

Genska struktura i raznolikost mladice, Hucho hucho (Linnaeus, 1758) u Hrvatskoj

Perčić, Sara

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:217:798556>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sara Perčić

**Genska struktura i raznolikost mladice,
Hucho hucho (Linnaeus, 1758) u Hrvatskoj**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Sara Perčić

**Genetic structure and diversity of Danube
salmon, *Hucho hucho* (Linnaeus, 1758) in
Croatia**

Master thesis

Zagreb, 2021.

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

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Buj na razumijevanju, pomoći i vodstvu tijekom izrade diplomskog rada. Hvala asistenticama Luciji i Luciji na pomoći u laboratoriju i oko analiza te na ugodnom društvu.

Veliko hvala najdražoj kolegici Miji koja mi je uljepšala studentske dane i u kojoj sam pronašla prijateljicu za cijeli život. Hvala i mojim prijateljicama Karin, Klari, Rebeki i Sari koje su uvijek velika potpora te su moje studiranje ispunile veseljem i radošću.

Posebno hvala mojim roditeljima i sestri Evi koji su mi uvijek pružali neizmjernu ljubav, podršku i strpljenje. Hvala vam što ste vjerovali u mene.

Od srca zahvaljujem mome Dini na velikoj podršci, ohrabrirvanju i ljubavi koja mi je bila vjetar u leđa tijekom ovih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Genska struktura i raznolikost mladice, *Hucho hucho* (Linnaeus, 1758) u Hrvatskoj

Sara Perčić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mladica je autohtona vrsta i endem dunavskog slijeva te se nalazi na Crvenom popisu IUCN-a kao ugrožena vrsta. Najveći razlog njezine ugroženosti je fragmentacija staništa uzrokovana izgradnjom brana i pregrada na vodotocima što je uzrokovalo smanjenje i nestajanje populacija. Iako se brojnost mladice od kraja 19. stoljeća smanjila za dvije trećine, stabilne populacije mladica u Hrvatskoj zabilježene su na granici sa Slovenijom u Kupu i na granici s Bosnom i Hercegovinom u Uni. Cilj ovog istraživanja bio je opisati gensku strukturu mladice u Hrvatskoj, utvrditi stupanj intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti, procijeniti zavičajnost pojedinih populacija mladica i njihovu različitost u odnosu na ostale europske populacije te istražiti evolucijsku povijest mladice u Hrvatskoj. Provedena je filogenetska rekonstrukcija temeljena na sekvencama za gen citokrom *b* (*cyt b*) i rodopsin (*rhod*) metodama najveće parsimonije (MP) i najveće vjerojatnosti (ML). Dobivena filogenetska stabla i mreža utvrdili su postojanje evolucijski odvojene linije mladice. Utvrđeno je jasno odvajanje roda *Hucho* unutar Salmonidae. Utvrđeno je da je genska raznolikost mladice na području dunavskog slijeva vrlo niska te da su migracije između populacija minimalne ili ne postoje. Niska genska raznolikost rezultat je prelova te izgradnje pregrada u vodotocima što uzrokuje fragmentaciju staništa.

(50 stranica, 11 slika, 9 tablica, 60 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: mladica, dunavski slijev, filogenija, citokrom *b*, rodopsin

Voditelj: doc. dr. sc. Ivana Buj
Ocjenitelji: doc. dr. sc. Ivana Buj
doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić
prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Rad prihvaćen: 15.09.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Genetic structure and diversity of Danube salmon, *Hucho hucho* (Linnaeus, 1758) in Croatia

Sara Perčić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Danube salmon is an indigenous species, endemic to the Danube basin and it is on the IUCN Red List as an endangered species. The biggest reason for its endangerment is habitat fragmentation caused by the construction of dams and barriers on watercourses, which has caused the reduction and disappearance of populations. Although population size has decreased by two thirds since the end of the 19th century, stable populations of Danube salmon in Croatia have been recorded on the border with Slovenia in Kupa and on the border with Bosnia and Herzegovina in Una. The aim of this study was to describe the genetic structure of Danube salmon in Croatia, to determine the degree of intraspecific and intrapopulation genetic diversity, to assess the origin of individual populations of Danube salmon and their diversity in relation to other European populations and to investigate the evolutionary history of Danube salmon in Croatia. Phylogenetic reconstruction based on sequences for the cytochrome *b* (*cyt b*) and rhodopsin (*rhod*) gene was performed using the maximum parsimony (MP) method and maximum probability (ML) method. The resulting phylogenetic trees and network determined the existence of an evolutionarily separate lineage for Danube salmon. A clear separation of the genus *Hucho* within Salmonidae was determined. It was found that the genetic diversity of Danube salmon in the Danube basin is very low and that migrations between populations are minimal or non-existent. Low genetic diversity is the result of overfishing and the construction of dams in watercourses, which causes habitat fragmentation.

(50 pages, 11 figures, 9 tables, 60 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: Danube salmon, Danube drain, phylogeny, cytochrome *b*, rhodopsin

Supervisor: doc. dr. sc. Ivana Buj

Reviewers: doc. dr. sc. Ivana Buj

doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Thesis accepted: 15.09.2021.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Opće karakteristike dunavskog slijeva te Drave i Save.....	1
1.2. Slatkovodna ihtiofauna Hrvatske i razlozi ugroženosti.....	3
1.3. Taksonomski položaj i opće značajke vrste <i>Hucho hucho</i> (Linnaeus, 1758).....	4
1.4. Filogeografija, molekularna filogenija i filogenetska rekonstrukcija.....	8
1.5. Genski markeri.....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	11
3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA.....	12
4. MATERIJALI I METODE.....	14
4.1. Uzorkovanje.....	14
4.2. Uzorci.....	15
4.3. Laboratorijski postupci.....	17
4.3.1. Izolacija DNA.....	17
4.3.2. Umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR).....	17
4.3.3. Elektroforeza.....	19
4.4. Računalne analize.....	20
4.4.1. Analiza sekvenci.....	20
4.4.2. Filogenetska rekonstrukcija.....	20
4.4.3. Određivanje genskog polimorfizma.....	22
4.4.4. Procjena broja migranata po generaciji i efektivne veličine populacija.....	23
4.4.5. Analiza evolucijske povijesti.....	24
5. REZULTATI.....	25
5.1. Genska struktura.....	25

5.2. Filogenetski položaj mladice.....	26
5.3. Intraspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost.....	35
5.4. Protok gena.....	35
5.5. Evolucija mladice.....	37
6. RASPRAVA.....	40
7. ZAKLJUČAK.....	43
8. LITERATURA.....	44
9. ŽIVOTOPIS.....	50

1. UVOD

1.1. Opće karakteristike dunavskog slijeva te Drave i Save

Teritorij Republike Hrvatske nalazi se na raskrižju nekoliko europskih biogeografskih regija: alpska, kontinentalna, mediteranska te panonska. Zbog njezinog jedinstvenog zemljopisnog položaja u Hrvatskoj se nalaze dva slijeva: jadranski slijev i dunavski ili crnomorski slijev. Granica ovih dvaju slijevova prolazi kroz područje Like koja pripada u alpsko biogeografsko područje. Dunavski slijev zauzima ukupnu površinu od 35 132 km² (62% teritorija Republike Hrvatske) pa tako većina hrvatskih rijeka pripada dunavskom slijevu. Rijeke dunavskoj slijeva su duge, s mnogo pritoka i često međusobno povezane za razliku od rijeka jadranskog slijeva. Zbog svega navedenog u rijekama dunavskog slijeva obitava veći broj vrsta čemu doprinosi i veća duljina slijeva te međusobna povezanost rijeka. Rijeke s najvećim brojem vrsta su: Mura, Sava, Una, Drava i Kupa. Rezultat zanimljive geološke povijesti ovih dvaju slijevova je jedna od najraznolikijih slatkovodnih ihtiofauna u Europi (Ćaleta i sur. 2019).

Dunavski slijev čine rijeke Sava i Drava te njihovi pritoci (Slika 1.) u kojima nalazimo čak 103 vrste slatkovodnih riba, a 14 vrsta uneseno je iz drugih područja. Karakterističan je i po velikom broju endemskih vrsta koje se u njemu nalaze (Mrakovčić i sur. 2006). Noviji podaci pokazuju postojanje 12 endemskih vrsta u hrvatskim rijekama dunavskog slijeva. Endemi dunavskog slijeva su: dunavska paklara (*Eudontomyzon vladykovi* Oliva i Zanandrea, 1959), veliki vijun (*Cobitis elongata* Heckel i Kner, 1858), dunavska krkuša (*Gobio obtusirostris* Valenciennes, 1842), bjeloperajna krkuša (*Romanogobio vladykovi* Fang, 1943), prugasti balavac (*Gymnocephalus schraetser* Linnaeus, 1758), tankorepa krkuša (*Romanogobio uranoscopus* Agassiz, 1828), plotica (*Rutilus pigus* Lacepede, 1803) i mladica (*Hucho hucho*). Bitno je spomenuti i endemske vrste koje obitavaju samo na području dunavskog slijeva u Hrvatskoj, a to su: kapelska svijetlica (*Telestes karsticus* Marčić i Mrakovčić, 2011), krbavska gaovica (*Delminichthys krbavensis* Zupančić i Bogutskaya, 2002), krbavski pijor (*Delminichthys krbavensis* Zupančić i Bogutskaya, 2002) i svijetlica (*Telestes polylepis* Steindachner, 1866) (Ćaleta i sur. 2015). Prema novijim podacima Hrvatska je na drugom mjestu u Europi prema broju slatkovodnih ribljih svojti, a tome pridonosi 87 ribljih svojti koje nastanjuju dunavski slijev od čega je 20 alohtonih vrsta (Ćaleta i sur. 2015).

Dužina Drave je 323 km i druga je rijeka u Hrvatskoj prema veličini. U dvadesetom stoljeću tok Drave je reguliran, a izgrađeno je i nekoliko brana pa se njezin prirodan oblik nalazi u donjem dijelu toka u kojem se nalaze pješčani i šljunkoviti sprudovi. Unatoč tome Drava je najbogatija rijeka u Hrvatskoj prema brojnosti ribljih vrsta. Osim ribljih vrsta nizinskih i visinskih voda, u Dravi se nalazi i nekoliko alohtonih vrsta što je posljedica antropogenog djelovanja. Zbog velikog hidroenergetskog potencijala na Dravi su izgrađene 23 hidroelektrane radi energetskog iskorištavanja, a tri hidroelektrane nalaze se na toku Drave koji prolazi kroz Hrvatsku: hidroelektrana Čakovec, hidroelektrana Varaždin i hidroelektrana Dubrava (Mrakovčić i sur. 2006).

Dužina Save u Hrvatskoj je 562 km. Ima obilježja nizinske rijeke, stvara meandre i poplavna područja. Od 55 vrsta riba koje obitavaju u rijeci Savi čak 5 vrsta su endemske. Ihtiofauna je ugrožena zbog otpadnih voda koje dolaze iz gradova koji se nalaze uz samu rijeku te zbog industrijskih otpadnih voda (Mrakovčić i sur. 2006). Veliki problem su i različiti oblici degradacije staništa (promjene obala i korita, kopanje šljunka i pijeska).



Slika 1. Karta dunavskog sljeva s najvažnijim rijekama (Dunav, Sava, Drava) i pritocima (plava boja) na području jugoistočne Europe (http://archive.iwlearn.net/icpdr.org/icpdr-pages/dw0701_p_12.htm).

1.2. Slatkovodna ihtiofauna Hrvatske i razlozi ugroženosti

Ukupno je 28 000 vrsta riba od 55 000 poznatih vrsta kralješnjaka što čini ribe najbrojnijom skupinom kralješnjaka (Duplić 2008.). Unatoč tome, ribe su slabo istražena skupina i svake godine dolazi do otkrića novih vrsta (Mrakovčić i sur. 2006). Iako je većina Zemljine površine prekrivena vodom udio slatkih voda manji je od 1 %, ali u njima obitava 40 % ribljih vrsta (Duplić 2008). Povezivanjem hranidbenih lanaca vodenih ekosustava, regulacijskim i informativnim ulogama, ribe također imaju biološko značenje u ekosustavu. U Hrvatskoj obitava velik broj slatkovodnih vrsta riba, a među njima je i velik broj endema što čini hrvatsku slatkovodnu ihtiofaunu jednom od najraznolikijih u Europi (Mrakovčić i sur. 2006). Riječ endem dolazi iz grčkog jezika i u prijevodu znači lokalni ili domaći, tj. endemi su organizmi koji nastanjuju određeno područje ili areal i ne nalazimo ih nigdje drugdje. Hrvatska ima velik broj endemskih vrsta riba zbog različitih staništa, klime, ekoloških čimbenika i geomorfoloških čimbenika (Ćaleta i sur. 2015). Slatkovodnu ihtiofaunu hrvatske čini 150 vrsta riba od kojih 21 vrsta nastanjuje slane i bočate vode (Duplić 2008).

