

# Genska raznolikost lipljena, *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758) (Actinopteri: Salmonidae) u Hrvatskoj

---

Grlica, Ivan

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:217:860628>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ivan Grlica

**Genska raznolikost lipljena *Thymallus*  
*thymallus* (Linnaeus, 1758) (Actinopteri:  
Salmonidae) u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ivan Grlica

**Genska raznolikost lipljena *Thymallus*  
*thymallus* (Linnaeus, 1758) (Actinopteri:  
Salmonidae) u Hrvatskoj**

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 struke znanosti o okolišu.

## *Zahvala*

*Htio bih se najprije zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc Ivani Buj bez čije pomoći, strpljenja i voditeljstva ovaj rad ne bi bio moguć. Također bi htio zahvaliti asistenticama Luciji Ivić i Luciji Raguž za pomoć u laboratorijskom radu i na računalnim programima.*

*Posebno hvala ide doc. dr. sc. Zoranu Marčiću na pomoć oko podataka za lokalitete i svemu ostalome za vrijeme studiranja.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na strpljenju i ljubavi tijekom mog studiranja, bez čije pomoći ne bi mogao diplomirati.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Genska raznolikost lipljena *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758) (Actinopteri: Salmonidae) u Hrvatskoj Ivan Grlica

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Lipljen, *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758) je slatkovodna riba iz porodice pastrvki (Salmonidae). Naseljava brze, čiste i hladne vode. Vrlo je osjetljiva na promjene u okolišu, zagađenje ili uništenje okoliša. Zbog sve većeg čovjekovog utjecaja na okoliš lipljen je na popisu osjetljivih vrsta (VU) u Crvenoj knjizi slatkovodnih riba u Hrvatskoj u dunavskom slijevu. Budući da nema mnogo provedenih istraživanja lipljena u Hrvatskoj, ciljevi ovoga rada su bili utvrditi srodstvene odnose populacija ove vrste, opisati intraspecijsku strukturu, utvrditi stupanj intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti, odrediti populacije autohtonog porijekla, posljedice poribljavanja i identificirati osobito važne populacije za zaštitu u Hrvatskoj. Provedena je filogenetska rekonstrukcija temeljena na sekvencama mitohondrijskog gena za citokrom *b* pomoću metode najveće parsimonije, metode najveće vjerojatnosti i metode susjednog sparivanja. Pomoću programa DnaSP odredio sam mjere genskog polimorfizma, a stope migracija i efektivnu veličinu između populacija odredio sam pomoću programa Migrate. Rezultati filogenetske rekonstrukcije su pokazali na slabu strukturiranost populacija na području Hrvatske. Utvrđena je niska genska raznolikost i male efektivne veličine populacija. Određene su populacije autohtonog porijekla koje se nalaze u Slunjčici. Utvrđene su i važne populacije za zaštitu koje se nalaze u Kupu i Slunjčici.

(37 stranica, 7 slika, 8 tablica, 33 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: (populacija, vrsta, citokrom *b*, mitohondrij, haplotip, DNA, zaštita )

Voditelj: doc. dr. sc. Ivana Buj

Ocjenitelji:

doc. dr. sc. Ivana Buj

izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

doc. dr. sc. Zoran Marčić

Rad prihvaćen: 15.9.2021

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

### Genetic diversity of the european grayling *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758) (Actinopteri: Salmonidae) in Croatia

Ivan Grlica

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

European grayling, *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758) is a freshwater fish from the trout family (Salmonidae). It inhabits fast, clean and cold waters. It's very sensitive to changes in the environment, pollution or destruction. Due to growing human impact to the environment, it's listed as vulnerable species (VU) in the Red Book of freshwater fish in Croatia in the Danube basin. Since there are not many studies of grayling in Croatia, the objectives of this study were to determine the relationship population of this species, describe the intraspecies structure, determine the degree of intraspecies and intrapopulation genetic diversity, determine populations of indigenous origin, restocking effects and identify particularly important populations for protection in Croatia. Phylogenetic reconstruction was made based on mitochondrial gene sequence for cytochrome *b* was performed using the maximum parsimony, maximum likelihood and median joining method. Using the DnaSP program, I determined measures of gene polymorphism, migration rates and effective size between populations were determined using the Migrate program. The results of phylogenetic reconstruction showed a weak structure of populations in Croatia. Low genetic diversity and small effective population size were found. Populations of autochthonous origins located in Slunjčica have been determined. Important populations for protection located in Kupa and Slunjčica have been identified.

(37 pages, 7 figures, 8 tables, 33 references, original in: Croatia)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: (population, species, cytochrome *b*, mitochondrial, haplotype, DNA, protection )

Supervisor: doc.dr.sc. Ivana Buj

Reviewers:

doc. dr. sc. Ivana Buj

izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

doc. dr. sc. Zoran Marčić

Thesis accepted: 15.9.2021

## SADRŽAJ

---

1. UVOD.....	1
1.1. Raznolikost i osnovne značajke ihtiofaune.....	1
1.2. Biologija i ekologija vrste lipljena <i>Thymallus thymallus</i> (Linnaeus, 1758).....	2
1.2.1. Sistematika lipljena.....	2
1.2.2. Rasprostranjenost, razmnožavanje i morfologija lipljena.....	3
1.2.3. Status ugroženost lipljena.....	5
1.3. Mitohondrijska DNA i gen za citokrom b.....	5
1.4. Filogenetske metode.....	6
1.5. Ciljevi istraživanja.....	7
2. MATERIJALI I METODE.....	8
2.1. Uzorkovanje.....	8
2.2. Područje istraživanja.....	13
2.3. Laboratorijske analize.....	16
2.3.1. Izolacija DNA.....	16
2.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	17
2.3.3. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	18
2.4. Računalne analize.....	18
2.4.1. Sekvenciranje i sravnanje mtDNA (mitohondrijski DNA) gena.....	18
2.4.2. Određivanje intraspecijskog i intrapopulacijskog genskog polimorfizma.....	19
2.4.3 Filogenetska rekonstrukcija.....	19
3. REZULTATI.....	21
3.1. Filogenetski odnosi.....	21
3.2. Interspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost.....	25
3.3. Stopa migracija i efektivna veličina populacija.....	26
4. RASPRAVA.....	29
5. ZAKLJUČAK.....	32
6. LITERATURA.....	33
7. ŽIVOTOPIS.....	37



# 1. UVOD

## 1.1. Raznolikost i osnovne značajke ihtiofaune

Ribe su najraznolikija i najbrojnija skupina kralješnjaka. Od 54 711 vrsta kralješnjaka, 27 977 poznatih je vrsta riba (Nelson 2006). Unatoč maloj površini koje naseljavaju poznato je oko 14 000 slatkovodnih vrsta riba (Kottelat i Freyhof 2007). Zbog velike raznolikosti među ribama i brojnosti različitih vrsta koje danas, a čija je recentna raznolikost i rasprostranjenost određena specifičnom evolucijskom poviješću, teško je definirati što je riba. Jedna od definicija govori da je riba vodeni kralješnjak sa škragama i udovima u obliku peraja (Nelson 2006). Osim toga, teško je razumjeti njihovu evolucijsku prošlost i napraviti konkretnu klasifikaciju zbog velike morfološke i biološke raznolikosti riba. Prema podacima Duplića (2008) kralješnjaci nisu ni u jednom drugom staništu evolucijom postigli toliku raznolikost kao ribe.

Zajedno s velikom taksonomskom raznolikošću, za ribe je značajna i velika raznolikost staništa na kojima obitavaju. Danas, kao i u prošlosti, ribe se nalaze u gotovo svim vodenim staništima od jezera i polarnih oceana koji su prekriveni ledom, do tropskih močvara, privremenih jezerca, do velikih dubina oceana i u raznim rijekama i potocima koji se nalaze u različitim okolišima (Helfman i sur. 2009).

Hrvatska ima jednu od najraznolikijih i najbogatijih slatkovodnih ihtiofauna u Europi. Bogatstvo vrsta i endema je posljedica geografskog položaja Hrvatske koji obuhvaća dva riječna sustava, jadranski i crnomorski ili dunavski slijev. U Hrvatskoj živi 150 vrsta slatkovodnih riba, od kojih 21 vrsta boravi i u boćatim i slanim vodama (Mrakovčić i sur. 2006). Ribe imaju veliko biološko značenje u ekosustavima, koje se očituje u regulacijskoj, povezujućoj i informativnoj ulozi (Holmlund i Hammer 1999, Mrakovčić i sur. 2006). Također imaju veliko gospodarsko značenje jer su važan izvor proteina za ljudsku prehranu a u mnogim zemljama je slatkovodno ribarstvo povezano sa sportskim aktivnostima.

Nažalost, iako su ribe najraznolikija i najbrojnija, one su ujedno i najugroženija skupina kralješnjaka (Radović 1999). U Crvenoj knjizi slatkovodnih riba Hrvatske nalazi se 90 vrsta i podvrsta koje pripadaju različitim kategorijama ugroženosti (Mrakovčić i sur. 2006). Pogotovo se u današnje vrijeme zbog sve većeg djelovanja čovjeka na prirodna staništa smanjuje populacija riba i povećava njihova ugroženost. Zbog ograničenosti vodenih staništa u kojima žive ribe, dovoljan je tek jedan izljev otrovnih kemijskih spojeva da bi se cijela populacija ili vrsta ugrozila. Najveći razlozi ugroženosti slatkovodne ihtiofaune u Hrvatskoj su unos alohtonih

vrsta, onečišćenje, regulacija vodotoka, degradacija staništa, izgradnja brana i hidroakumulacija, prelov, krivolov i klimatske promjene (Mrakovčić i sur. 2006).

## **1.2. Biologija i ekologija vrste lipljena *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758)**

### **1.2.1. Sistematika lipljena**

Lipljen, *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758) je slatkovodna riba koju taksonomski svrstavamo kako slijedi:

**CARSTVO** Animalia (životinje)

**KOLJENO** Chordata (svitkovci)

**PODKOLJENO** Vertebrata (kralježnjaci)

**MEĐUKOLJENO** Gnathostomata (čeljustouste)

**RAZRED** Actinopteri (zrakoperke)

**NADRED** Teleostei (prave koštunjače)

**RED** Salmoniformes (lososi)

**PORODICA** Salmonidae (pastrvke)

**POTPORODICA** Thymallinae

**ROD** *Thymallus*

**VRSTA** *Thymallus thymallus* (lipljen)

Razred zrakoperke (Actinopteri, nekada Actinopterygii) (grč. *actino* = zraka, *ptero* = krilo ili peraja) pripada skupini riba koje su dobile naziv po posebnom izgledu peraja koje su tanke, bez mesnatih bazalnih režnjeva i interno podržane brojnim endoskeletnim šipčicama (lepidotrichia) za razliku od mesnatih peraja njihove sestrinske taksonomske skupine mesoperki (Sarcopterygii). Osim peraja njihove karakteristike su jedna leđna peraja koja može biti podijeljena, repna peraja bez epikordalnog režnja i mirisne vrećice koje nisu povezane usnom šupljinom (Kotpal 2010). Obuhvaćaju 99 % svih danas živućih riba te se sastoje od 3 podrazreda, 44 reda, 453 porodica, 4289 roda i 26891 vrsta (Nelson 2006) od kojih 44 % vrsta ove skupine su slatkovodne ribe. Ovu skupinu riba dijelimo na štitonoše (Chondrostei) i novozrakoperke (Neopterygii), koje se dijele na cjelokoste (Holostei) i prave koštunjače (Teleostei) (Nelson 2006).

