMF, Botanički zavod - demonstrator na praktičnoj nastavi

2016. - Institut Ruđer Bošković - rad u laboratoriju

2017. - New York University - rad u laboratoriju

2017. - član Nadzornog odbora Udruge studenata biologije (BIUS)

2017. - 2018. - PMF, Zavod za animalnu fiziologiju - rad u laboratoriju

2018. - Akademija regionalnoga razvoja i fondova EU (edukacijski projekt)

2017. - 2019 - osnivač i voditelj Sekcije za genetiku (BIUS)

### Ostalo:

- rad na računalu (Windows, Office)

- jezici: engleski (aktivno), talijanski (pasivno)