Zbog svog jedinstvenog zemljopisnog položaja, Hrvatska obuhvaća crnomorski ili dunavski slijev i jadranski slijev. U dunavskom slijevu obitava 87 vrsta riba od čega je 20 alohtonih (Ćaleta i sur. 2015) i on zauzima veću površinu kopnenih voda od jadranskog slijeva (Mrakovčić i sur. 2006). U jadranskom slijevu obitava 80 vrsta riba od čega je 10 alohtonih. Oba slijeva naseljava 13 ribljih vrsta (Ćaleta i sur. 2015). Zbog djelomično provedenih zoogeografskih analiza nisu poznati stvarni areali koje nastanjuju određene vrste, a nekim skupinama nije uređena taksonomija (Mrakovčić i sur. 2006).

Antropogeno djelovanje uvelike je utjecalo na ihtiofaunu, a posljedica toga je da su slatkovodne ribe danas među najugroženijim kralješnjacima. Ribe su osjetljive na zagrijavanje vode, degradaciju staništa, promjene brzine toka i intenzivna iskorištavanja (Duplić 2008). Djelovanje čovjeka i mijenjanje značajki ekosustava rezultiralo je nestankom određenih vrsta ili smanjenjem populacija. Jedan od razloga ugroženosti slatkovodnih riba je unos stranih ili alohtonih vrsta u prirodna staništa autohtonih vrsta. Alohtone vrste rasle su i evoluirale na drugačijem staništu od onog na koje su unesene pa je teško pretpostaviti kakve posljedice ima unos takvih vrsta u određeni ekosustav (Mrakovčić i sur. 2006). U zadnja dva stoljeća zbog melioracije i regulacije vodotoka

rijeka brojne vrste postale su ugrožene zbog nestanka staništa uslijed promijene toka rijeka i odvajanja rijeka od njihovih poplavnih zona. Na ugroženost slatkovodnih vrsta riba također utječe onečišćenje vodotoka što je posljedica industrijalizacije i urbanizacije. Ribarstvo i turizam također mogu imati negativan učinak na prirodu i okoliš zbog prelova i prekomjernog crpljenja resursa (Ćaleta i sur. 2015).

1.3. Taksonomski položaj i opće značajke vrste *Hucho hucho* (Linnaeus, 1758)

Taksonomski položaj mladice (Mrakovčić, 2006):

CARSTVO: Animalia

KOLJENO: Chordata

RAZRED: Actinopterygii (zrakoperke)

NADRED: Teleostei (prave koštunjače)

RED: Salmoniformes (pastrvke)

PORODICA: Salmonidae (pastrve)

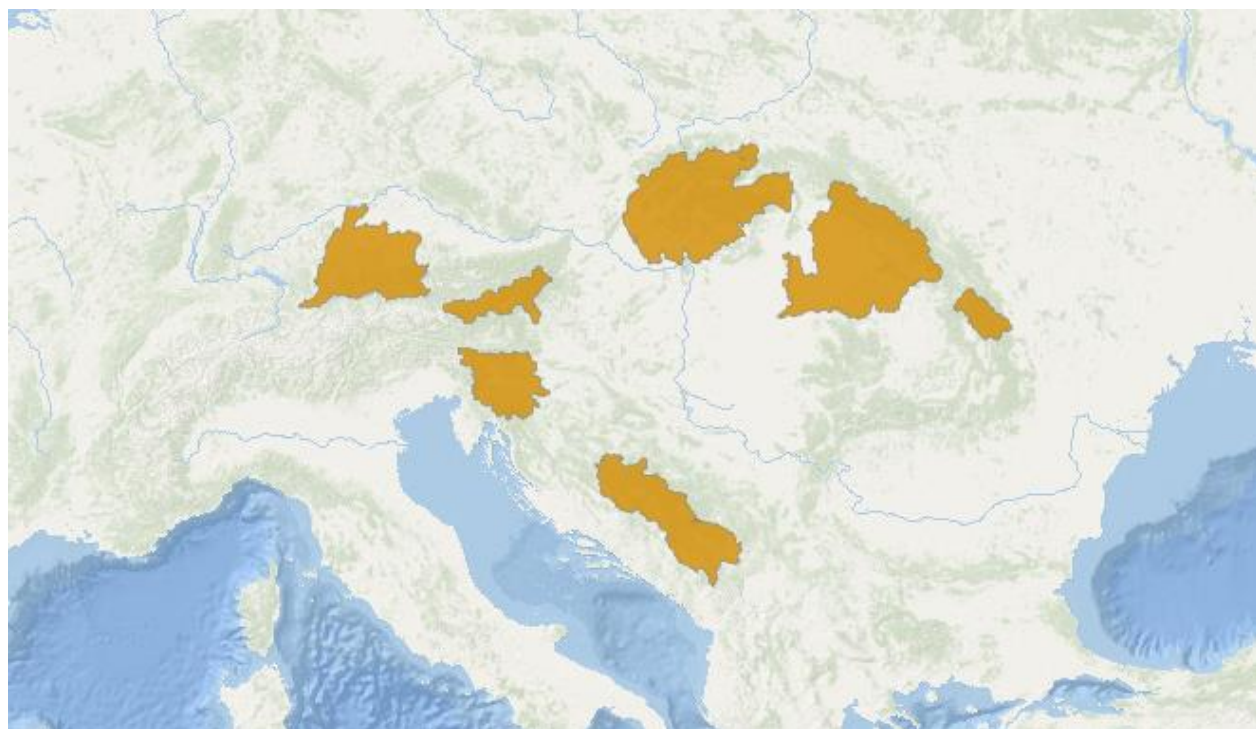
ROD: *Hucho*

VRSTA: *Hucho hucho* (mladica)

Zrakoperke (Actinopterygii) čine najveći razred i njihova se taksonomija neprestano mijenja zbog novih istraživanja. Nadred unutar zrakoperki, prave koštunjače (Teleostei), su najbogatija i najraznovrsnija skupina kralješnjaka te dominiraju svjetskim rijekama, jezerima i oceanima. Opisano je 29 585 vrsta koje pripadaju pravim koštunjačama što čini otprilike 96 % svih ribljih vrsta. Red pastrvki (Salmoniformes) sadrži samo jednu porodicu i to su pastrve (Salmonidae) koje se dijele na tri potporodice s 10 rodova i 223 vrste. Potporodice koje se ubrajaju u Salmonidae su: Coregoninae, Thymallinae i Salmoninae. Pastrve su slatkovodne i anadromne, a obitavaju na sjevernoj hemisferi. Pripadnici reda Salmonidae mogu narasti do duljine od 1,5 m pa su značajni u sportskom i gospodarskom ribolovu. Potporodicu Salmoninae čini šest rodova i 121 vrsta. Rodovi

koji se ubrajaju u Salmoninae su: *Brachymystax*, *Hucho*, *Salvelinus*, *Oncorhynchus*, *Salmo*, *Parahucho*, *Salvethymus*. Pretpostavlja se da se rod *Hucho* dijeli na četiri vrste (Nelson 2006).

Mladica (*Hucho hucho*) se još naziva dunavski losos, mlačak, pastrva glavašica, štulac, gonjavac, huj, sulec (Ćaleta i sur. 2015). Autohtona je vrsta i endem dunavskog slijeva te se nalazi na Crvenom popisu IUCN-a kao ugrožena vrsta (EN) (Freyhof i sur. 2008). U dunavskom je slijevu ima više u desnim pritocima (Mrakovčić i sur. 2006). Izvan Hrvatske mladice nalazimo u Bosni i Hercegovini, Srbiji, Slovačkoj, Poljskoj, Ukrajini, Sloveniji, Mađarkoj, Češkoj, Austriji, Montenegro, Njemačkoj i Rumunjskoj (Slika 2.) (Freyhof i sur. 2008).



Slika 2. Rasprostranjenost mladice (<https://www.iucnredlist.org/species/10264/3186143>).

U Hrvatskoj se nekada nalazila u rijekama: Kupa, Sava, Drava, Dunav, Mežnica, Una i Dobra (Mrakovčić i sur. 2006) te prema Skalinu (1990) u rijeci Muri, a danas je prisutna samo u Kupi i Uni te se rijetko nalazi u Dobri, Dravi i Savi (Ćaleta i sur. 2015) (Slika 3.).



Slika 3. Distribucija mladice u jugoistočnoj Europi s označenim rijekama u kojima se najčešće pojavljuje (zelena boja)

(https://balkanrivers.net/sites/default/files/Huchen_Distribution260215_klein.jpg).

Dobar pokazatelj njezine ugroženosti je činjenica da su se prije drugog svjetskog rata u Dravi nalazile jedinke teške preko 40 kg, a nakon izgradnja nekoliko brana u Dravi je pronađeno samo nekoliko manjih jedinki (Treer i sur. 2014). Najveći razlog njezine ugroženosti je veliki izlov, koji je uzrokovao smanjenje i nestajanje populacija iako je u srednjem vijeku ova vrsta bila jedna od poznatijih pastrvki (Mrakovčić i sur. 2006). Skalin (1990) spominje neke od glavnih problema ugroženosti i nestajanja mladice: intenzivan ribolov, izgradnja brana, akumulacija, regulacija vodotoka te komunalna i industrijska zagađenja. Mladica obitava u hladnijim vodama koje su bogate kisikom pa onečišćenja i eutrofikacija ne pogoduju njezinim populacijama. Mladica je litofilna i bentopelagička vrsta koja živi u dubljim dijelovima rijeka s temperaturom od 6 °C do 18 °C. Odrasle jedinke obitavaju u rijekama nizvodno dok mlađe jedinke obitavaju u gornjem toku

rijeka ili u manjim tekućicama (Mrakovčić i sur. 2006). Uglavnom se nalazi pojedinačno u zoni lipljena i mrene te može živjeti duže od 20 godina (Ćaleta i sur.2015). Zbog svoje osjetljivosti dobar je indikator ekoloških promjena (Tomljanović 2015) te zdravlja ekosustava jer živi samo u čistim vodama (Kucinski i sur. 2015). Jedan od većih problema je gubitak prirodnih staništa na kojima se mladica mrijestila zbog antropogenog djelovanja, tj. zbog mijenjanja tokova rijeka uslijed izgradnje brana (Mrakovčić i sur. 2006).

Zbog brzog rasta (Weiss i sur. 2016), dužine do 1,5 metra i prosječne mase od 10 kg, mladica je u Hrvatskoj najveća vrsta koja se ubraja u Salmonidae (Mrakovčić i sur. 2006). Najveća jedinka ulovljena je 1873 godine i težila je 60 kg, a u 20. stoljeću bilo je i jedinki do 50 kg, no danas pronalazimo manje jedinke koje teže od 5 do 35 kg (Weiss i sur. 2016). Mladica najviše dobiva na dužini i težini tijekom druge godine života, a starenjem se smanjuje rast u dužinu (Mikavica 1987). Glava mladice je dugačka i bočno spljoštena, usta su velika, tijelo je vretenastog i izduženog oblika. Na leđima je sivkastozielene boje, trbuh je svjetliji i srebrnosive boje, a bokovi su također svjetlijih boja. Moguća je pojava tamnih mrlja na bokovima i leđima. Ima veliku mesnu peraju dok su ostale malene (Slika 4.) (Mrakovčić i sur. 2006).



Slika 4. Izgled mladice (<https://riverwatch.eu/en/balkanrivers/background>).

Oko četvrte godine života mladice postanu spolno zrele, a razmnožavanje se odvija u proljeće, tijekom ožujka i travnja. Razmnožavaju se u manjim dubinama pa se krajem ožujka odvija migracija u gornje tokove rijeka u kojima je protok vode brži. Ženka jaja polaže u šljunkovito ili pjeskovito dno, a nakon 30 dana počinje razvoj prvih ličinki (Mrakovčić i sur. 2006). Mladice se

hrane najviše beskralješnjacima kao što su ličinke kukaca, a kad narastu jedu i ribu (Witkowski i sur. 2013).