Nadred Teleostei (grč. *Teleos* = cijelo, *osteon* = kosti) je najveća skupina unutar Actinopteri koja sadrži 96 % vrsta riba koja su podijeljena u 40 redova, 448 porodica i 4278 rodova (Nelson 2006). Njihova determinacijska karakteristika je pokretna predčeljusna kost, produljeni živčani lukovi na kraju repne peraje i neparne bazibranhijalne zubne ploče (Peterson i Rosen 1977). Premaksila nije spojena sa neurokraniumom što ima ulogu u isticanju usta i stvaranju kružnog otvora. Time se smanjuje tlak unutar usta, usisavajući plijen iznutra. Zatim se gornja i donja čeljust povlače kako bi se usta zatvorila i uhvatila plijen. Također im je repna peraja u većini slučajeva homocerkalna i imaju cikloidne, ktenoidne ili nemaju ljuske (Kotpal 2010).

Porodica pastrvke (Salmonidae) su jedina skupina koja se nalazi unutar reda lososa (Salmoniformes). Ova porodica sadrži ribe koje su native u vodotocima sjeverne hemisfere, ali su introducirane u južnije dijelove zbog akvakulture, komercijalne i rekreacijske svrhe, kao što ribolov u hladnim vodama diljem svijeta. Mogu narasti od srednje do velike veličine i naseljavaju čiste, hladne i brze vode (Kottelat i Freyhof 2007). Njihove opće karakteristike su duboki stražnji mišić s očnom muskulaturom koja prolazi i pričvršćuje se za mišiće trupa, imaju prisutnu masnu peraju, prisutan mezokorakoid i posljednja tri kralješka usmjerena superiorno (Nelson 2006). Porodica Salmonidae se dijeli na tri potporodice koje su Coregoninae, Thymallinae i Salmoninae.

Rod *Thymallus* se sastoji od slatkovodnih riba koje naseljavaju sjevernu hemisferu. Ovo je jedini rod koji se nalazi u potporodici Thymallinae te sadrži 14 vrsta (<https://www.fishbase.de/identification/SpeciesList.php?genus=Thymallus>). Razlikuju se od ostalih pastrvki po velikim ljuskama i malim ustima sa zubima na gornjoj čeljusti i njihovom velikom, izraženom i obojenom dorzalnom perajom. Zbog njihovog okusa i atraktivnog izgleda ljudi koriste ovu skupinu za ribolovu, javne akvarije i kao prehranu.

### **1.2.2. Rasprostranjenost, razmnožavanje i morfologija lipljena**

Lipljen naseljava vodotoke u Velikoj Britaniji, Irskoj, južnoj Skandinaviji, rijeke koje utječu u Sjeverno more, pritoke rijeke Volge, a ima ga i u jugozapadnoj Europi, Francuskoj, Njemačkoj, sjevernoj Italiji i u porječju Dunava (Mrakovčić i sur. 2006). U Hrvatskoj živi u rijekama jadranskog i dunavskog slijeva, odnosno u Savi, Kupi, Uni, Dravi, Muri, Cetini i Neretvi, a postoje podaci da je nađen i u Krki. Unesen je uspješno ili manje uspješno u mnoge

vode, na primjer u Gacku, gdje se smatra da je vrlo vjerojatno izumro (Mrakovčić i sur. 2006). Lipljen najčešće dijeli stanište s potočnom pastrvom (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) i nastanjuje tzv. pastvrske vode, hladne, čiste i brze rijeke ili potoci s pjeskovitim ili kamenitim dnom gdje temperatura vode ne prelazi 18 °C.

Hrani se pretežito malim vodenim beskralješnjacima, uglavnom ličinkama obalčara, vodencvjetova, dvokrilaca i tulara. Lipljen je riba proljetnog mrijesta od ožujka do travnja, kada temperature vode dosegnu 4 - 8 °C. Spolnu zrelost postiže u trećoj ili četvrtoj godini života, ženka treba jedna godina duže da spolno sazriju, što ovisi o vodenom sustavu u kojem obitavaju (toplije temperature vode potiču raniju spolnu zrelost, dok hladnije temperature produžuju spolno sazrijevanje). Boje mužjaka za vrijeme mrijesta su intenzivno izražene. Mužjaci brane mali teritorij za mrijest u jutarnjim satima, dok se mrijest odvija u najtoplijem dijelu dana. Ženke odlažu jaja u supstrat, a nakon 10 - 40 dana dolazi do izvaljivanja (Kottelat i Freyhof 2007).

Zabilježeno je da lipljen može dostići dužinu od 35 – 50 cm i masu 1 kg. Trup im je bočno spljošten, a leđa izbočena. Usta su razmjerno mala, a spoj čeljusti ne dopire do prednjeg ruba očiju. Karakteristika lipljena je iznimno velika i dugačka leđna peraja u obliku zastave, metalno plave, na kojoj se nalaze tri do četiri reda krupnih crvenih i ljubičastih pjega. Donja peraja di pepeljasta, sa crvenim i ljubičastim preljevom na vrhu. Na bokovima iza glave (Slika 1.) ima manji ili veći broj crnih pjega (Kottelat i Freyhof 2007).



Slika 1. Karakterističan izgled lipljena ([https://www.researchgate.net/figure/European-grayling-Thymallus-thymallus-In-the-Balkans-grayling-are-native-to-the-Soca\\_fig8\\_324727470](https://www.researchgate.net/figure/European-grayling-Thymallus-thymallus-In-the-Balkans-grayling-are-native-to-the-Soca_fig8_324727470), foto: Zoran Marčić, pristupljeno 26.8.2021.).

### **1.2.3. Status ugroženosti lipljena**

Kategorija ugroženosti lipljena prema Crvenoj knjizi slatkovodnih riba Hrvatske je osjetljiva vrsta (VU) u dunavskom slijevu, dok je u jadranskom alohtona vrsta (Mrakovčić i sur. 2006). Prema IUCN (International Union for Conservation of Nature) njegova kategorija ugroženosti je najmanje zabrinjavajuća (LC). Međunarodno je zaštićen Bernskom konvencijom i Europskom direktivom o zaštiti staništa. Lipljen je vrlo osjetljiv na onečišćenje vode. Ugrožava ga regulacija i pregrađivanje vodotoka, onečišćenje otpadnim vodama, prekomjeren izlov te unos alohtonih vrsta (Freyhof 2011).

### **1.3 Mitohondrijska DNA i gen za citokrom *b***

Mitohondrijska DNA (mtDNA) kod viših životinja evoluirala prilično brzo i obično se prenosi majčinskom linijom što je čini odličnim za filogenetska istraživanja na životinjama (Emerson i Hewitt 2005). Nadalje, stupanj divergencije nekih mtDNA sekvenci prikladan je za utvrđivanje genealogije specijacije jer je dovoljno brz da pokaže razliku u populacijama vrste, dok je dovoljno spor da se ne zasiti nakupljenim mutacijama tijekom razdoblja od nekoliko

milijuna godina (Hewitt 2001). Osim toga, mtDNA je prisutna u velikoj količini te ju je moguće umnožiti iz vrlo ograničene količine uzorka. Sve ove karakteristike čine ju idealnim markerom za istraživanje strukture populacija.

Citokrom *b* (cyt *b*) ima funkciju u elektronskom transportnom lancu i glavna je podjedinica transmembranskog proteina citokroma bc1 i b6f kompleksa (Howell 1989). Cyt *b* je jedan od najčešće korištenih gena za određivanje filogenetskih odnosa među organizmima.

#### 1.4. Filogenetske metode

Molekularna filogenija (filogenetika ili molekularna sistematika) je disciplina koja pomoću struktura molekula omogućuje utvrđivanje evolucijskih veza među vrstama i višim taksonomskim kategorijama. Filogeografija je, prema definiciji, znanstvena disciplina koja analizira geografsku rasprostranjenost genealoških linija (Avice 1998, Emerson i Hewitt 2005, Hewitt 2001). Filogenetska rekonstrukcija opisuje evolucijske odnose na zajedničkog pretka i njezine metode su metoda najveće parsimonije (MP, od engleskog naziva Maximum Parsimony), metoda najveće vjerojatnosti (ML, od engleskog Maximum Likelihood), metoda susjednog sparivanja (MJ, od engleskog Median joining) i Bayesova metoda (BAY). Ove metode rade izravno sa sekvencama te se iz njih dobivaju filogenetska stabla (filogrami) i filogenetska mreža.

Metoda najveće parsimonije je filogenetska metoda kojom se određuje filogenetsko stablo za koje je potreban najmanji broj evolucijskih promjena kako bi se objasnile sve razlike primijećene među sekvencama. Za opisivanje MP stablo uobičajeno se koristi nekoliko indeksa: Indeks konzistencije (CI) - mjera koja pokazuje kako se pojedina značajka dobro uklapa u filogenetsko stablo. Dobiva se tako da se najmanji mogući broj koraka, odnosno promjena za neki skup podataka, podijeli s uočenim brojem.

Indeks homoplazije (HI) - mjera kojom se označava stupanj homoplazije značajke.

Indeks retencije (RI) - Ovim se indeksom izražava dio sinapomorfije koju očekujemo u nekom skupu podataka, a koja je zadržana kao sinapomorfija u filogenetskom stablu

Indeks reskalirane konzistencije (RC) - indeks konzistencije reskaliran vrijednošću indeksa homoplazije

Duljina stabla predstavlja najmanji mogući broj koraka potrebnih da bi se za neki skup podataka izradilo stablo

Metoda najveće vjerojatnosti je filogenetska metoda kojom se određuje filogenetsko stablo za koje unutar određenog evolucijskog modela ima najveću vjerojatnost primjećivanja podataka. Ova metoda procjenjuje vjerojatnost da je izabrani evolucijski model doveo do nastanka skupa sekvenci koje se analiziraju i računa vjerojatnost za svako nukleotidno mjesto.

Filogenetska stabla su zapravo kladogrami koji prikazuju evolucijske odnose između odabranih organizama te svako grananje na stablu označava najbližeg zajedničkog pretka. Filogrami su filogenetska stabla koja točnije određuju filogenetske odnose jer je duljina ogranaka u njima proporcionalna količini evolucijskih promjena te odražava vremensku udaljenost, odnosno evolucijsku divergenciju. Nasuprot njima postoje i kladogrami, kod kojih duljina ogranaka ne odražava vremenski razmak. Svako stablo se sastoji od nekoliko dijelova:

- Čvorovi – oni prikazuju taksonomske jedinice (organizme, populacije, vrste...)
- Završni (terminalni) čvorovi – pokazuju položaj organizma koji se proučava
- Unutarnji (interni) čvorovi - označavaju položaj posljednjeg zajedničkog pretka
- Grane - povezuju čvorove te prikazuju genetske odnose

Također se filogenetska stabla obično ukorjenjuju (postoje i neukorijenjena stabla) gdje korijen prikazuje položaj posljednjeg zajedničkog pretka za sve organizme u tom stablu, a određuje se ili na temelju fosilnih podataka ili na temelju podataka o jednom ili više udaljenih organizama. Nasuprot tome neukorijenjena stabla prikazuju samo odnose bez podataka o zajedničkom pretku

## **1.5. Ciljevi istraživanja**

Ovaj rad je načinjen kako bih dobio uvid u trenutno stanje populacije lipljena na području Hrvatske, a sa ciljem njegove efikasne zaštite, s obzirom da do sada nisu provedena detaljna istraživanja. Ciljevi mog rada su sljedeći:

1. Utvrditi srodstvene odnose populacija lipljena u Hrvatskoj
2. Opisati intraspecijsku strukturu lipljena u Hrvatskoj
3. Utvrditi stupanj intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti lipljena
4. Odrediti koje su populacije lipljena autohtonog porijekla, a koje su posljedica približavanja te identificirati osobito važne populacije za zaštitu lipljena u Hrvatskoj

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje su proveli od strane djelatnici Zoologijskog zavoda Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pomoću metode elektroribolova (Slika 2.). Iz ribogojilišta Obrh u Sloveniji nabavili smo još 20 uzorka peraja lipljena kao kontrolu za analize, odnosno kako bismo provjerili udio unesenih jedinki, s obzirom da u Hrvatskoj nema uzgajališta lipljena, već se poribljavanje uglavnom obavlja materijalom iz Slovenije. Ulovljenim ribama odrezan je mali komadić prsne peraje koji je potom stavljen u epruvete s 96 % etanolom. Uzorci u epruvetama su potom pohranjeni u zamrzivaču na  $-20^{\circ}\text{C}$  kako ne bi došlo do razgradnje DNA. Ukupno je uzorkovano 94 jedinki na 10 lokaliteta (Tablica 1.).



Slika 2. Ošamućeni lipljeni u kanti s vodom koji su ulovljeni elektroribolovom (foto: Ivan Grlica).



Tablica 1. Popis lokaliteta, datumi uzorkovanja, kod jedinki uzorkovano i geografske koordinate područja uzorkovanja

Lokalitet	Datum	Kod jedinki	Geografski koordinati
Curak	10.2019.	THCU1	x=373006 y=5035249
	10.2019.	THCU2	
	10.2019.	THCU3	
	10.2019.	THCU4	
	10.2019.	THCU5	
	10.2019.	THCU6	
	10.2019.	THCU7	
	10.2019.	THCU8	
	10.2019.	THCU9	
	10.2019.	THCU10	
	10.2019.	THCU11	
	10.2019.	THCU12	
	10.2019.	THCU13	
	10.2019.	THCU14	
	10.2019.	THCU15	
	10.2019.	THCU16	
	10.2019.	THCU17	
	10.2019.	THCU18	
	10.2019.	THCU19	
	10.2019.	THCU20	
	10.2019.	THCU21	
	10.2019.	THCU22	
	10.2019.	THCU23	

Tablica 1. Nastavak

Kupica	10.2019.	THKU1	x=371457 y=5037321
	10.2019.	THKU2	
Kupica (uneseni iz uzgajališta na Bledu)	2019.	THKU3	x=371457 y=5037321
	2019.	THKU4	
	2019.	THKU5	
	2019.	THKU6	
	2019.	THKU7	
	2019.	THKU8	
	2019.	THKU9	
	2019.	THKU10	
	2019.	THKU11	
	2019.	THKU12	
	Kupa, izvorište	1.7.2020.	
1.7.2020.		THKU14	
1.7.2020.		THKU15	
1.7.2020.		THKU16	
1.7.2020.		THKU17	
1.7.2020.		THKU18	
1.7.2020.		THKU19	
Brod na Kupi, Kupa	16.8.2020.	THKU20	x=371457 y=5037321
	16.8.2020.	THKU21	
	16.8.2020.	THKU22	
	16.8.2020.	THKU23	
	16.8.2020.	THKU24	
	16.8.2020.	THKU25	

Tablica 1. Nastavak

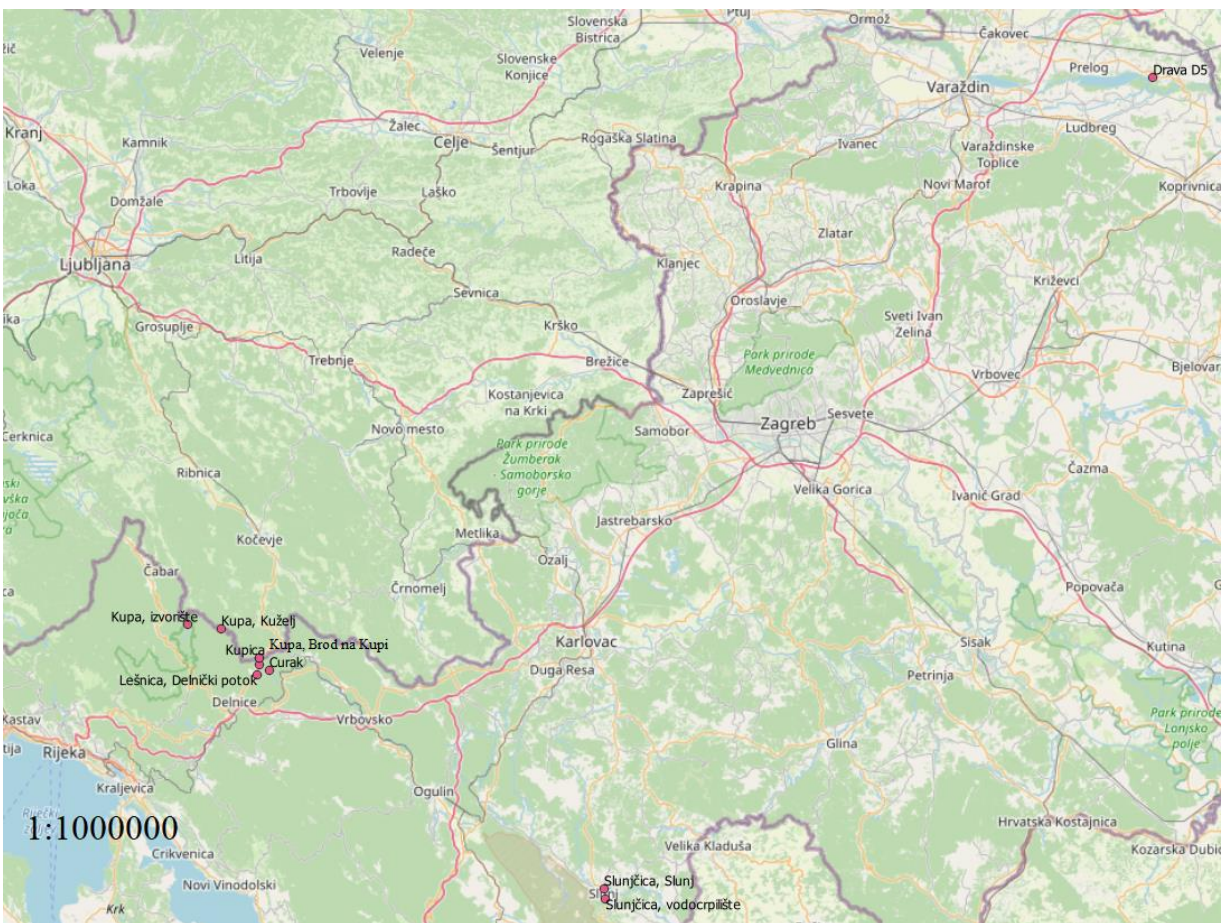
	16.8.2020.	THKU26	
	16.8.2020.	THKU27	
	16.8.2020.	THKU28	
	16.8.2020.	THKU29	
	16.8.2020.	THKU30	
	16.8.2020.	THKU31	
Kupa, Kuželj	16.8.2020.	THKU32	x=365175 y=5042269
	16.8.2020.	THKU33	
	16.8.2020.	THKU34	
Drava D5		THDR1	x=519485 y=5131193
Slunjšica, Slunj	14.5.2020.	THSL1	x=428195 y=4998123
	14.5.2020.	THSL2	
	14.5.2020.	THSL3	
	14.5.2020.	THSL4	
Slunjšica, vodocrpilište	13.7.2020.	THSL5	x=428447 y=4996461
	13.7.2020.	THSL6	
	13.7.2020.	THSL7	
	13.7.2020.	THSL8	
	13.7.2020.	THSL9	
	13.7.2020.	THSL10	
	13.7.2020.	THSL11	
	13.7.2020.	THSL12	
	13.7.2020.	THSL13	
	13.7.2020.	THSL14	
Lešnica, Delnički potok	1.7.2020.	THDE1	x=370936.625 y= 5034583.25

Tablica 1. Nastavak

	1.7.2020.	THDE2	
Ribogojilište Obrh Slovenija, Bazen 1	2020.	THOB1	
	2020.	THOB2	
	2020.	THOB3	
	2020.	THOB4	
	2020.	THOB5	
	2020.	THOB6	
	2020.	THOB7	
	2020.	THOB8	
	2020.	THOB9	
	2020.	THOB10	
	Ribogojilište Obrh Slovenija, Bazen 2	2020.	THOB11
2020.		THOB12	
2020.		THOB13	
2020.		THOB14	
2020.		THOB15	
2020.		THOB16	
2020.		THOB17	
2020.		THOB18	
2020.		THOB19	
2020.		THOB20	

## S2.2. Područje istraživanja

Istraživanje je provedeno na 10 lokaliteta koji se nalaze na šest vodotoka: Curak, Kupa, Drava, Slunjsica, Lešnica i ribogojilišta u Sloveniji. Devet lokaliteta nalazi na rijekama i potocima Hrvatske (Slika 3.), dok se jedan lokalitet odnosi na ribogojilište Obrh u Sloveniji. Otuda su uzorci prikupljeni s ciljem usporedbe s uzorcima iz divljih populacija, s obzirom da se lipljenom intenzivno poribljava, a u Hrvatskoj nema uzgajališta, već najvjerojatnije uzgojene jedinice potječu iz uzgajališta Obrh.