U posljednjem stoljeću došlo je do velikog smanjenja ili nestanka populacija mladica u rijekama Hrvatske. Neki od razloga su: nemogućnost migracije zbog pregrađivanja vodotoka, krivolov, onečišćenje voda koje ne pogoduje populacijama mladice, nestajanje staništa na kojima su se mrijestile mladice (Čaleta i sur. 2015). Mladice su predatori (Tomljanović 2015) pa problem čini i nestajanje plijena, tj. smanjenje populacije podusta (*Chondrostoma nasus* Linnaeus, 1758) (Čaleta i sur. 2015). Rasprostranjenost mladice na području Hrvatske te ostatka jugoistočne Europe nije sasvim istražena, ali Tomljanović (2015) navodi da na tom području samoodržive populacije mladice zauzimaju 1842 rkm u 43 rijeke. Iako se brojnost mladice od kraja 19. stoljeća smanjila za dvije trećine, stabilne populacije mladica u Hrvatskoj zabilježene su na granici sa Slovenijom u Kupi (102 km) i na granici s Bosnom i Hercegovinom u Uni (122 km). Tomljanović (2015) navodi izgradnju hidroelektrana kao najveći problem koji bi mogao uzrokovati smanjenje populacija mladica, a spominje i postojanje projekata za izgradnju brana na rijekama u kojima živi mladica. Realizacijom tih projekata došlo bi do gubljenja 1000 rkm staništa u kojima živi mladica, a samim time svjetska populacija mladica pala bi na 60 % današnjeg obujma. Neke strategije kojima bi se mogle očuvati populacije mladice su: zaštita staništa na kojima živi mladica, umjetni uzgoj mladica, opskrba staništa mladim jedinkama, edukacija te donošenje strožih zakona za zaštitu mladice (Muhamedagić i sur. 2013).

1.4. Filogeografija, molekularna filogenija i filogenetska rekonstrukcija

Filogeografija je mlado, ali brzo rastuće područje znanosti (Emerson i Hewitt 2005) koje proučava načela i procese geografske distribucije genealoških linija. Kao poddisciplina biogeografije, filogeografija stavlja naglasak na povijesni aspekt prostornih raspodjela genetskih linija. Filogeografija je interdisciplinarna znanstvena disciplina jer uključuje poznavanje molekularne genetike, filogenetike, populacijske genetike, demografije, povijesti i etnologije (Avice 1998). Filogeografija omogućuje bolje razumijevanje raspodjele genske raznolikosti te načine njenog nastanka (Emerson i Hewitt 2005).

Molekularna filogenija (filogenetika) je disciplina koja utvrđuje evolucijske veze između organizama koristeći strukture molekula. Filogenija organizma čini njegovu evolucijsku povijest jer opisuje genetske veze između vrsta i viših taksonomskih jedinica (Lipscomb 1998).

U filogenetskim istraživanjima najviše se koristi mitohondrijska DNA (mtDNA) zbog brze evolucije i prijenosa majčinskom linijom. Rezultat filogenetskih istraživanja je najčešće filogenetsko stablo dobiveno metodama filogenetske rekonstrukcije uz korištenje halotipova sekvenci (Emerson i Hewitt 2005). Uz filogenetska stabla izrađuju se i filogenetske (genealoške) mreže koje za razliku od filogenetskih stabala ne isključuju hibridizaciju, rekombinaciju i lateralni prijenos gena. Zbog toga su u filogenetskim mrežama vidljive poprečne veze između vrsta koje nisu u direktnom srodstvu (Nakhleh i sur. 2005). Iz filogenetskog stabla vidljivi su evolucijski odnosi među organizmima, a svako grananje označava najbližeg zajedničkog pretka. Filogram je vrsta filogenetskog stabla koje jasno prikazuje filogenetske odnose jer je duljina svake grane proporcionalna broju evolucijskih promjena.

Populacijska genetika proučava genetičke strukture cijelih populacija, uzima u obzir mogućnost prijenosa genetičkih informacija iz generacije u generaciju te proučava kako se genetska struktura populacija mijenja kroz vrijeme. To je grana genetike koja se bavi evolucijskim promjenama u populacijama organizama te proučava genetske promjene u kratkom vremenskom roku (nekoliko generacija). Populacijska genetika također proučava genetske sličnosti i razlike populacija (Relethford 2012).

1.5. Genski markeri

Identifikacija vrsta iz nepoznatih uzoraka temelji se na usporedbi DNA sekvenci nepoznatih uzoraka s postojećim sekvencama u bazama podataka. Mitohondrijski gen za citokrom *b* (*cyt b*) je dobar molekularni marker za identifikaciju vrsta jer se nalazi u mitohondrijskom genomu gotovo svih eukariota (Wei 2016) pa se često koristi u filogenetskim istraživanjima. Zbog toga se u bazama podataka nalaze velike količine sekvenci za gen za citokrom *b* (Gupta i sur. 2012). Gen za citokrom *b* smatra se najkorisnijim, najopsežnije sekvencioniranim (Johns i Avise 1998) markerom u filogenetskim istraživanjima odnosa između bliskih svojti (Buj i sur. 2017). Evolucijska dinamika gena *cyt b* i biokemija proteina koji nastaje kao rezultat bolje su opisane od ostalih molekularnih

sustava (Johns i Avise 1998). *Cyt b* sadrži sporo i brzo evoluirajuće kodonske regije pa se koristio za mnoge filogenetske analize populacija (Farias i sur. 2001). Duljine je oko 1141 parova baza i kodira protein veličine 379 aminokiselina (Wei 2016).

Rodopsin je opsin koji pripada receptorima koji su povezani s G-proteinom, a kod kralješnjaka je gen opsina izražen u fotoreceptorskim stanicama kao gen rodopsin. To je nuklearni gen pa omogućuje praćenje biparentalnog nasljeđivanja, a ne samo majčinsku liniju. Istraživanja gena rodopsina su rijetka (Chen i sur. 2018).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Povijesno gledano mladica je bila široko rasprostranjena po čitavom dunavskom slijevu i obitavala je u Dobri, Muri, Savi i Dravi gdje se danas rijetko nalazi (Witkowski i sur. 2013). Krajem devetnaestog stoljeća njezina se populacija smanjila za dvije trećine te danas u Hrvatskoj obitava u Kupi i Uni . Ostatak populacije mladice ugrožen je zbog neprestanog razvoja hidroenergije, krivolova, onečišćenja vode i pregrađivanja vodotoka zbog čega dolazi do nemogućnosti migracija i gubitka mriješnih staništa (Čaleta i sur. 2015). Osim u Hrvatskoj, mladica se nalazi u različitim rijekama i riječnim područjima u Sloveniji, Srbiji, Bosni i Hercegovini i Crnoj gori.

Stvarna distribucija populacija mladice na tom području i dalje je nepotpuna i nepoznata što otežava njezinu adekvatnu zaštitu (Tomljanović 2015). S obzirom na nedostatak podataka, zaštita mladice u Hrvatskoj nije djelotvorna pa su ciljevi ovog istraživanja:

1. opisati gensku strukturu mladice u Hrvatskoj
2. utvrditi stupanj intraspecijske i intrapopulacijske genske raznolikosti
3. provjeriti zavičajnost pojedinih populacija mladice i njihovu različitost u odnosu na ostale europske populacije
4. istražiti evolucijsku povijest mladice u Hrvatskoj.

3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje obuhvatilo je područje dunavskog slijeva Republike Hrvatske na kojem živi mladica, tj. područje porječja Kupe i Save. Zbog malog broja uzoraka te kako bi bila moguća usporedba i s uzorcima prikupljenima izvan Hrvatske, u istraživanje su uključeni i uzorci mladice uzorkovani na području Slovenije, ali bitno je spomenuti da je fokus istraživanja na populacijama mladica s područja Republike Hrvatske. Uzorci mladice uzrokovani u Sloveniji pružaju bolji uvid u gensku strukturu mladica s područja dunavskog slijeva.

Lokacija 1.

Rijeka Kupa nalazi se između Slovenije i Republike Hrvatske, a izvire na 397 m nadmorske visine jugoistočno od Risnjaka u Gorskom Kotaru iz Kupreškog jezera. To je rijeka koja spaja kršku i panonsku Hrvatsku (<https://crorivers.com/kupa/>). Dugačka je 296 km i stvara puno brzaca i slapova. Kod Siska na 97 m nadmorske visine utječe u Savu. U gornjem dijelu toka u rijeci Kupi žive kalifornijska pastrva, potočna pastrva, lipljen i mladica, s tim da je kalifornijska pastrva alohtona. U srednjem dijelu toka rijeke žive mrena, plotica, klen (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758), podust i mladica dok u donjem dijelu toka rijeke Kupe ne živi mladica (<http://ribolovni-savez.hr/ribolovne-vode/kupa/>).

Nekoliko uzoraka uzorkovano je u potoku Curak, pritoku rijeke Kupe, koji izvire u blizini stijene Zeleni vir (<http://zelenivir.com.hr/>). Ostali uzorci sakupljeni su u rijeci Kupi kraj mjesta: Gašparci, Doluš, Kuželj, Brod na Kupi i Jakovci.

Lokacija 2.

Rijeka Ljubljanica poznata je još kao rijeka sa sedam naziva (Unica, Pivka, Trbuhovica, Obrh, Rak, Stržen i Ljubljanica) i nalazi se u središnjoj Sloveniji (Blatnik i sur. 2019). Dugačka je 41 km, a izvor se nalazi pokraj sela Verd kod Vrhnike. Neki od većih lijevih pritoka su Podlpiščica, Horjulščica i Gradaščica u kojima su sakupljeni uzorci za ovo istraživanje, a ostali veći pritoci su: Bela, Mali graben, Ljubija, Bistra, Iška, Besnica, Borovniščica, Ižica, Gobovšek (<https://www.dinarskogorje.com/sliv-rijeke-ljubljanice.html>). Ima izrazito krške karakteristike, a

tok rijeke izmjenjuje se između površinskih dijelova na krškim poljima i podzemnih dijelova koji teku kroz špiljske sustave na vapnenačkoj podlozi. Rijeka prolazi kroz Ljubljansko barje (močvara iz starog vijeka) i grad Ljubljanu, a u blizini naselja Podgrad ulijeva se u Savu kao desna pritoka.. Ima puno manjih pritoka, a oblik korita je uglavnom ravan što je posljedica antropogenog utjecaja jer rijeka teče između travnjaka, oranica i naselja (Germ i sur. 2021).

Rijeka Gradaščica duga je oko 14,5 km od svog izvora do grananja u dva kraka, a oba vodotoka se ulijevaju u Ljubljanicu. Horjulščica izvire kod Šujica, duga je 16 km i ulijeva se u Gradaščicu. Podlipiščica je rijeka duga 13km i ulijeva se u Ljubljanicu kod Sinje Gorice (Povz i sur. 2016).

Lokacija 3.

Rijeka Sava najveća je rijeka u Sloveniji i jedna je od pritoka Dunava. Rijeku Savu zapravo čine dvije rijeke, Sava Bohinjka koja je dugačka 31 km i Sava Dolinka koja je dugačka 45 km. U blizini grada Lesce te se dvije rijeke spajaju u jednu rijeku Savu koja je dugačka 990 km. Prolazi kroz tri Europske države: Sloveniju, Hrvatsku i Srbiju. Gornji dio toka rijeke je planinski pa često oborine u planinama uzrokuju povećanje vode u pritocima (Primožič i sur. 2008).

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzorkovanje

Svi uzorci prethodno su uzorkovani u potocima i rijekama dunavskog slijeva uz pomoć leđnog elektroagregata (elektroribolov) marke Hans Grassl model IG-200-1. To je aktivna metoda uzorkovanja jer uključuje pokretanje alata, u ovom slučaju elektroagregata, prema ribama (Duplić 2008). Elektroribolov omogućuje hvatanje ribe pomoću električne struje, a nakon uzorkovanja svakoj jedinki odrezan je mali uzorak tkiva peraje. Električna struja teče od katode (negativan pol) prema anodi (pozitivan pol) te uzrokuje grčenje i paralizu mišića. Uzorci tkiva pohranjeni su u epruvete s etilnim alkoholom i čuvaju se u zamrzivaču kao bi se spriječila razgradnja DNA. Takvo uzorkovanje omogućuje vraćanje živih i neozlijeđenih jedinki na mjesto ulova (Solley i sur. 1998), a iznimno je korisno kod istraživanja ugroženih ili endemskih vrsta (Buj 2010).