Slika 3. Lokalizacija uzorkovanja lipljena u Hrvatskoj

### Lokalitet 1: Curak

Curak je rijeka u Gorskom kotaru koja se ulijeva u Kupicu. Tip dna lokaliteta uzorkovanja se sastoji od 90 % kamenja, 5 % šljunka i 5 % pijeska, dok obalu čine po 50% kamen i zemlja. Nema prisutne vodene vegetacije. Riparijsku vegetaciju čine 50 % trava, 40 %

drveće i 10 % grmlje. Za vrijeme uzorkovanja voda je bila bistra, prozirna, bez mirisa i niske razine. Okolni prostor čine šuma i naselje. Čovjek ima mali utjecaj na ovoj lokaciji.

### **Lokalitet 2: Kupa, Brod na Kupi**

Lokalitet se nalazi u rijeci Kupi kod naselja Brod na Kupi. Tip dna se sastoji od 60% kamenja, 35 % šljunka i 5 % stijena, dok je obala sva od zemlje. Vodenu vegetaciju čine alge čija je pokrovnost oko 60 %. Riparijsku vegetaciju čini najviše drveće 80 %, a manje je zastupljeno grmlje 10 % i trava 10 %. Za vrijeme uzorkovanja voda je bista, prozirna i bez mirisa. i niska razina vodostaja. Okolni prostor se sastoji od šume i naselja. Utjecaj čovjeka je velik.

### **Lokalitet 3: Kupica**

Kupica se ulijeva u Kupu u naselju Brod na Kupi. Lokalitet se nalazi na ušću Kupice blizu mosta kod naselja Brod na Kupi te ima iste karakteristike kao prijašnji lokalitet 2 (Kupa, Brod na Kupi). Tip dna se sastoji od 60 % kamenja, 35 % šljunka i 5 % stijena, dok je obala cijela od zemlje. Vodenu vegetaciju se čine alge čija je pokrovnost oko 60 %. Riparijsku vegetaciju čini najviše drveće 80 %, dok je manje zastupljeno grmlje 10 % i trave 10 %. Za vrijeme uzorkovanja voda je bila bistra, prozirna, bez mirisa i niske razine. Okolni prostor čine šuma i naselje. Na ovom lokalitetu je velik utjecaj čovjeka.

### **Lokalitet 4: Kupa, izvorište**

Lokalitet se nalazi nizvodno od izvora. Tip dna rijeke Kupe se sastoji od 30 % stijena, 10 % kamenja, 50 % šljunka i 10 % pijeska. Tip obale je 100 % zemlja. Vodenu vegetaciju čini 60 % algi i 40 % mahovine. Njihova je pokrovnost 80 %. Riparijsku vegetaciju čini drveće 45 %, grmlje 45 % i trave 10 %. Za vrijeme uzorkovanja voda je bila bistra, prozirna, bez mirisa i niske razine. Okolni prostor čine šuma i naselje. Čovjek ima mali utjecaj na ovu lokaciju.

### **Lokalitet 5: Kupa, Kuželj**

Lokalitet se nalazi blizu naselja Kuželj. Tip dna ove lokacije se sastoji od 50 % šljunka, 30% kamenja, te po 10% stijena i pijeska. Obalu čine u jednakom omjeru kamen i zemlja. Vodenu vegetaciju čine alge 50% i mahovine 50%. Pokrovnost im je 60 %. Riparijsku vegetaciju

najviše čini grmlje 80 % i manje drveća 20 %. Za vrijeme uzorkovanja voda je bila bistra, prozirna, bez mirisa i niske razine. Čovjek ima mali utjecaj na ovu lokaciju.

#### **Lokalitet 6: Drava, D5**

Ovaj lokalitet se nalazi nizvodno od hidroelektrane Dubrava. Obala je potpuno kanalizirana. Čovjek ima ekstremno utjecaj na ovu lokaciju. Okolni prostor čine naselja i šume. Dno se sastoji od kamena i šljunka.

#### **Lokalitet 7: Slunjčica, Slunj**

Lokalitet se nalazi blizu grada Slunja. Tip obale se sastoji od 70 % pijeska, 10 % kamenja, 10 % stijena, 5 % šljunka i 5 % mulja. Obala je od zemlje. Vodenu vegetaciju čine podvodne biljke 75 %, površinske biljke 10 %, alge 10 % i mahovine 5 % čija je pokrovnosti 30 %. Riparijsku vegetaciju čini najviše grmlje 70 % i manje drveća 20 % i trava 10 %. Okolni prostor čine drveće i livada. Za vrijeme uzorkovanja voda je bila zelenkasta, bistra, bez mirisa i normalne razine.

#### **Lokalitet 8: Slunjčica, vodocrpilište**

Nalazi se u blizini crpilišta na Slunjčici. Tip dna se sastoji većinom od pijeska i nešto malo mulja. Tip obale je čini zemlja. Okolni prostor čine naselje, šuma i livada.

#### **Lokalitet 9: Lešnica, Delnički potok**

Delnički potok se ulijeva u Kupicu. Lokalitet se nalazi blizu mosta. Tip dna se sastoji od 30 % kamenja, šljunka i pijeska te od 10 % stijena. Obala je uglavnom kamenita i betonska. Vodenu vegetaciju se čini jednaki omjer alga i mahovina čija je pokrovnosti 60 %. Kod riparijske vegetacije prevladava drveće 80 % dok je manje grmlja 20 %. Vidljiv je velik je utjecaj čovjeka.

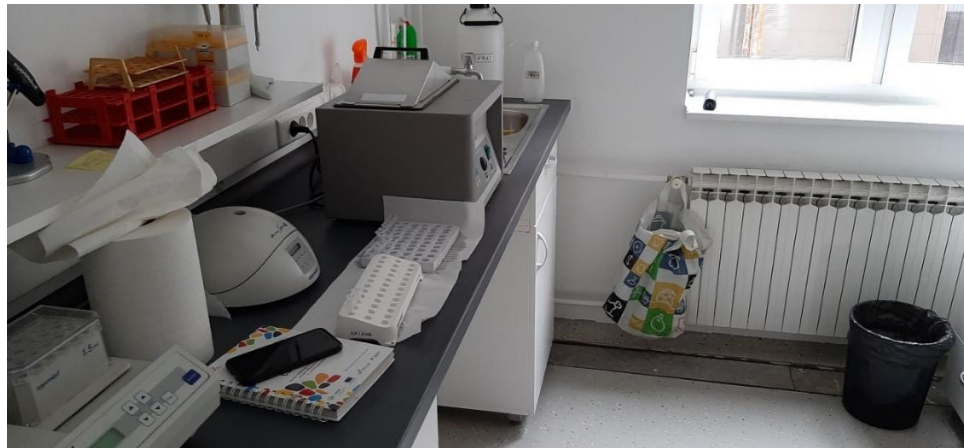
#### **Lokalitet 10: Ribogojilište Obrh u Sloveniji**

Ribogojilište se nalazi na rijeci Obrh u Sloveniji. Ovdje se od 1935. godine uzgajaju slatkovodne ribe za prodaju. Ribu uzgajaju u dva bazena iz kojih su poslali uzorke lipljena (<https://www.zzrs.si/page/ribogojstvo-obrh/>).

## 2.3. Laboratorijske analize

### 2.3.1. Izolacija DNA

Ukupna je genomna DNA izolirana iz uzoraka tkiva pomoću DNeasy Blood & Tissue kompleta za izolaciju (QIAGEN), prema protokolu proizvođača u prostoriji i laboratoriju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (Slika 4.).



Slika 4. Laboratorij biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta gdje je provedena laboratorijska analiza (foto: Ivan Grlica).

Uzorke tkiva sam škaricama narezao na sitne dijelove, te sam im dodijelio kod. U epruvete s usitnjenim uzorcima sam dodao 180  $\mu\text{L}$  pufera ATL koji služi za razgradnju tkiva uzorka. Zatim sam dodao 20  $\mu\text{L}$  proteinaze K koja služi za razaranje staničnih proteina. Epruvete s uzorcima sam pomiješao desetak sekundi na rotacijskoj miješalici i stavio ih u vodeni kupelj preko noći na 56  $^{\circ}\text{C}$ . Idući dan sam izvadio uzorke u epruvetama iz vodene kupelji te ih promiješao na rotacijskoj miješalici desetak sekundi i dodao 200  $\mu\text{L}$  (pufer za lizu stanica) te ih promiješao još desetak sekundi pomoću rotacijske miješalice. U uzorke sam dodao 200  $\mu\text{L}$  etanola te ih promiješao korištenjem rotacijske miješalice desetak sekundi. Iz epruveta sam ispipetirao oko 650  $\mu\text{L}$  uzorka izolata (komadići i mrvice tkiva su bačeni) i stavio u nove označene epruvete s membranom iz kompleta kemikalija QIAGEN DNeasy Blood & Tissue. Iz epruveta s membranom sam zatim stavio u centrifugu na 8000 okretaja u minuti (rpm) na jednu minutu. Donji dio epruveta s membranom sam bacio, dok sam gornji dio prenio u novi donji dio iz kompleta kemikalija QIAGEN DNeasy Blood & Tissue. Dodao sam u svaki uzorak 500  $\mu\text{L}$  pufera AW1 (pufer za ispiranje). Epruvete s membranom sam stavio na centrifugu na 8000 rpm i



jednu minutu. Donji dio epruveta s membranom sam bacio, dok gornji dio sam prenio u novi donji dio iz kompleta kemikalija QIAGEN DNeasy Blood & Tissue, te sam dodao 500 µL pufera AW2 (pufer za ispiranje) u svaku epruvetu. Uzorke sam stavio u centrifugu na 14000 rpm na tri minute. Donji dio epruveta sam bacio i gornji dodao u nove Eppendorf epruvete. Dodao sam pipetom 150 µL pufera AE (pufer za eluciju) u epruvete s uzorcima. Epruvete sam ostavio dvije do tri minute na sobnoj temperaturi. Uzorke sam stavio na centrifugu 8000 rpm na jednoj minuti. Bacio sam membrane a epruvete s izoliranim DNA sam zatvorio, označio kodom i stavio u zamrzivač.

### 2.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Umnažanje gena za citokrom *b* (*cyt b*), kao odabranog genskog markera, vršeno je pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR). Za uspješnu PCR reakciju potrebno je poznavati točne početnice za tu vrstu. Koristio sam početnice H-cyp i L-cyp za umnažanje DNA koje su inače početnice za pastrve koje su srodne lipljenu (Tablica 2.). Mješavinu kemikalija za PCR sam pripremio stavljajući u epruvetu 12,5 µL Mastermix mješavine (smjesa stvari od proizvođača) iz kompleta kemikalija *HotStarTaq Plus Master Mix Kit* (QIAGEN), 8,5 µL mješavine dvije početnice uzvodna (*forward*) i nizvodna (*reverse*) koje su sintetizirane u servisima *Eurofins Genomics* i *Macrogen Europe*, boju, vodu i na kraju 4 µL izolata DNA. Tako pripremljene epruvete stavio sam u uređaj za umnažanje reakcijom koja se odvija prema vremenskim i temperaturnim uvjetima prikazana u Tablici 2. Za provedene analize je odabran gen *cyt b* koji se smatra jednim on najkorisnijim genskim markerom za otkrivanje filogenetskih veza među bliskim taksonomskim jedinicama, jer sadrži sporo i brzo razvijajuće kodonske položaje kao i konzervativne i promjenjive regije (Farias i sur. 2001).

Tablica 2. Popis korištenih početnica i uvjeti korišteni za umnažanje mitohondrijskog *cyt b* gena.

Početnice	PCR vrijeme / temperatura
H-cyp:CCTAGCTTTGGGAGYTAGG	10 min / 95°C
L-cyp:GAYTTGAARAACCACGTTG	35 X 00:45 min / 92°C
	1:30min / 48°C
	1:45 min / 72°C
	7 min / 72°C

### 2.3.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Uspješnost umnažanja PCR reakcija provjerio sam metodom elektroforeze na agaroznom gelu. Gel sam pripremio u Erlenmeyerovoj tikvici, miješanjem 1 g agaroze i 100 mL pufera TAE (1%) koji je po sastavu tris (2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Tikvicu sam lagano promiješao i pustio da odstoji četiri minute na sobnoj temperaturi, zatim sam zagrijao tikvicu dvije minute u mikrovalnoj pećnici. Tikvicu sam izvadio iz mikrovalne peći i ostavio pet minuta da se ohladi. Potom sam ispepitirao 10 µL SYBR Safe boje u tikvicu, te lagano promiješao u ruci. Otopinu sam ulio u kadicu za gel i postavio „češljice“ pomoću kojih ću oblikovati jažice. Nakon što se gel skrutio polako i pažljivo sam izvadio „češljice“ i stavio sam u jažice 4 µL uzorka iz reakcije, dok u posljednji sam stavio 4 µL Gene rulera. Zatim sam stavio gel u kadicu za elektroforezu i dodao TAE pufer dok nije prekrilo cijeli gel. Provedena je elektroforeza pri uvjetima od 120 V, 30 minuta. Kada je elektroforeza završila, gel sam prenio na uređaj za fotografiranje pod UV svjetlom gdje sam pregledao uspješnost reakcije.

## 2.4. Računalne analize

### 2.4.1. Sekvenciranje i sravnanje mtDNA (mitohondrijski DNA) gena

Uzorci s uspješno umnoženim *cyt b* genom su poslani u Macrogen Inc, (Amsterdam, Nizozemska) na pročišćavanje i određivanje primarne strukture nukleotida (sekvenciranje). Za sravnjivanje dobivenih sekvenca koristio sam program BioEdit 7.2.5 (Hall 1999). Kromatograme sam vizualno provjerio radi mogućih grešaka prilikom sravnjivanja te ispravio uočene pogreške. Od 94 analiziranih sekvenci 8 ih je bilo neuspješno te sam ih odbacio iz daljnjih analiza. Također sam dodao sekvence iz Banke gena za daljnje računalne analize (Tablica 3.) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tablica 3. Popis imena sekvenca iz Banke gena, njihov pristupni kod, lokaliteti i referenca.

Ime sekvence	Pristupni kod	Lokacija	Referanca
Thymallus thymallus isolate #107 cytochrome b ( <i>cytb</i> ) gene	JX960869.1	Kanada	Crete-Lafreniere i sur 2012.
Thymallus thymallus isolate #106 cytochrome b ( <i>cytb</i> ) gene	JX960868.1	Kanada	Crete-Lafreniere i sur 2012.

## 2.4.2. Određivanje intraspecijskog i intrapopulacijskog genskog polimorfizma

Korištenjem računalnog programa DnaSP 6.12.03 podijelio sam sekvence na grupe koje odgovaraju populacijama gdje su jedinke uzorkovane. Zatim sam koristio isti program kako bih izračunao broj sekvenci (N), broj polimorfnih mjesta (S), broj mutacija ( $\eta$ ), broj haplotipova (h), raznolikost haplotipova (Hd), nukleotidnu raznolikost ( $\pi$ ) i prosječan broj nukleotidnih razlika (k) genski polimorfizam za pojedine populacije kao i za ukupan uzorak (Librado i Rozas 2009).

## 2.4.3 Filogenetska rekonstrukcija

Filogenetsku rekonstrukciju sam proveo na sekvencama cyt *b* gena korištenjem metode MP i metode ML pomoću kojih sam dobio filogenetska stabla korištenjem računalnog program MEGA 10.2.6. (Kumar i sur. 2018) i PAUP 4.0.a169 (Swofford 2002). Korištenjem računalnog programa DnaSP 6.12.03 podijelio sam sekvence na sedam haplotipova za daljnje analize. Koristio sam sekvence iz Banke gena zajedno s haplotipovima iz ovog istraživanja. Analize su provedene heurističkim modelom uz 100 ponavljanja, uz nasumičan unos taksona te preklapanjem grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem (TBR, od engleskog izraza *tree bisection-reconnection*). Sva mjesta kodona i sve nukleotidne supstitucije imale su jednaku težinu. Podržanost grana utvrđena je analizom samopodržanja (BS, od engleskog *Bootstrap analysis*), uz 1000 bs ponavljanja i 10 replika dodatnih sekvenci. Za ukorijene stabla koristio sam sekvencu vrste *Salmo trutta* koja pripada istoj porodici kao i lipljen a metodom MJ dobio sam filogenetsku mrežu pomoću računalnog programa Network 10.2. (Fluxus Technology Ltd.).

Koristio sam računalni program Migrate 4.2.14 (Beerli 2009) kako bih odredio efektivnu veličinu populacija i migraciju među njima korištenjem BAY metode. Pomoću programa sam dobio  $\Theta$  parametre i koeficijente migracije  $M_{x \rightarrow y}$ . Broj migranata po generaciji sam izračunao pomoću sljedeće formule:

$$N_{x \rightarrow y} = M_{x \rightarrow y} \cdot \Theta_y$$

$N_{x \rightarrow y}$  – broj migranata po generaciji iz populacije *x* u populaciju *y*,  $M_{x \rightarrow y}$  – koeficijent migracije, predstavlja koliko je imigracija u neku populaciju važnija u unošenju varijabilnosti u tu populaciju od mutacija,  $\Theta_y$  – Theta parametar.

Također sam izračunao efektivnu veličinu populacije. Budući da nije bilo dostupne informacije o stopi mutacije za lipljena koristio sam stopu mutacije od potočne pastrve jer je

srodna lipljenu, koja je 0,0000012 po generaciji za mtDNA, objavljena prosječna stopa mutacije je 0,31 % po sekvencama u milijun godina. Za određivanje efektivne veličine populacija korištena je sljedeća formula:

$$N_{ex} = \Theta x / \mu$$

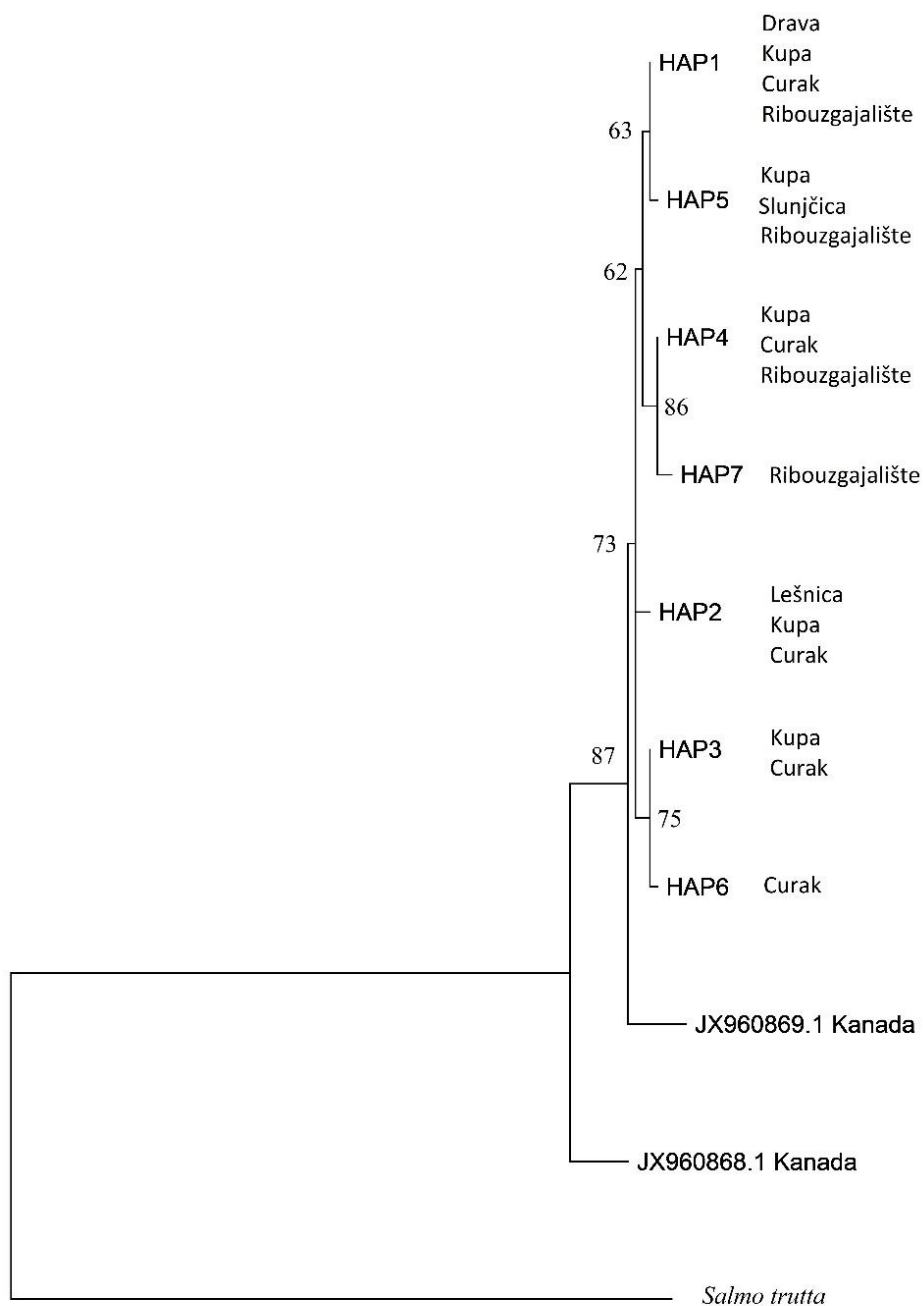
$N_{ex}$  – efektivna veličina x populacije,  $\Theta x$  – Theta parametar,  $\mu$  - stopa mutacije