Ranije su se pastrvke uzorkovale elektroribolovom uz pomoć istosmjerne struje što se nije pokazalo najboljim rješenjem zbog velikog broja ozljeda (50%). Najčešće vidljive ozljede su vanjska krvarenja, ali dolazi i do unutarnjih krvarenja i oštećenja kralježnice. Na ozljede utječe i veličina jedinke pa su tako veće jedinke podložnije ozljedama od manjih jedinki iste vrste. Mnoga su istraživanja nakon toga bila usmjerena na bolje razumijevanje i poboljšanje elektroribolova. Ozljede se mogu smanjiti smanjenjem broja impulsa istosmjerne struje u minuti, regulacijom voltaže i trajanja impulsa (Reynolds 1996). Elektroribolov u svrhu ovog istraživanja proveli su stručnjaci sa Zoologijskog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

4.2. Uzorci

Uzorci jedinki mladice prikupljeni su na području rijeka Kupe, Save i Ljubljanice (Tablica 1.).

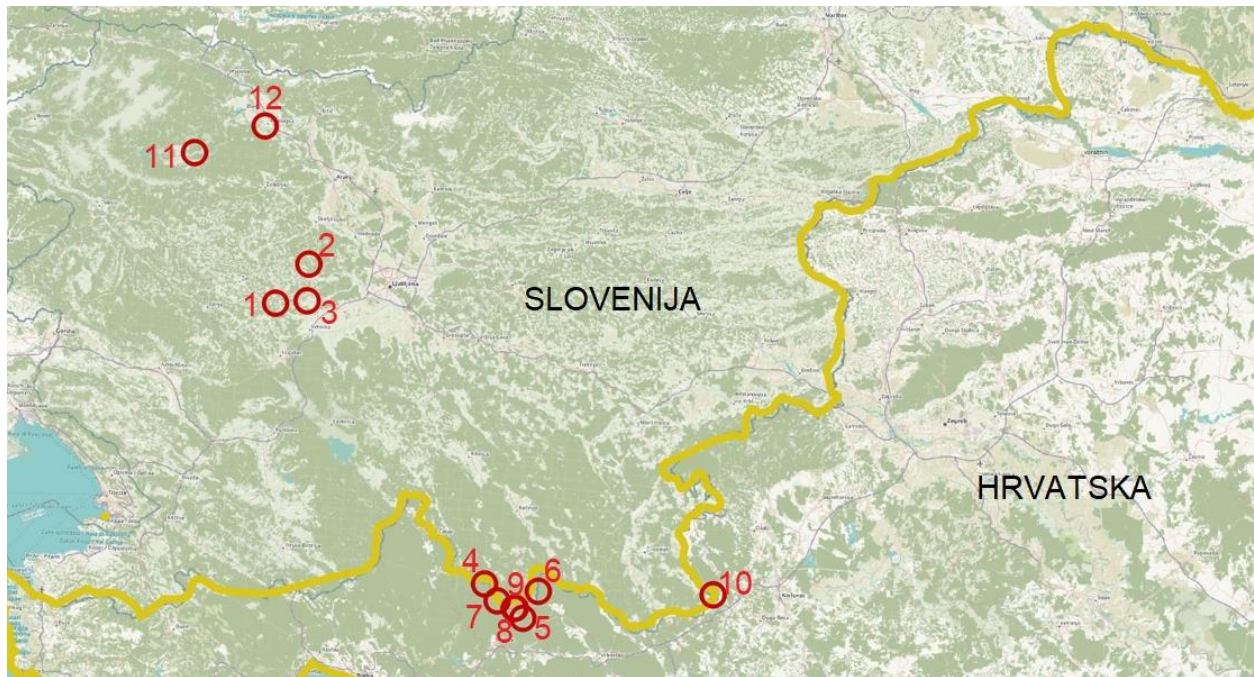
Tablica 1. Popis prikupljenih uzoraka mladica koje su korištene u istraživanju s odgovarajućim kodom, vremenom i mjestom prikupljanja te točnim koordinatama.

porječje	lokalitet	Koordinate	Datum	Kod
Ljubljana	Podlipiščica (1)	X= 322398,297 Y= 5099738,701	26.09.2013	HULJU1, HULJU2
Ljubljana	Gradaščica (2)	X= 329211,972 Y= 5107732,196	18.09.2013.	HULJU3,HULJU4, HULJU5, HULJU 6, HULJU 7, HULJU8
Ljubljana	Horjulščica (3)	X= 328864,921 Y= 5100228,792	18.09.2013.	HULJU9
Ljubljana	Horjulščica (3)	X= 328864,921 Y= 5100228,792	2019.	HULJU10, HULJU11
Kupa	Gašparci (4)	X= 365167 Y= 5042283	16.12.2019.	HUKU1
Kupa	Curak (5)	X= 373006,44 Y= 5035254	16.08.2020.	HUKU2, HUKU3, HUKU4, HUKU5
Kupa	Doluš (6)	X= 376161,62 Y= 5040779,85	13.12.2020.	HUKU6, HUKU7
Kupa	Kuželj (7)	X= 367742,875 Y= 5038823,132	20.11.2020.	HUKU8, HUKU9, HUKU10, HUKU11
Kupa	Brod na Kupi (8)	X= 371225,992 Y= 5037299,606	27.11.2019.	HUKU12, HUKU13, HUKU13
Kupa	Brod na Kupi (9)	X= 371457 Y= 5037321	01.07.2020.	HUKU15

Tablica 1. Nastavak

Kupa	Jakovci (10)	X= 411945,195 Y= 5040047,201	16.12.2020.	HUKU16
Kupa	Jakovci (10)	X= 411945,195 Y= 5040047,201	17.12.2020.	HUKU17
Sava	Bohinjka (11)	X= 305824,149 Y= 5130568,319	2019.	HUSA1, HUSA3, HUSA5, HUSA6
Sava	Sava (12)	X= 320258,106 Y= 5136022,39	2019.	HUSA2, HUSA4

Pomoću program QGIS 3.20.2 (QGIS Development Team 2009) izrađena je karta s lokacijama na kojima se provodilo uzorkovanje (Slika 5.).



Slika 5. Karta područja uzorkovanja jedinki u Republici Hrvatskoj i Sloveniji s označenom državnom granicom (žuta boja) i točnim lokacijama uzorkovanja (crveni kružići).

4.3. Laboratorijski postupci

4.3.1. Izolacija DNA

Ukupnu genomsku DNA izolirala sam iz uzorka tkiva peraje uz pomoć DNeasy Blood & Tissue kompleta za izolaciju tvrtke QIAGEN prema protokolu. Uzorke tkiva peraja izvadila sam iz epruveta u kojima su se čuvali i škaricama ih izrezala na manje komadiće veličine otprilike 0,5 cm. Po jedan komadić uzorka tkiva stavila sam u novu Eppendorf epruveticu. Svakom uzorku tkiva u Eppendorf epruvetici mikropipetom (Eppendorf Research plus) sam dodala 180 µL pufera ATL, potom sam dodala 20 µL protein kinaze. Sadržaj svake Eppendorf epruvetice promiješala sam miješalicom (BIO RAD BR-2000 Vortexer) i nakon toga stavila u vodenu kupelj (SHEL LAB model no:1225) temperature 56 °C na 24 h. Nakon 24 h izvadila sam uzorke iz vodene kupelji i sadržaj svake Eppendorf epruvetice promiješala miješalicom. U svaku Eppendorf epruveticu dodala sam 200 µL pufera AL i sadržaj epruvetice promiješala miješalicom. Potom sam u svaku epruveticu dodala 200 µL etanola (96 %) i sadržaj epruvetice promiješala miješalicom. Sadržaj svake Eppendorf epruvetice (650 µL) ispipetirala sam u epruvetice s membranom i centrifugirala (Eppendorf Centrifuge 5424) na 8000 rpm 1 minutu. Nakon toga membrane sam prebacila u nove epruvetice i dodala 500 µL pufera AW1. Epruvetice sa sadržajem stavila sam u centrifugu na 8000 rpm na 1 minutu. Membrane sam ponovno prebacila u nove epruvetice i dodala 500 µL pufera AW2. Epruvetice sa sadržajem ponovno sam stavila u centrifugu na 14000 rpm na 3 minute. Potom sam membrane prebacila u nove epruvetice i dodala 150 µL pufera AE te sam uzorke ostavila na sobnoj temperaturi 2-3 minute nakon čega sam ih prebacila u centrifugu na 8000 rpm na 1 minutu. Nakon centrifuge, membrane sam izvadila iz epruvetica koje sam pohranila u zamrzivač s odgovarajućim kodom.

4.3.2. Umnažanje gena lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

U lančanoj reakciji polimerazom dolazi do umnažanja manjeg dijela molekule DNA *in vitro*, a rezultira velikim brojem kopija DNA (Ambriović-Ristov i sur. 2007). Metoda je temeljena na

umnažanju molekula DNA uz DNA-polimerazu (enzim) koja služi kao katalizator same sinteze DNA. Dolazi do razdvajanja lanaca (denaturacije DNA) pod utjecajem temperature, a nakon toga jednolančana DNA služi kao kalup prilikom sinteze komplementarnog lanca. Rezultat takve reakcije je velik broj ciljanog fragmenta DNA. DNA-polimeraza, neophodna u ovoj reakciji, treba kratke isječke DNA (početnice) koje su komplementarne početnom i završnom dijelu gena koji se umnaža (Tablica 2.). Izolirani DNA uzorak prvo se zagrijava na 96 °C prilikom čega dolazi do razdvajanja komplementarnih lanaca DNA. Zatim slijedi spajanje početnica na jednolančanu DNA i to se odvija pri temperaturi od 55 °C. Na kraju se smjesa ponovno zagrijava na 72 °C kako bi se potaknula sinteza komplementarnog lanca (Pećina-Šlaus 2009).

Izoliranu genomsku DNA koristila sam za pripremu lančane reakcije polimerazom (PCR) za genomske markere *cyt b* i *rhod*. Za pripremu uzoraka za PCR koristila sam HotStarTaq Plus Master Mix komplet kemikalija tvrtke QIAGEN. Početnice potrebne za umnažanje DNA sintetizirane su u servisima Macrogen Europe i Eurofins Genomics. Uzorke za PCR pripremila sam u epruveticama za PCR. Za analiziranje gena za citokrom *b* i rodopsin u svaku epruveticu ispipetirala sam 12,5µL mješavine kemikalija za PCR, 8,5 µL mješavine početnica i 4 µL izolirane genomske DNA. Lančanu reakciju polimerazom provela sam u laboratoriju pomoću uređaja za PCR (Eppendorf Mastercycler Nexus GX2).

PCR uvjeti za gen *cyt b*:

10 min 95,0 °C

35× 00:15 92,0 °C

01:30 48,0 °C

01:45 72,0 °C

7 min 72,0 °C

PCR uvjeti za gen *rhod*:

35× 1 min 92,0 °C

35× 1 min 30 °C

35× 1:30 min 72 °C

35× 7 min 72 °C

Tablica 2. Početnice korištene u istraživanju za gen *cyt b* i rhod

Početnice	sljed nukleotida
L-cyp	GAYTTGAARAACCACGTTG
H-cyp	CCTAGCTTTGGGAGYTAGG
Rhf2	TACAACAACGAGTCCTTCG
Rhr1	ATCTACATGTTYCTTGCCAC

4.3.3. Elektroforeza

Nakon završetka PCR reakcija, uspješnost sam provjerila elektroforezom na agaroznom gelu. To je tehnika kojom se razdvajaju proteini ili nukleinske kiseline na temelju pokretljivosti u agaroznom gelu koji se nalazi u polu istosmjerne struje. Pokretljivost ovisi o veličini molekula, o jačini električnog polja, koncentraciji agaroze, sastavu pufera, a ako se radi o molekuli DNA ovisi i o njezinoj konformaciji. Molekule se kreću kroz gel od negativnog pola (katode) prema pozitivnom polu (anodi). Agarozni gel koji se koristi je smjesa polisaharida (D-galaktoza i L-galaktoza). Ovom metodom provjerava se uspješnost PCR reakcija (Pećina-Šlaus 2009).