### 3. REZULTATI

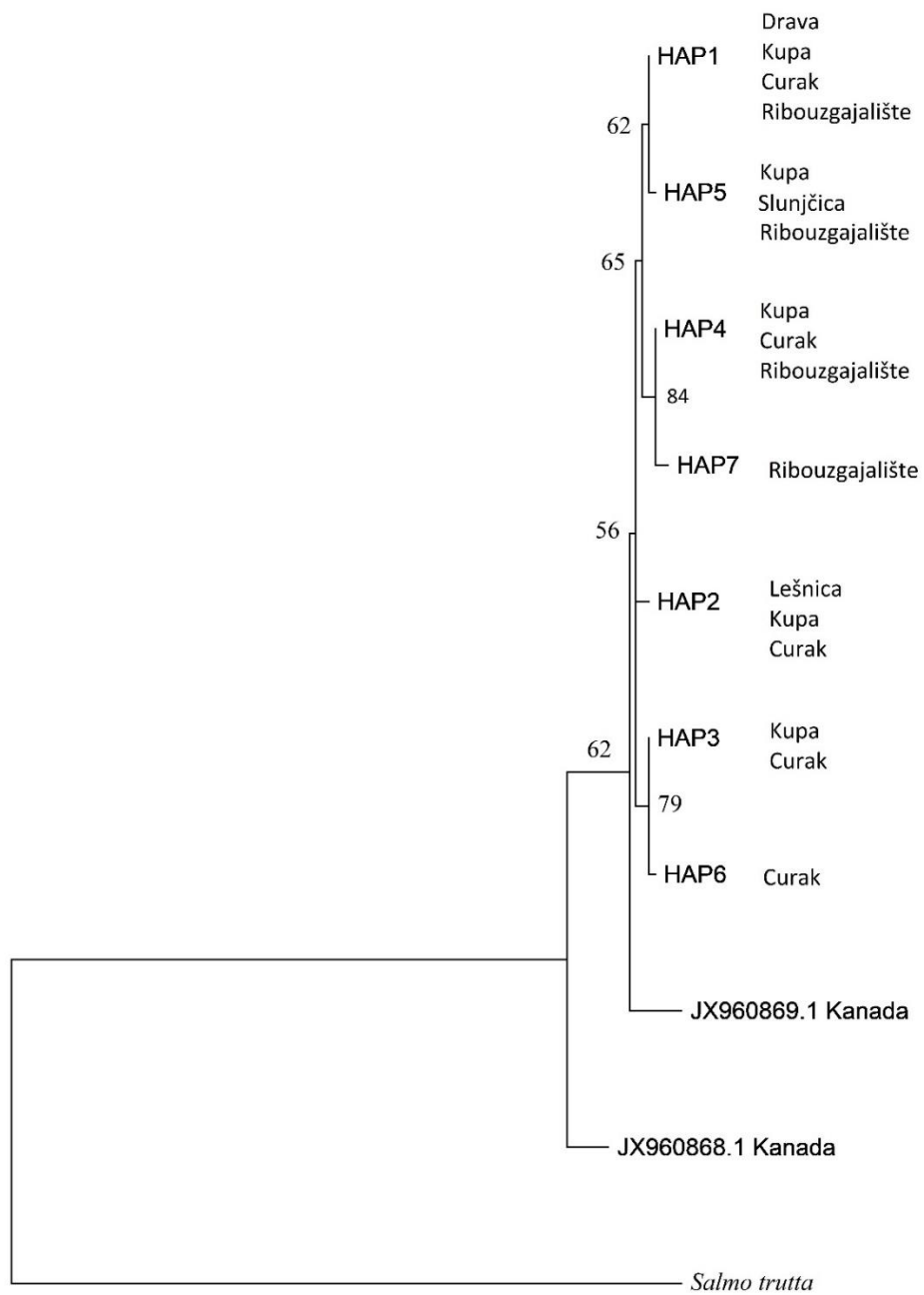
#### 3.1. Filogenetski odnosi

Provedene su filogenetske rekonstrukcije na 86 uzorka, pomoću metode najveće parsimonije (MP) i metodom najveće vjerojatnosti (ML) u računalnom programu PAUP 4.0.a169 dobivena su dva filogenetska stabla (Slike 5. i 6.). Filogenetska rekonstrukcija temeljena je na sekvencama *cyt b* dugim 1141 pb, od kojih je 950 mjesta konstanto, a 171 varijabilno. Parsimonijski značajnih mjesta, odnosno mjesta koja imaju bar dva nukleotida koja se ponavljaju dva puta je 20, dok ostalih 151 varijabilnih mjesta nije parsimonijski značajno. Ukupno je utvrđeno sedam haplotipova među prikupljenim uzorcima lipljena, najmanji haplotip sastoji se od jednog uzorka iz rijeke Curak dok najviše sadrže dva haplotipa po 29 uzorka (Tablica 4.). Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti ima manju podržanost grananja od stabla dobivenog metodom najveće parsimonije. Oba stabla ukazuju na grananje u šest evolucijskih linija, odnosno četiri evolucijske linije za područje Hrvatske. Prva linija obuhvaća dva haplotipa uzoraka iz populacija vodotoka Drave, Kupe, Curka i ribogojilišta Obrh. Druga linija također obuhvaća dva haplotipa iz populacija vodotoka Kupa, Curak i ribogojilište Obrh. Treća linija se sastoji od samo jednog haplotipa prisutnog s uzorcima iz populacije Lešnice, Kupe i Curka. Četvrta linija se sastoji od dva haplotipa iz populacija vodotoka Curak i Kupa. Zadnje dvije linije sadrže svaka po jednu sekvencu iz Banke gena gdje je JX960869.1 srodniji uzorkovanim lipljenima nego JX960868.1 Parametri koji opisuju filogenetsko stablo su sljedeći: CI = 0.9659, HI = 0.0341, RI = 0.07200 i RC = 0.6954.

Filogenetska mreža ne sadrži sekvence iz Banke gena te se sastoji od samo četiri linija (Slika 7.). U svakoj liniji se nalaze uzorci iz populacija rijeka Curka i Kupe, dok HAP7 obuhvaća samo uzorak iz populacije u ribogojilištu, kao i u HAP6 gdje se nalazi samo jedan uzorak iz populacije u rijeci Curak. Najveću raznolikost uzorka ima HAP1, koji predstavlja pretka za HAP5 u kojem se nalaze jedini uzorci iz populacije rijeke Slunčice zajedno s uzorcima iz populacije u ribogojilištu i populaciji u rijeci Kupi. Najveću frekvenciju haplotipova sadrže HAP5 i HAP2 dok najmanju ima HAP6.



Slika 5. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) na temelju *cyt b* gena, brojevi grananja označavaju podržanost u postocima. Desno od naziva haplotipova su označena imena vodotoka dok za uzorke iz Banke gena su označeni iz koje države su uzorkovane jedinice.

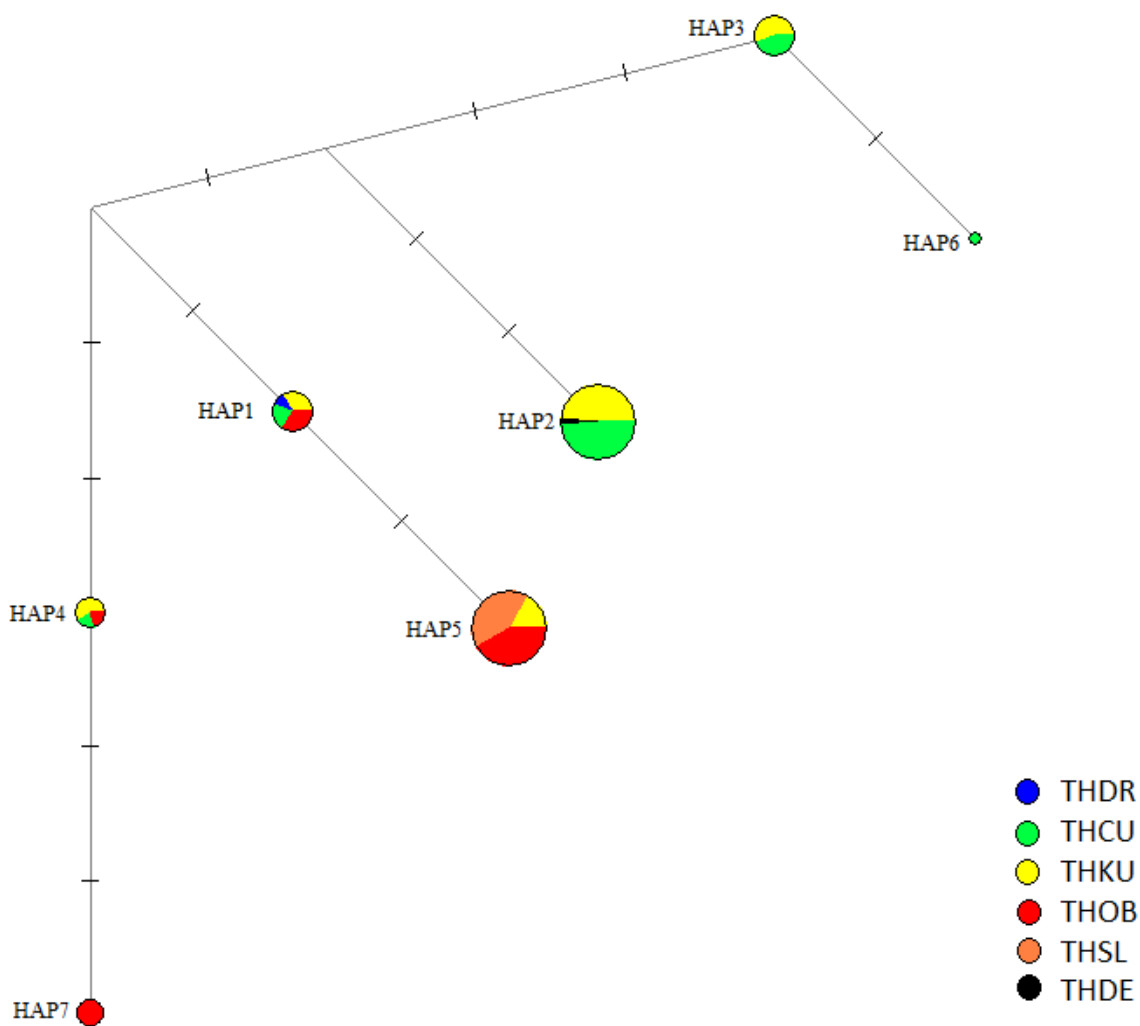


Slika 6. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju *cyt b* gena, brojevi grananja označavaju podržanost u postocima. Desno od naziva haplotipova su označena imena vodotoka dok za uzorke iz Banke gena su označeni iz koje države su uzorkovane jedinice.

Tablica 4. Popis uzoraka u kojima je pronađen određeni haplotip.

Naziv haplotipa	Sekvence
HAP1	THDR1, THKU5, THKU10, THKU12, THCU12, THCU15, THOB10, THOB12, THOB18
HAP2	THDE1, THKU2, THKU14, THKU16, THKU17, THKU18, THKU20, THKU21, THKU22, THKU23, THKU24, THKU30, THKU31, THKU32, THKU33, THCU1, THCU6, THCU7, THCU8, THCU11, THCU13, THCU14, THCU16, THCU17, THCU18, THCU19, THCU20, THCU21, THCU23
HAP3	THKU1, THKU19, THKU26, THKU28, THKU29, THCU4, THCU5, THCU10, THCU22
HAP4	THKU3, THKU11, THKU34, THCU3, THOB20
HAP5	THKU4, THKU6, THKU7, THKU8, THKU9, THSL1, THSL2, THSL3, THSL4, THSL6, THSL7, THSL8, THSL9, THSL10, THSL11, THSL12, THSL14, THOB1, THOB3, THOB4, THOB5, THOB7, THOB8, THOB9, THOB11, THOB13, THOB14, THOB16, THOB19
HAP6	THCU9
HAP7	THOB2, THOB6, THOB15, THOB17





Slika 7. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog sparivanja (MJ), unutar svakog haplotipa bojom je označen udio uzoraka s pojedinog vodotoka. Promjer kružnica proporcionalan je broju sekvenci tog haplotipa.

### 3.2. Interspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost

Mjere genskog polimorfizma su prikazane u Tablici 5. Najmanje mjere za sve parametre ima populacija u Slunječici. Najveći broj polimorfnihih mjesta, ukupan broj mutacija i broj haplotipova imaju populacije iz Kupe i Curak, dok populacija iz ribogojilišta ima nešto manje mjere. Najveću raznolikost haplotipova pokazuje populacija iz Kupe, zatim populacija iz ribogojilišta i nešto manju mjeru u populaciji iz rijeke Curak. Za nukleotidnu raznolikost uočeno je da najveću razinu ima populacija iz rijeke Kupe te potom populacije iz rijeke Curak i

ribogojilišta koje imaju dosta slične mjere. Što se tiče prosječnog broja nukleotidnih razlika, najveću vrijednost i dalje ima populacija iz rijeke Kupe te potom slijedi populacije iz rijeke Curak i ribogojilišta s sličnim mjerama. S obzirom da je iz Drave i Lešnice prikupljen samo jedan uzorak, nije bilo moguće odrediti mjere polimorfizma.

Tablica 5. Genski polimorfizam lipljena u Hrvatskoj na temelju *cyt b* gena.

Populacija	N	S	$\eta$	h	Hd	$\pi$	k
Kupa	30	9	9	5	0.731	0.00276	3.149
Curak	22	9	9	5	0.576	0.0021	2.398
Slunčica	12	0	0	0	0	0	0
Ribogojilište Obrh	20	6	6	4	0.605	0.00207	2.363
Ukupan uzorak	86	12	12	7	0.754	0.00294	3.355

N-broj sekvenci, S-broj polimorfnih mjesta,  $\eta$ -ukupan broj mutacija, h-broj haplotipova, Hd-raznolikost haplotipova,  $\pi$ -nukleotidna raznolikost, k-prosječan broj nukleotidnih razlika.

### 3.3. Stopa migracija i efektivna veličina populacija

Koeficijent migracija i genski parametar theta određeni su pomoću Bayesove metode (Tablica 6.). Mjere ukazuju da najveću prosječnu vrijednost za theta parametre ima populacija u Kupi dok najmanju vrijednost ima populacija u ribogojilištu. Što se tiče koeficijenta migracija najmanju vrijednost ima iz populacije Slunčica prema populaciji Curak što ima smisla budući da ti vodotoci nisu povezani, dok najveću vrijednost ima populacija Curak prema ribogojilištu. Mjere za broj migranata po generaciji su prikazane u tablici 7. Rezultati ukazuju da najveću vrijednost broja migranata po generaciji ima iz populacije ribogojilišta prema populaciji u Kupi. Dok najmanju ima iz populacije Kupe prema populaciji u ribogojilištu. Iz izračuna sam izbacio sekvence od lokaliteta Drave i Lešnice budući da se sastoje od samo jedne sekvence.

Tablica 6. Parametri i njihove srednje vrijednosti ( $\Theta$  - Theta parametar,  $M_{x \rightarrow y}$  – Koeficijent migracija iz populacije x u populaciju y, 1 – vodotok Kupa u kojemu je uzorkovano 30 jedinki, 2 – vodotok Curak u kojemu je uzorkovano 22 jedinke, 3 – vodotok Slunčica u kojemu je uzorkovano 12 jedinki, 4 – ribogojilište u kojemu je uzorkovano 20 jedinki).

Parametri	Srednja vrijednost
$\Theta_1$	0.05343
$\Theta_2$	0.04878
$\Theta_3$	0.04768
$\Theta_4$	0.03798
$M_{2 \rightarrow 1}$	504.7
$M_{3 \rightarrow 1}$	490.1
$M_{4 \rightarrow 1}$	508.2
$M_{1 \rightarrow 2}$	467.6
$M_{3 \rightarrow 2}$	402.5
$M_{4 \rightarrow 2}$	506
$M_{1 \rightarrow 3}$	557.6
$M_{2 \rightarrow 3}$	569
$M_{4 \rightarrow 3}$	504.7
$M_{1 \rightarrow 4}$	411.7
$M_{2 \rightarrow 4}$	562.1
$M_{3 \rightarrow 4}$	490.1

Tablica 7. Parametri i rezultati izračuna ( $N_{x \rightarrow y}$  – broj migranata po generaciji iz populacije x u populaciju y, 1 – vodotok Kupa u kojemu je uzorkovano 30 jedinki, 2 – vodotok Curak u kojemu je uzorkovano 22 jedinke, 3 – vodotok Slunčica u kojemu je uzorkovano 12 jedinki, 4 – ribogojilište u kojemu je uzorkovano 20 jedinki).

Parametri	Rezultati
$N_{2 \rightarrow 1}$	26.96
$N_{3 \rightarrow 1}$	26.18
$N_{4 \rightarrow 1}$	27.15
$N_{1 \rightarrow 2}$	22.8

Tablica 7. Nastavak.

$N_{3 \rightarrow 2}$	19.63
$N_{4 \rightarrow 2}$	24.68
$N_{1 \rightarrow 3}$	26.58
$N_{2 \rightarrow 3}$	27.12
$N_{4 \rightarrow 3}$	24.06
$N_{1 \rightarrow 4}$	15.63
$N_{2 \rightarrow 4}$	21.34
$N_{3 \rightarrow 4}$	18.61

Efektivnu veličinu pojedinih populacija moguće je izračunati zbog varijabilnosti, informativnosti i duljine gena *cyt b*. Efektivne veličine populacija lipljena su prikazane u tablici 8, a kreću se od samo 46 jedinki u Kupi, 41 u Curak i 40 u Slunjčici, što ukazuje na malu količinu jedinki unutar populacije i ugroženost lipljena na tim lokacijama.

Tablica 8. Efektivna veličina populacija lipljena,  $N_e$  – efektivna veličina populacija.

Populacije	$N_e$
Kupa	46
Curak	41
Slunjčica	40
Obrh	32

#### 4. RASPRAVA

Budući da nema puno objavljenih istraživačkih radova o lipljenu u Hrvatskoj, literatura i podaci su ograničeni te bi bilo potrebno u budućnosti napraviti više istraživanja radi efikasnije zaštite ove vrste. Dobivena filogenetska stabla i mreže ukazuju na slabu strukturiranost populacija u Hrvatskoj s obzirom na mali broj lokaliteta i uzorka u usporedbi s drugim provedenim istraživanjima o lipljenu na području Europe (Marić i sur. 2012 i Weiss i sur. 2002). Lipljen tvori monofiletičku skupinu - potporodicu Thymallinae koja se sastoji od jednog roda *Thymallus* te se koristi za ribolov, prehranu, akvarije što ga čini zanimljivijom skupinom unutar te porodice. Zbog svojeg ograničenog areala sa specifičnim uvjetima života, vrlo je osjetljiv na promjene.

Populacija lipljena u Slunječici nema skoro nikakvu gensku raznolikost što predstavlja prijetnju opstanka te populacije. Mala genska raznolikost se može objasniti zato što lipljen nije autohtona vrsta tog područja, već je unesen 60-tih godina od ribiča. Zbog toga što zauzima drugu ekološku nišu od potočne pastrve on ne predstavlja pastrvama prijetnju te je unesen u Slunječicu (Duplić i sur. 2008). Zbog izrazito male genske raznolikosti populacije u Slunječici trebalo bi unesti jedinke iz drugih populacija da bi se povećala vrijednost genske raznolikosti populacije u Slunječici. Niska genska raznolikost može dovesti do nestanka čitave populacije radi smanjenje mogućnosti suočavanja s promjenama u okolišu (Furlan i sur. 2012). Populacija iz Kupe ima umjerenu gensku raznolikost, dok populacije iz rijeke Curak i ribogojilišta imaju male mjere genske raznolikosti u usporedbi s istraživanjima na srodnim vrstama i vrstama koje obitavaju na sličnim staništima, kao što su dunavska pastrva i potočna mrena (Buj i sur. 2020, Ivić i sur. 2021 i Raguž i sur. 2021). Iako se ne radi o istoj vrsti u uspoređenim radovima zato što nema puno provedenih istraživanja o lipljenu na području Hrvatske, srodan je s pastrvama, zauzima istu ekološku nišu i radi se o istim metodama istraživanja, uspoređeni su podaci tih radova s ovim istraživanjem. Ukupna genska raznolikost svih uzorkovanih populacija je veća od bilo kojih pojedinačnih populacija i ukazuje umjerenu gensku raznolikost u usporedbi s istraživanjima na pastrvama i mrenama (Buj i sur. 2020, Ivić i sur. 2021 i Raguž i sur. 2021), vrlo vjerojatno je ukupna genska raznolikost svih uzorkovanih populacija u ovom istraživanju veća nego vrijednost genske raznolikosti svake pojedinačne populacije zato što su populacije međusobno izolirane i došlo je do različitih mutacija u pojedinačnim populacijama, odnosno do veće genske raznolikosti između tih populacija.