Agarozni gel sam napravila od 1 g agaroze (Thermo Scientific TopVision Agarose Tablets) i 100 mL TAE pufera koji sadrži mješavinu etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), octene kiseline i tris baze. Smjesu sam ostavila na sobnoj temperaturi 4 minute, a nakon toga sam je prebacila u mikrovalnu pećnicu na 2 minute. Nakon dvije minute smjesu sam izvadila iz mikrovalne pećnice i ostavila da se ohladi 5 minuta na sobnoj temperaturi. U ohlađenu smjesu dodala sam boju za agarozni gel (invitrogen SYBR Safe DNA gel stain), a potom sam smjesu ulila u kadicu za gel. U kadicu sam ubacila češljice i tako pripremljen agarozni gel ostavila sam da se ohladi na sobnoj temperaturi 25 minuta. Kad se agarozni gel ohladio, izvadila sam češljice te sam uzorke pipetirala u jažice. Agarozni gel s uzorcima postavila sam u kadicu za elektroforezu (BIO RAD SUB-CELL GT i BIO RADPOWER PAC 300). Elektroforezu sam provela na 120 V, 30 minuta i 400 mA.

Nakon elektroforeze agarozni gel sam fotografirala pomoću uređaja za slikanje s UV svjetlom (FastGene GelPic LED Box). Uzorke uspješnih PCR reakcija poslala sam na pročišćivanje i sekvenciranje u MacroGen Europe.

4.4. Računalne analize

4.4.1. Analiza sekvenci

Sravnjivanje sekvenci odradila sam u programu BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (Hall 1999) pri čemu sam svaku sekvencu pregledala što uključuje i detaljan pregled svakog kromatograma. Sekvence koje nisu bile pogodne za sravnjivanje ili je njihov kromatogram bio nejasan isključila sam iz daljnjih analiza. Uspješno je sravnjena 31 *cyt b* sekvenca duljine 1141 pb (parova baza) i 33 *rhod* sekvence duljine 831 pb. Uz pomoć programa DnaSP5.10 (Librado i Rozas 2009) odredila sam haplotipove.

4.4.2. Filogenetska rekonstrukcija

Filogenetsku rekonstrukciju koristila sam u svrhu utvrđivanja srodstvenih odnosa mladica na području dunavskog slijeva u Hrvatskoj. U filogenetsku rekonstrukciju uključila sam haplotipove dobivene ovim istraživanjem, sekvence sa Zoologijskog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i sekvence iz Banke gena. Koristila sam sekvence iz Banke gena vrsta: *Salmo labrax* (Pallas, 1814), *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758), *Salvelinus alpinus* (Linnaeus, 1758), *Salmo salar* (Linnaeus, 1758), *Salmo obtusirostris* (Heckel, 1851). Također sam koristila sekvence vrsta: *Salmo labrax*, *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758), *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo obtusirostris*, pohranjene na Zoologijskom zavodu. Za ukorjenjivanje stabala za gen *cyt b* koristila sam sekvencu iz Banke gena vrste *Acipenser ruthenus* (Linnaeus, 1758). Za ukorjenjivanje stabla za gen *rhod* koristila sam sekvencu sa Zoologijskog zavoda vrste *Squalius squalus* (Bonaparte, 1837) (Tablica 3.).

Filogenetsku rekonstrukciju bazirala sam na metodama najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti, a analize sam provela pomoću programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2003) i MEGA X (Kumar i sur. 2018).

Metode filogenetske rekonstrukcije koje sam koristila u ovom istraživanju su metoda najveće parsimonije (MP) i metoda najveće vjerojatnosti (ML). To su metode koje rezultiraju filogramima i filogenetskim stablima, a rade izravno na sekvencama. Analize MP i ML provela sam pod heurističkim modelom uz 100 ponavljanja, nasumičnim redoslijedom unošenja taksa i preklapanjem grana dijeljenjem i ponovnim povezivanjem. Jednaku težinu imala su sva mjesta kodona i sve nukleotidne supstitucije. Podržanost grananja utvrdila sam provođenjem analize samopodržanja uz 1000 ponavljanja i 10 replika dodatnih sekvenci.

Tablica 3. Sekvence iz Banke gena korištene za filogenetsku rekonstrukciju

ime sekvence	kod iz Banke gena	Referenca
<i>Hucho hucho</i> 1	JX960797	Crête-Lafrenière i sur. 2012
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 1	HQ167694	Keskin, neobjavljeno
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 2	JX960813	Crête-Lafrenière i sur. 2012
<i>Oncorhynchus mykiss</i> 3	JX960815	Crête-Lafrenière i sur. 2012
<i>Thymallus thymallus</i> 1	JX960868	Crête-Lafrenière i sur. 2012
<i>Thymallus thymallus</i> 2	JX960869	Crête-Lafrenière i sur. 2012
<i>Salvelinus alpinus</i> 1	HQ167698	Keskin, neobjavljeno
<i>Salvelinus alpinus</i> 2	JX960845	Crête-Lafrenière i sur. 2012
<i>Salvelinus alpinus</i> 3	JX960846	Crête-Lafrenière i sur. 2012
<i>Salvelinus alpinus</i> 4	JX960844	Crête-Lafrenière i sur. 2012
<i>Acipenser ruthenus</i>	MT449936	Ma, neobjavljeno
<i>Salmo salar</i>	NM001123537	Philip i sur. 2020

Metoda najveće parsimonije određuje evolucijsko stablo (jedno ili više njih) za koje treba minimalan broj evolucijskih promjena, a objašnjava razlike između analiziranih sekvenci (Mount 2001). Indeksi koji se koriste za opisivanje evolucijskog stabla nastalog metodom najveće parsimonije su: indeks konzistencije (CI), indeks homoplazije (HI), indeks retencije (RI), indeks reskalirane konzistencije (RC).

Metoda najveće vjerojatnosti određuje evolucijsko stablo (ili više njih) s najvećom vjerojatnošću primjećivanja podataka koji određuju to stablo. Ovom metodom dobiva se stablo velike vjerodostojnosti jer se konačna vrijednost dobiva na temelju izračuna vjerojatnosti svakog nukleotidnog mjesta.

Metoda samopodržavanja ili „bootstrap“ metoda koristi se za provjeravanje pouzdanosti grananja filogenetskih stabala. Iz stvarnog skupa podataka nasumično se uzimaju podaci i kreira se novi skup iste veličine te se taj postupak ponavlja nekoliko stotina puta, a iz svakog se skupa računaju određeni parametri. Tako se statistički određuje varijabilnost parametra (Efron i Gong 1983).

Uz pomoć programa Network 4.5.1.6. (Fluxus Technology Ltd.) metodom susjednog povezivanja napravila sam filogenetsku mrežu temeljenu na haplotipovima dobivenima istraživanjem te pridruženim sekvencama iz Banke gena.

4.4.3. Određivanje genskog polimorfizma

Kada se na jednom genskom lokusu unutar populacije nalazi više od jednog alela govorimo o genskom polimorfizmu. U populacijama je u prosjeku 30 % genskih lokusa polimorfno, a sam lokus nekog gena je polimorfan ukoliko se u populaciji pojavljuje s frekvencijom većom od 5 % (Pavlica 2012). Genski polimorfizam može biti posljedica slučajnih događaja ili može biti potaknut vanjskim čimbenicima, a uzrokovan je mutacijama (Ismail i Essawi, 2012).

Uz pomoć programa DnaSP5.10 odredila sam mjere kojima se opisuje genski polimorfizma: n (broj sekvenci), S (broj polimorfnih mjesta), Eta (broj mutacija), h (broj haplotipova), Hd (raznolikost haplotipova), Pi (nukleotidna raznolikost) i k (prosječan broj razlika nukleotida).

4.4.4. Procjena broja migranata po generaciji i efektivne veličine populacija

Protok gena je uspješan prijenos alela iz jedne populacije u drugu. Često igra veliku ulogu u evoluciji populacija. Procvatom konzervacijske genetike 1980-ih počelo je proučavanje manjih populacija i utjecaja fragmentacije staništa na njihove populacije. U to vrijeme protok gena činio se kao dobro rješenje kojim se može povećati brojnost populacija, ali danas je poznato da protok gena može dovesti rijetke vrste do povećanog rizika od izumiranja (Ellstrand i sur. 2016). Uz pomoć programa Migrate 3.7.2. (Beerli 2019) odredila sam koeficijente migracija između populacija mladice i Θ parametre. Broj migranata po generaciji izračunala sam pomoću formule:

$$N_{X \rightarrow Y} = M_{X \rightarrow Y} \times \Theta_Y ,$$

gdje $N_{X \rightarrow Y}$ označava broj migranata po generaciji iz populacije X u populaciju Y, $M_{X \rightarrow Y}$ označava koeficijent migracije, a Θ_Y označava Theta parametar.

Jedan od osnovnih parametara populacijske genetike, i bitan za istraživanja, je veličina populacije odnosno broj reproduktivno sposobnih jedinki u populaciji. Ponekad se taj broj ne može s točnošću odrediti jer se u obzir ne uzimaju faktori kao što su omjer spolova, broj potomaka po jedinci i mnogi drugi. Rezultat toga je efektivna veličina populacije ili N_e kao teorijski koncept koji uključuje varijacije određenih čimbenika (Hendrick 2009). Efektivnu veličinu populacija izračunala sam pomoću formule:

$$N_e = \Theta / \mu ,$$

gdje su Θ parametri koje sam odredila uz pomoć programa Migrate, a za stopu mutacija ($\mu=0,0000012$) uzela sam broj prosječne stope mutacija po generaciji za Salmonidae (Crête-Lafrenie`re i sur. 2012).

Parametri su određeni Bayesovom metodom koja pomoću iskaza vjerojatnosti odgovara na istraživačka pitanja o nepoznatim parametrima.

4.4.5. Analiza evolucijske povijesti

Uz pomoć programskog paketa BEAST v1.10.4 (Suchard i sur.2018) analizirala sam evolucijsku povijest populacija mladice. BEAST je program kojim sam dobila filogenetsko stablo s vremenskom skalom. Iz programskog paketa koristila sam programe: BEAUti, BEAST, TreeAnnotator, FigTree. Podatke o sekvencama unijela sam u program BEAUti koji je dizajnirao analizu i generirao datoteku za program BEAST. Takvu datoteku sam otvorila u programu BEAST koji vrši analizu. Rezultat analize je datoteka koju sam otvorila u programu TreeAnnotator koji je iz takve datoteke reproducirao stablo. Stablo sam otvorila u programu FigTree koji prikazuje informacije dobivene programom TreeAnnotator te sam dodatno grafički uredila. Analizu sam provela uz 10000000 ponavljanja, stopu mutacija postavila sam na 0,31 %, odabrala sam evolucijski model HKY te odbacivanje od 2000 stabala.

5. REZULTATI

5.1. Genska struktura mladice

U programu BioEdit Sequence Aligment Editor uspješno sam sravnala 31 sekvencu za gen *cyt b* duljine 1141 pb i 33 sekvence za gen *rhod* duljine 831 pb. Analizom sravnjenih sekvenci za gen *cyt b* u programu DnaSP dobila sam tri haplotipa (Tablica 4.). Iz tablice 4. vidljivo je da Hap1 brojčano prevladava u skupini analiziranih uzoraka dok su ostala dva haplotipa slabije zastupljena. Hap2 zabilježen je u dva uzorka, a Hap3 samo u jednom uzorku.

Tablica 4. Haplotipovi s pridruženim sekvencama za gen *cyt b*

haplotip	kod sekvence
Hap1	HULJU9, HULJU8, HULJU6, HULJU5, HULJU2, HULJU11, HULJU4, HULJU3, HUKU2, HUKU3, HUKU16, HUKU17, HUKU6, HUKU7, HUKU8, HUKU9, HUKU4, HUKU10, HUKU12, HUKU13, HUKU5, HUKU15, HUSA1, HUSA2, HUSA3, HUSA4, HUSA5
Hap2	HUKU1, HUKU11
Hap3	HUKU14

Analizom sravnjenih sekvenci za gen *rhod* u programu DnaSP dobila sam tri haplotipa. (Tablica 5.). Iz tablice 5. vidljivo je da također jedan haplotip uvelike prevladava u skupini analiziranih uzoraka te da su ostala dva haplotipa slabo zastupljena. Hap2 i Hap3 zastupljeni su samo u jednom uzorku kao rezultat heterozigotnog mjesta i ne javljaju se u ostalim analiziranim uzorcima.

Tablica 5. Haplotipovi s pridruženim sekvencama za gen rhod

haplotip	kod sekvence
Hap1	HULJU9 1, HULJU 9 2, HULJU8, HULJU10 1,HULJU10 2, HULJU7 1,HULJU7 2, HULJU5 1,HULJU5 2, HULJU4 1,HULJU4 2, HULJU11 1,HULJU11 2, HULJU6 1,HULJU6 2, HULJU3 1,HULJU3 2, HULJU1 1,HULJU1 2, HULJU2 1, HULJU2 2, HUKU3 2, HUKU16 1,HUKU16 2, HUKU17 1, HUKU17 2, HUKU4 1, HUKU4 2, HUKU11 1, HUKU11 2, HUKU6 1, HUKU6 2, HUKU7 1, HUKU7 2, HUKU8 1, HUKU8 2, HUKU9 1, HUKU9 2, HUKU12 1, HUKU12 2, HUKU13 1, HUKU13 2, HUKU14 1, HUKU14 2, HUKU15 1, HUKU15 2, HUKU5 1, HUKU5 2, HUSA1 1, HUSA1 2, HUSA2 1, HUSA2 2, HUSA3 1, HUSA3 2, HUSA4 1, HUSA4 2, HUSA5 1, HUSA5 2, HUSA6 1, HUSA6 2
Hap2	HULJU8 1
Hap3	HUKU3 1

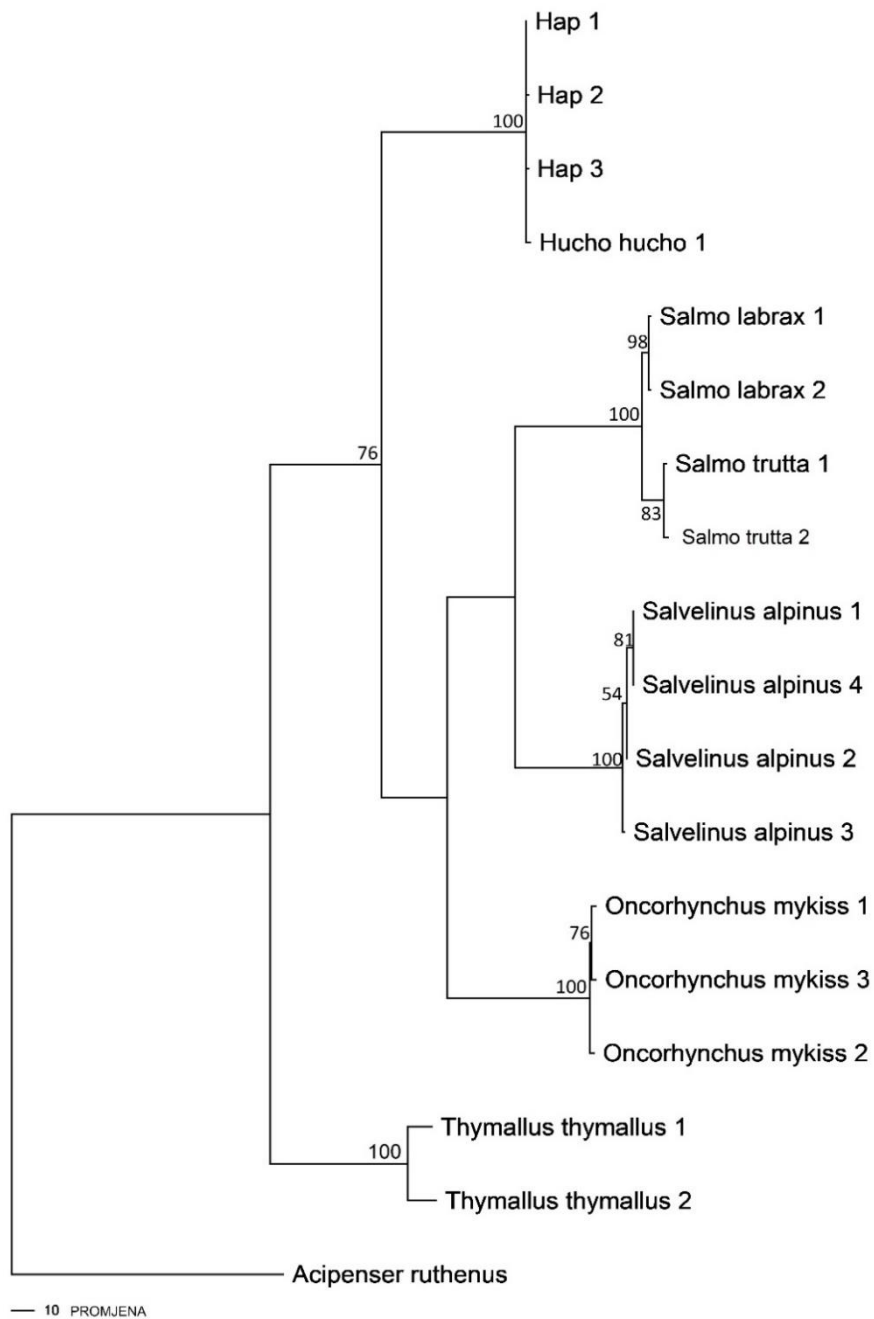
5.2. Filogenetski položaj mladice

U filogenetsku analizu za gen citokrom *b* uz 3 dobivena haplotipa uključila sam i sekvence iz Banke gena te sekvence sa Zoologijskog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Uz pomoć programa MEGAX i PAUP metodama najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti dobila sam dva stabla prikazana na slikama 6 i 7.

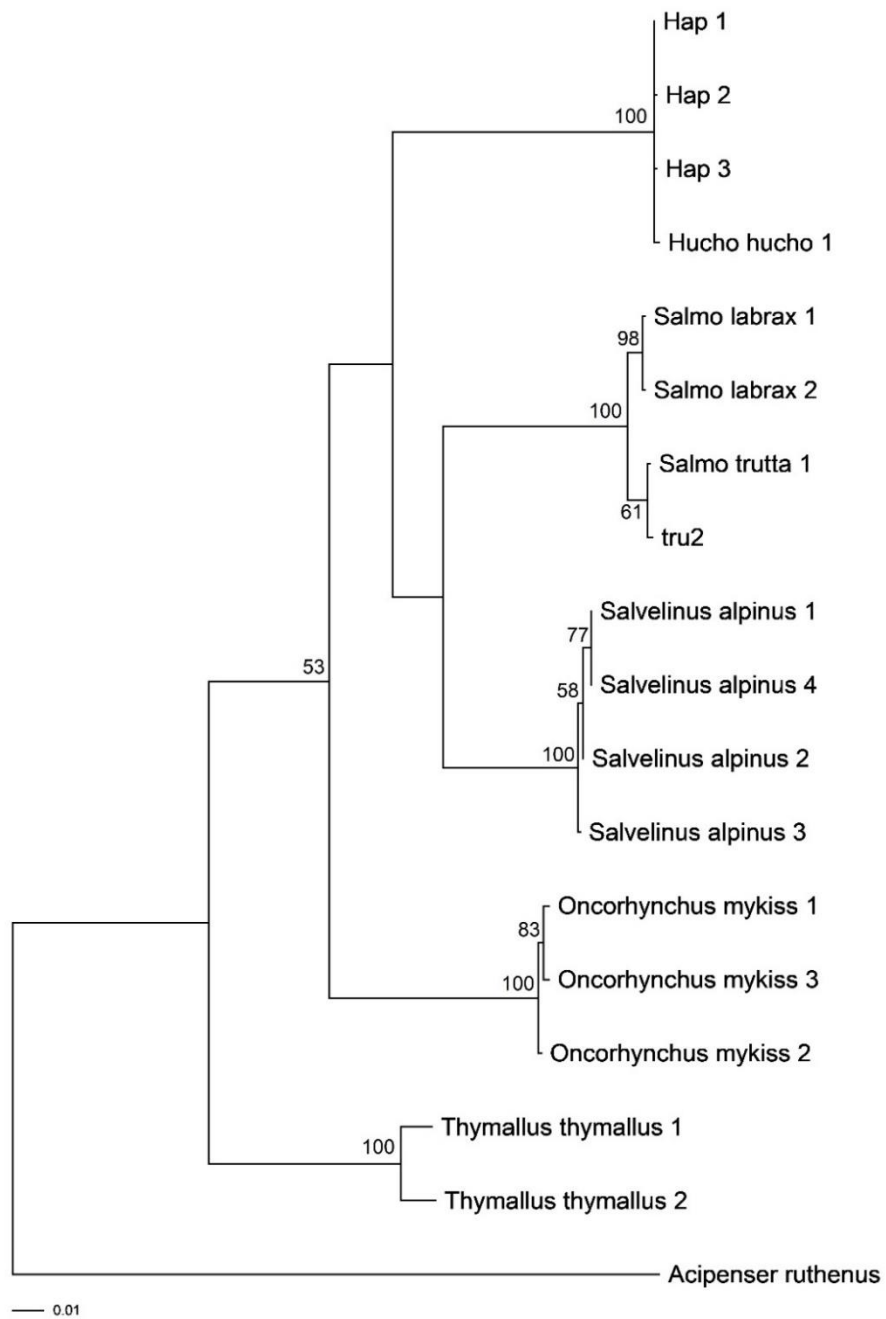
Filogenetsko stablo koje sam dobila metodom najveće parsimonije za gen citokrom *b* (Slika 6.) pokazuje jasno odvajanje roda *Hucho* od ostalih rodova unutar Salmonidae. Rod *Salmo*, *Salvelinus* i *Oncorhynchus* međusobno su srodniji, a rod *Hucho* je monofiletska linija odvojena od ostalih rodova. Rod *Thymallus* posebno je odvojen od ostalih rodova te predstavlja posve odvojenu liniju. Podržanost grananja uglavnom je vrlo velika.

Filogenetsko stablo koje sam dobila metodom najveće vjerojatnosti za gen *cyt b* (Slika 7.) potvrđuje rezultate metode najveće parsimonije. Stabla su slične topologije, a podržanost grananja

je velika. U filogenetskom stablu koje sam dobila metodom najveće vjerojatnosti rod *Hucho* je bliži rodovima *Salmo* i *Salvelinus*, a rod *Oncorhynchus* se ranije odvaja. Topologija i ovog stabla ukazuje na zaseban položaj roda *Thymallus*, u odnosu na ostale predstavnike porodice Salmonidae.



Slika 6. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) za cyt *b*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.