Analizom protoka gena utvrđene su imigracije iz svih istraživanih populacija u populaciju u Kupu gdje je ujedno i najveća genska raznolikost. To nam ujedno i pokazuje da je populacija u Kupu izrazito važna zbog bogatstva genskog materijala kojeg sadrži. Također je velika vrijednost broja migranata po generaciji iz populacije ribogojilišta, prema populacijama u ostalim vodotocima, dok najmanju vrijednost iz svih populacija u vodotocima imaju prema populaciji u ribogojilištu. Migracije iz ribogojilišta u divlje populacije naravno nisu prirodne, već se radi o poribljavanju. Ovo predstavlja izvrstan primjer kako održati gensku raznolikost vrsta njihovim uzgajanjem u umjetna staništa i tako očuvati bogatstvo genetičkog materijala vrste te ujedno i njihov opstanak u slučaju neke katastrofe. No trebalo bi se i gensko bogatstvo održavati u populaciji u ribogojilištu sa stalnim unosom jedinki iz različitih područja, kako ne bi došlo do genske homogenosti.

Istraživanje je pokazalo vrlo malu efektivnu veličinu svih populacija lipljena u Hrvatskoj. Usporedba efektivne veličine populacija u Hrvatskoj s podacima iz literature, odnosno s istraživanjima koja su uključivala veći broj uzoraka (Swatdipong i Primmer 2010) je pokazala izuzetno slične rezultate, odnosno manje efektivne veličine populacije od 50 jedinki. Istraživanja u Europi su također pokazala pad genske raznolikosti 34 populacija lipljena te smatraju da zbog malog broja efektivne veličine populacija dolazi do efekta uskog grla ili genetički drift (engl. *bottleneck effect*) (Swatdipong i Primmer 2010). Budući da su populacije lipljena izolirane međusobno i naseljavaju usko područje. Efekt uskog grla je proces smanjenje populacije zbog ekoloških događaja koje dovodi do manje genske raznolikosti tih populacija, budući da se veličina populacije smanjuje to dovodi do manjeg protoka gena i do manje genske raznolikosti u toj populaciji na buduće generacije. No, moguće da je efektivna veličina populacije mala zbog iznimno lokaliziranih podpopulacija koje zajedno čine čitavu populaciju lipljena u vodotoku, što bi objasnilo malen broj efektivne veličine populacija jer se odnosi na te podpopulacije a ne na cijelu populaciju vodotoka Swatdipong i Primmer (2010).

Lipljen se ubraja u osjetljive vrste (VU) u dunavskom slijevu prema Crvenoj knjizi slatkovodnih riba u Hrvatskoj (Mrakovčić i sur. 2006) i naseljava čiste vode. Zbog toga bi bilo potrebno što prije razviti mjere zaštite i očuvanja ove vrste i područja kojeg naseljava. Jedna od mjera zaštite bi bila redovito pratiti stanje, čistoću vode i okolna područja te pratiti da ne dođe do prekomjernog ribolova kako ne bi došlo do još većeg zagađenja okoliša i ugroženosti lipljena. Također bi bilo dobro osnovati ihtiološki tim koji bi pratio stanje populacija na područjima i

napraviti ihtiološke rezervate kako bi se održala genska raznolikost u slučaju da dođe do neke katastrofe i da nestanu populacije iz čitavog vodotoka. Usput bi trebalo održati bogatstvo genskog materijala populacija u uzgoju ihtiološkog rezervata s stalnim unosom jedinki iz raznih područja i pratiti stanje genske raznolikosti tih populacija.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja, dobivenih rezultata, filogenetskih stabla i mreža, možemo zaključiti sljedeće:

- Rezultati istraživanja su pokazali male vrijednosti genske raznolikost lipljena na području Hrvatske i to pogotovo u Slunjcici zbog poribljavanja i nedavnog unosa.
- Izrazito važne populacije za očuvanje su u Slunjcici zbog slabog bogatstva genetskog materijala i populacije u Kupi zbog izvora velikog bogatstva genetičkog materijala.
- Ribogojilište Obrh predstavlja pozitivan primjer očuvanja genskog bogatstva, jer u populaciji iz Obrha je zabilježena umjerena genska raznolikost te unos jedinki iz Obrha u divljinu ne predstavlja problem za divlje populacije. U mnogim ribogojilištima uopće nema genske raznolikosti, no trebalo bi održati to bogatstvo stalnim unosom novih jedinki iz različitih područja.



## 6. LITERATURA

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

Beerli P. (2009): How to use MIGRATE or why are markov chain monte carlo programs difficult to use. *Population Genetics for Animal Conservation*, **17**: 42–79.

Buj I., Raguž L., Marčić Z., Čaleta M., Duplić A., Zanella D., Mustafić P., Ivić L., Horvatić S., Karlović R. (2020): Plitvice Lakes National park harbors ancient, yet endangered diversity of trout (genus *Salmo*). *Journal of Applied Ichthyology* **0**: 1-18.

Crete-Lafreniere A., Weir L.K., Bernatchez L. (2012): Framing the salmonidae family phylogenetic portrait: a more complete picture from increased taxon sampling. Institut de Biologie Integrative et des Systemes, Universite Laval, 1030, Avenue de la Medecine, Quebec, Quebec G1V 0A6, Canada.

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

Duplić A., Fabrio K., Plavac I., Posavec V. V., Radović K., Topić R., Zwicker G. (2008): Značajni krajobraz Slunjčica. Stručna podloga sa smjernicama za upravljanje zaštićenim područjem. Državni zavod za zaštitu prirode. Zagreb.

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

Farias I., Ortí G., Sampaio I., Schneider H., Meyer A. (2001): The Cytochrome *b* Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular Evolution*, **53**: 89–103.

Freyhof J. (2011): *Thymallus thymallus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011. (<https://www.iucnredlist.org/species/21875/9333742> pristupljeno 5.5.2021.).

Furlan E., Stoklosa J., Griffiths J., Gust N., Ellis R., Huggins R.M., Weeks A.R. (2012): Small population size and extremely low levels of genetic diversity in island populations of the platypus, *Ornithorhynchus anatinus*. *Ecology and Evolution* **2** (4): 844-857.

Hall T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.

Helfman G. S., Collette B. B., Facey., Bowen B. W. (2009): *The diversity of fishes, Biology, Evolution, and Ecology*. Second Edition. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Ltd., Publication.

Hewitt G.M. (2001): Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**, 537-549.

Holmlund C. M., Hammer M. (1999): Ecosystem services generated by fish populations. *Ecological Economics* **29**: 253–268.

Howell N. (August 1989): "Evolutionary conservation of protein regions in the proton motive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis". *J. Mol. Evol.* **29**: 157–69

Kotpal R. L. (2010): *Modern Text Book of Zoology: Vertebrates, animal diversity – II*. Rastogi publications.

Kottelat M., Freyhof J. (2007): *Handbook of European Freshwater Fishes*, Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin.

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

Ivić L., Buj I., Raguž L., Marčić Z., Čaleta M., Zanella D., Mustafić P., Horvatić S. (2021): Diversity and structure of trout populations (*Salmo* sp., Salmonidae, Actinopteri) in the

Žumberak-Samoborsko Gotje Nature Park in Croatia. *Fundamental and Applied Limnology* 194/3: 215-225

Marić S., Kalamujić B., Snoj A., Razpet A., Lukić-Bilela L., Pojskić- Sučnik B. S., (2012): Genetic variation of European grayling (*Thymallus thymallus*) populations in the Western Balkans. *Hydrobiologia* **691** : 225 – 237.

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

Nelson J. S. (2006): *Fishes of the World*. 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.

Peterson C., Rosen D. E. (1977): Review of Review of ichthyodectiform and other Mesozoic teleost fishes, and the theory and practice of classifying fossils. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **158**: 81-172.

Radović J. (1999): Pregled stanja biološke i krajobrazne raznolikosti Hrvatske sa strategijom i akcijskim planovima zaštite. Državna uprava za zaštitu prirode i okoliša, Zagreb.

Raguž L., Buj I., Marčić Z., Veble V., Ivić L., Zanella D., Horvatić S., Čaleta M., Sabolić M. (2021): First look into the evolutionary history, phylogeographic and population genetic structure of the Danube barbel in Croatia. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 422, 13

Swatdipong A., Primmer C. R. (2010): Historical and recent genetic bottlenecks in European grayling, *Thymallus thymallus*. *Conserv Genet* **11**:279-292.

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

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007): MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24** (8): 1596-1599.

Weiss S., Persat H., Eppe R., Schlötterer C., Uiblein F., (2002): Complex patterns of colonization and refugia revealed for European grayling *Thymallus thymallus*, based on complete sequencing of the mitochondrial DNA control region. *Molecular Ecology* **11**: 1393–1407.

**Internetski izvori:**

<https://www.fishbase.de/identification/SpeciesList.php?genus=Thymallus>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[https://www.researchgate.net/figure/European-grayling-Thymallus-thymallus-In-the-Balkans-grayling-are-native-to-the-Soca\\_fig8\\_324727470](https://www.researchgate.net/figure/European-grayling-Thymallus-thymallus-In-the-Balkans-grayling-are-native-to-the-Soca_fig8_324727470)

<https://www.zzrs.si/page/ribogojstvo-obrh/>

## 7. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ivan Grlica

Mjesto rođenja: Virovitica

Datum rođenja: 25. ožujka 1993.

Email: ivan.grlica93@gmail.com

Obrazovanje:

2000. - 2008. Osnovna škola Ivana Brlića Mažuranića, Virovitica 33000

2008. - 2012. Srednja škola – Matematička gimnazija Petra Preradovića, Virovitica 33000

2012. - 2018. Preddiplomski studij – Preddiplomski studij, Odjel za biologiju, Osijek 31000

Radno iskustvo:

2012. – danas. Član udruge, Prirodoslovno društvo Drava, Virovitica 33000