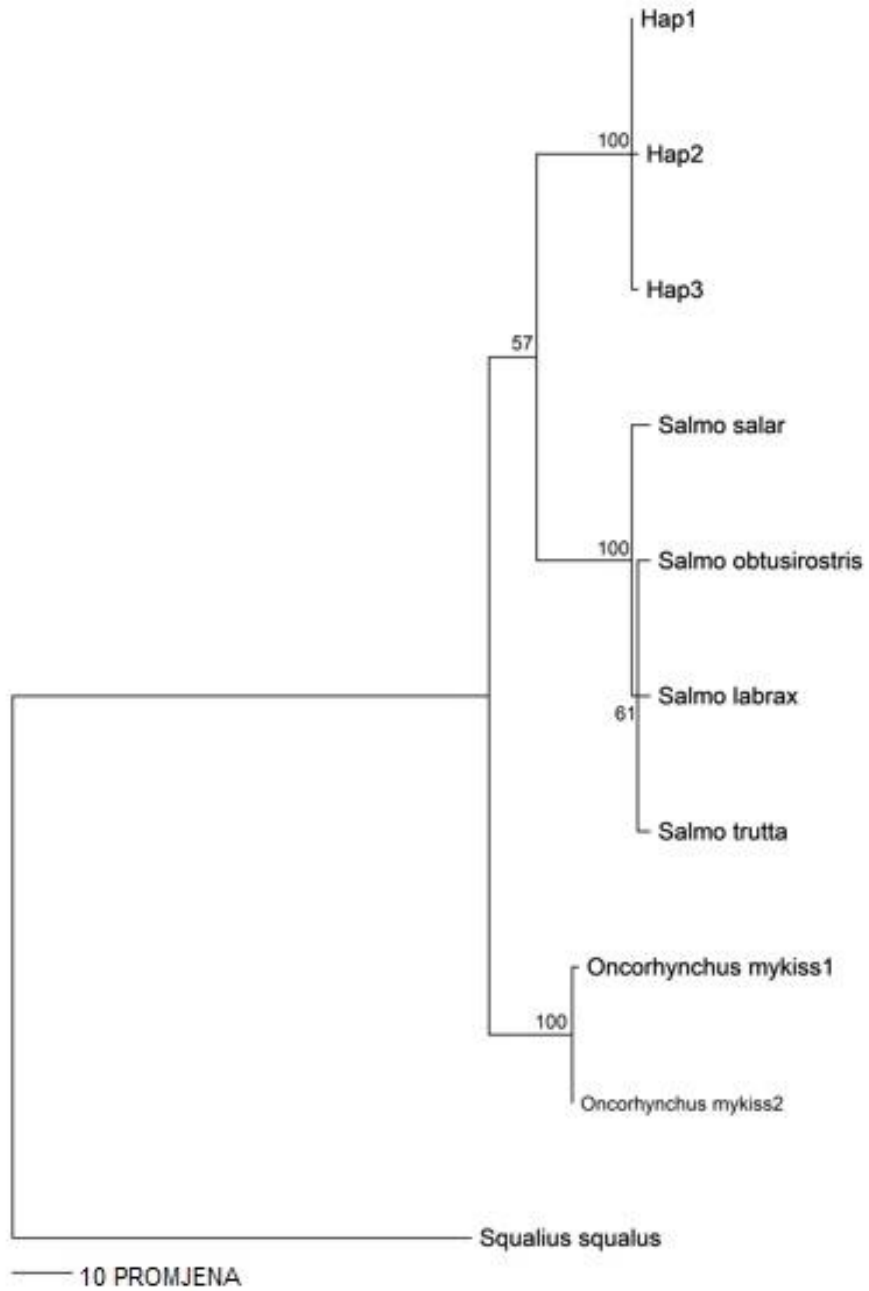


Slika 7. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) za cyt *b*. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.

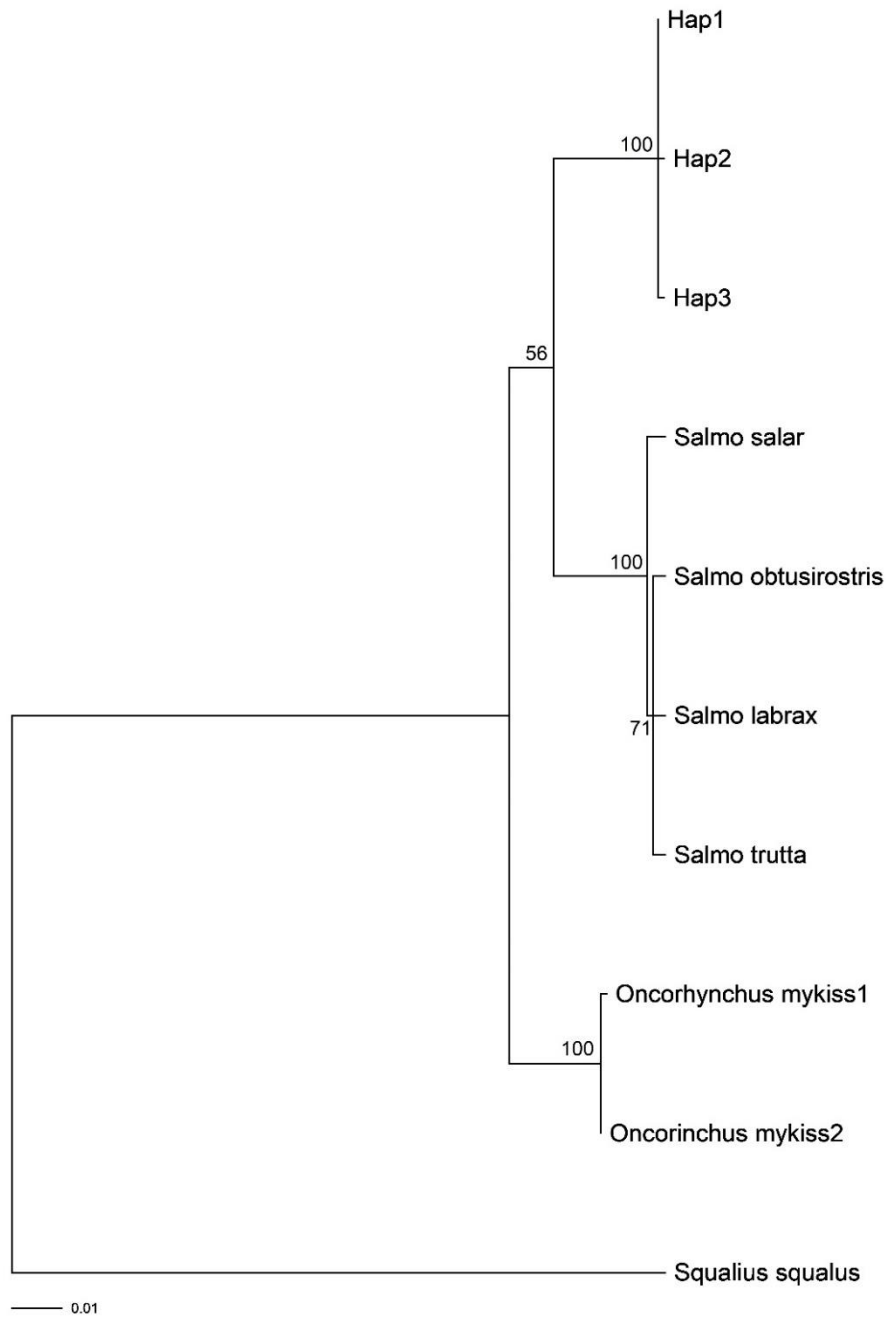
U filogenetsku analizu sekvenci gena za rodopsin uz 3 dobivena haplotipa uključila sam i sekvence iz Banke gena te sekvence sa Zoologijskog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Uz pomoć programa MEGAX i PAUP metodama najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti dobila sam dva stabla prikazana na slikama 8 i 9.

Filogenetsko stablo koje sam dobila metodom najveće parsimonije za gen rodopsin (Slika 8.) potvrdilo je rezultate dobivene na temelju gena za citokrom *b*. Mladica ima nezavisan filogenetski položaj, evolucijski je odvojena linija, ali se nalazi unutar porodice Salmonidae. Filogenetsko stablo koje sam dobila metodom najveće vjerojatnosti za gen rodopsin (Slika 9.) potvrđuje rezultat metode najveće parsimonije te su stabla iste topologije. Podržanost grananja velika je u oba slučaja.

S obzirom na nisku gensku raznolikost dobivenu za gen rodopsin, tj. postojanja samo tri haplotipa od kojih jedan uvelike prevladava, daljnje analize radila sam isključivo na sekvencama za gen citokrom *b*.

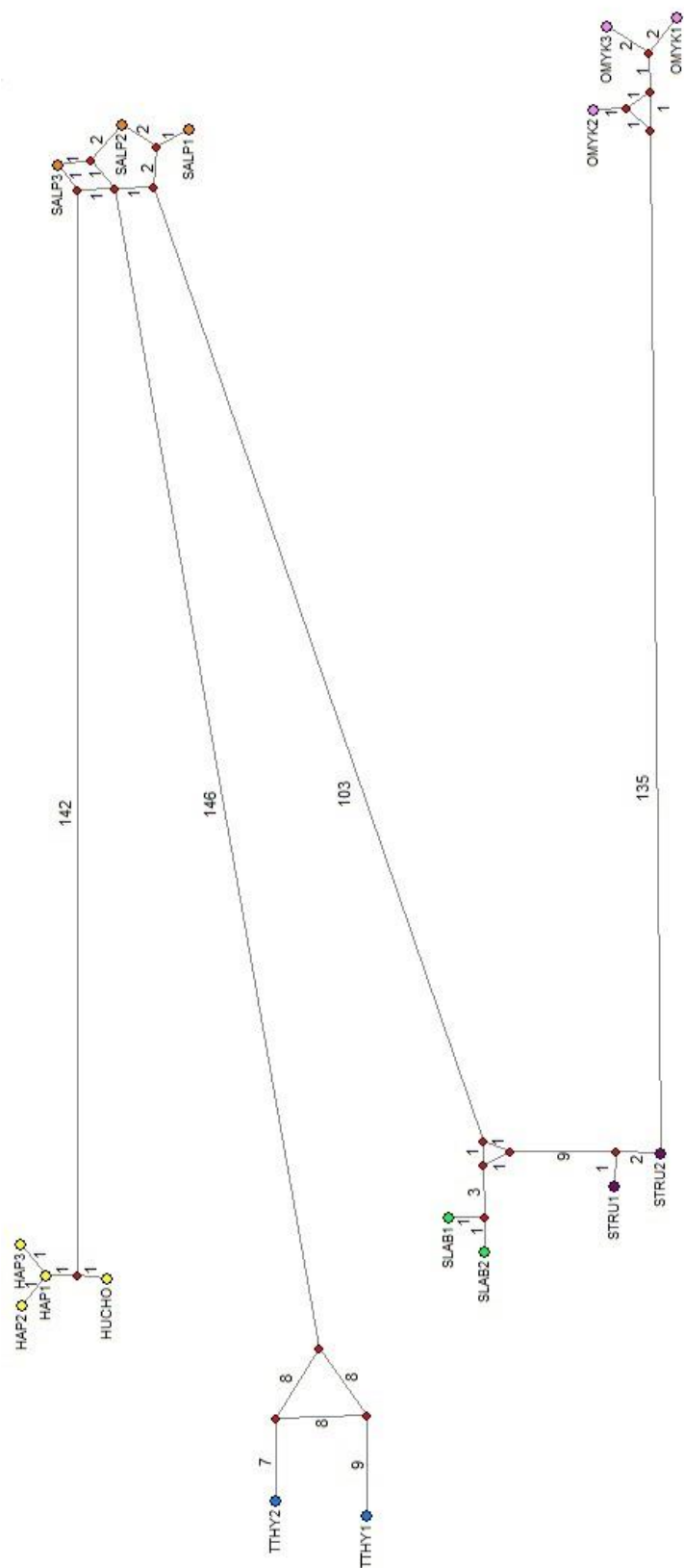


Slika 8. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije (MP) za rhod. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.



Slika 9. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti (ML) za rhod. Brojevi pored grananja označavaju podržanost u postocima.

Filogenetsku mrežu napravila sam pomoću programa Network na temelju *cyt b* sekvenci. Ona potvrđuje te ilustrativnije prikazuje rezultate dobivene metodama najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti. Jasno je vidljivo odvajanje roda *Hucho* od ostalih rodova unutar Salmonidae: *Salmo*, *Salvelinus*, *Oncorhynchus* i *Thymallus*. Iako je rod *Hucho* filogenetski odvojen od ostalih rodova, unutar samog roda nema velike genske raznolikosti (3 haplotipa). Jasno se vidi da Hap1 i *Hucho* (iz Banke gena) imaju zajedničkog pretka, a Hap2 i Hap3 su nastali mutacijama iz Hap1. Osim toga vidljivo je da je rod *Hucho* najbliži rodu *Salvelinus*, a najmanje srodan rodu *Oncorhynchus*.



Slika 10. Filogenetska mreža dobivena metodom susjednog povezivanja za gen *cyt b*. Svaka vrsta označena je drugom bojom, a brojevi na linijama označavaju broj mutacija.

5.3. Intraspecijska i intrapopulacijska genska raznolikost

Mjere genskog polimorfizma prikazane su u tablici 6. Polimorfna mjesta uočena su u populaciji mladice u Kupi dok u ostalim populacijama nisu uočena. U Kupi je također utvrđeno najviše haplotipova i veća raznolikost haplotipova, dok je u Ljubljani i Savi utvrđen samo jedan haplotip. Nukleotidna raznolikost i prosječan broj razlika nukleotida utvrđen je samo kod populacije mladice u Kupi, s obzirom da u preostale dvije populacije uopće nema genskog polimorfizma. Sveukupno gledano, genska raznolikost mladice niska je.

Tablica 6. Mjere genskog polimorfizma mladice u Hrvatskoj i Sloveniji na temelju gena za citokrom *b*. N označava broj sekvenci, S označava broj polimorfnih mjesta, Eta označava broj mutacija, h označava broj haplotipova, Hd označava raznolikost haplotipova, Pi označava nukleotidnu raznolikost, k označava prosječan broj razlika nukleotida.

populacija	N	S	Eta	h	Hd	Pi	k
Ljubljana	8	0	0	1	0	0	0
Kupa	17	2	2	3	0,324	0,00030	0,338
Sava	6	0	0	1	0	0	0
ukupan uzorak	31	2	2	3	0,185	0,00017	0,189

5.4. Protok gena

Pomoću programa Migrate dobivene su *Theta* vrijednosti za populacije mladica u Ljubljani, Kupi i Savi te koeficijenti migracija (Tablica 7.).

Tablica 7. Vrijednosti *Theta* parametara i koeficijenta migracije populacija mladice dobivene Bayesovom metodom. Brojevi uz koeficijente migracija označavaju populacije: broj 1 označava populaciju Ljubljana, broj 2 označava populaciju Kupa, broj 3 označava populaciju Sava.

parametar	Vrijednost
Θ_1 (Ljubljana)	0,00042
Θ_2 (Kupa)	0,00207
Θ_3 (Sava)	0,01694
$M_{2 \rightarrow 1}$	504,0
$M_{3 \rightarrow 1}$	482,7
$M_{1 \rightarrow 2}$	601,4
$M_{3 \rightarrow 2}$	514,3
$M_{1 \rightarrow 3}$	635,9
$M_{2 \rightarrow 3}$	564,3

Na temelju podataka iz tablice 8. te uz pomoć formule: $N_{X \rightarrow Y} = M_{X \rightarrow Y} \times \Theta_Y$, dobivene su vrijednosti broja migranata po generaciji (Tablica 8.). To su prosječne vrijednosti koje označavaju broj jedinki koje migriraju iz jedne populacije u drugu po generaciji. Dobivene vrijednosti su iznimno malene pa se sve vrijednosti približno jednake nuli smatraju kao nepostojanje migracija. Utvrđen je maleni broj migranata iz populacije mladica u Ljubljani u populaciju mladica u Savi, a brojevi migracija u ostalim populacijama su zanemarivi.

Tablica 8. Broj migranata po generaciji. Broj 1 označava populaciju Ljubljana, broj 2 označava populaciju Kupa, broj 3 označava populaciju Sava.

broj migranata po generaciji	brojčana vrijednost
$N_{M_{2 \rightarrow 1}}$	0,21168 \approx 0
$N_{M_{3 \rightarrow 1}}$	0,20273 \approx 0

Tablica 8. Nastavak

$N_{M1 \rightarrow 2}$	1,24490 ≈ 0
$N_{M3 \rightarrow 2}$	1,06460 ≈ 0
$N_{M1 \rightarrow 3}$	10,77215 ≈ 10
$N_{M2 \rightarrow 3}$	9,55924 ≈ 0

Na temelju podataka iz tablice 7. i formule: $N_e = \Theta / \mu$, dobivene su prosječne vrijednosti efektivnih veličina za populacije mladica u Ljubljani, Kupi i Savi. Efektivna veličina veća je kod populacije mladica u Kupi u odnosu na populaciju mladica u Ljubljani.

Tablica 9. Vrijednosti efektivnih veličina populacija mladica

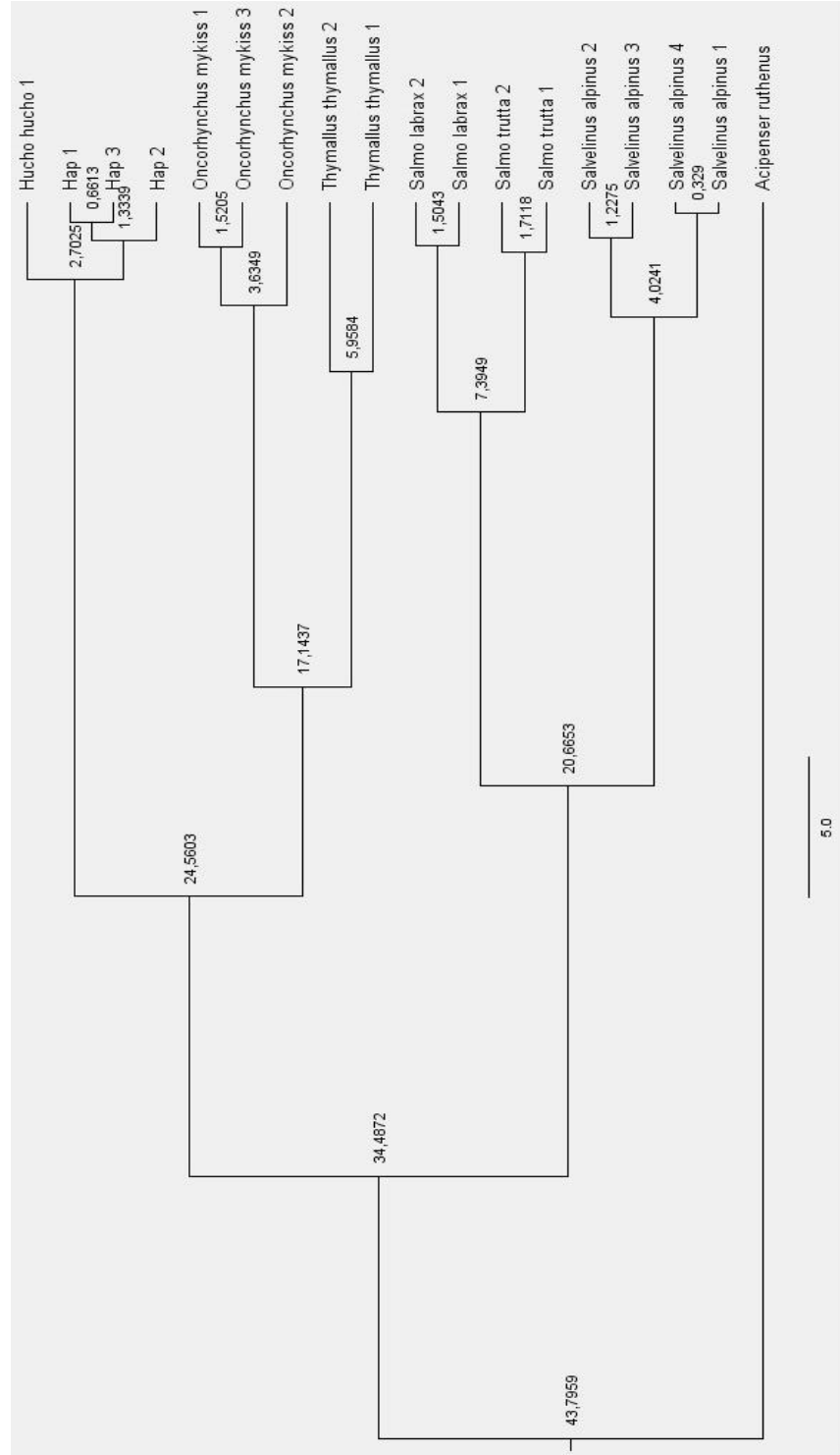
Efektivna veličina	Brojčana vrijednost
$N_e(\text{Ljubljana})$	350,00
$N_e(\text{Kupa})$	1725,00
$N_e(\text{Sava})$	*

*Za populaciju mladica u Savi nije dobivena realna procjena efektivne veličine

5.5. Evolucija mladice

Uz pomoć programskog paketa BEAST dobiveno je filogenetsko stablo s vremenskom skalom (Slika 11.). Ponovno je potvrđen nezavisni filogenetski položaj mladice unutra Salmonidae, a utvrđena je i veća povezanost s rodom *Oncorhynchus*. Vidljivo je razdvajanje rodova *Hucho*, *Oncorhynchus* i *Thymallus* od rodova *Salmo* i *Salvelinus* unutar Salmonidae u eocenu. Nakon toga vidljivo je potpuno odvajanje roda *Hucho* od rodova *Oncorhynchus* i *Thymallus* krajem oligocena. Jedinke mladice s područja Austrije (sekvenca iz Banke gena) i jedinke s područja Republike Hrvatske dijele zajedničkog pretka, a u pliocenu dolazi do odvajanja linija. Također jedinke na

području Republike Hrvatske s Hap1 i Hap3 dijele zajedničkog pretka s jedinkama s Hap2 te do razdvajanja linija dolazi u pleistocenu. Kasnije u pleistocenu također dolazi do razdvajanja između Hap1 i Hap3. Intraspecijska raznolikost mladice u Hrvatskoj i Sloveniji znatno je mlađa od nastanka samog roda.



Slika 11. Filogenetsko stablo s vremenskom skalom. Vremena divergencije prikazana su kao srednje vrijednosti u milijunima godina (brojevi uz linije).

6. RASPRAVA

Postoji malo istraživanja koja se fokusiraju na rod *Hucho*, njezina zaštita nije adekvatna, a uz to dolazi do smanjena populacija. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti gensku strukturu i raznolikost mladice u Hrvatskoj. Zbog malenog broja uzoraka sakupljenih na teritoriju Republike Hrvatske te s ciljem usporedbe, u istraživanje su uključeni i uzorci s područja Slovenije. U konačnici analizirani uzorci dolaze s područja rijeka Kupe, Ljubljanice i Save. U daljnje analize uključene su i vrste iz rodova: *Salmo*, *Oncorhynchus*, *Thymallus*, *Salvelinus*, *Acipenser*, *Squalius* iz Banke gena te vrste iz rodova: *Salmo* i *Oncorhynchus* sa Zoologijskog zavoda.

Analizama je utvrđeno postojanje tri odvojena haplotipa za gen citokrom *b* i za gen rodopsin. To je relativno malo haplotipova s obzirom da je mladica jako dobar plivač i predator. Postojanje malog broja haplotipova prvi je pokazatelj malene genske raznolikosti. Uz to, analize pokazuju da Hap1 za cyt *b* gen i Hap1 za rhod uvelike brojčano prevladavaju u odnosu na druge haplotipove. Takav fenomen možemo povezati s tzv. uskim grlom (gubitak ili fiksacija alela u populaciji nevezan uz selekciju) (Pavlica 2012) koje se dogodilo u evolucijskoj povijesti, ali vjerojatnije je da se u slučaju populacija mladice radi o intenzivnom poribljavanju. Moguće je da su i oba fenomena odgovorna za primijećenu nisku gensku raznolikost. Hap1 za gen za citokrom *b* prisutan je u populacijama mladica u Kupi, Savi i Ljubljanici, a Hap2 i Hap3 za cyt *b* gen prisutni su samo u populacijama mladice u Kupi. Hap1 za gen rodopsin prisutan je u populacijama mladica u Kupi, Savi i Ljubljanici, Hap2 za gen rodopsin prisutan je samo u populaciji mladice u Ljubljanici, a Hap3 za gen rodopsin prisutan je samo u Kupi. To je dokaz da manjak genske raznolikosti može biti problem i u divljim populacijama koje su naizgled brojne, ali imaju malu gensku raznolikost. Takve se populacije ne mogu suočiti s velikim promjenama u okolišu i opstati. S obzirom da su u Kupi prisutna sva tri haplotipa za cyt *b* gen i dva od tri haplotipa za rhod gen (u ostalim područjima koje obuhvaća ovo istraživanje nisu utvrđeni svi haplotipovi) može se pretpostaviti da je Kupa glacijalni refugij za mladice na području Hrvatske i Slovenije. Glacijalni refugij predstavlja žarište genske raznolikosti (Hewitt 2011).

Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće parsimonije za cyt *b* gen potvrđuju podjelu na Salmonidae i Thymallidae, kojoj se priklanjaju neki autori (Gill 1894). Jasno se vidi odvajanje roda *Thymallus* od ostalih rodova unutar Salmonidae. Prema tome rod *Hucho* je srodniji rodovima

Salmo, *Salvelinus* i *Oncorhynchus*. Mladica je posve odvojena, evolucijski nezavisna linija koja obuhvaća haplotipove dobivene istraživanjem te sekvencu mladice iz banke gena. Filogenetsko stablo dobiveno metodom najveće vjerojatnosti za *cyt b* gen ukazuje na ranije odvajanje roda *Oncorhynchus* od ostalih rodova unutar Salmonidae i od mladice. Prema tome mladica je srodnija rodovima *Salmo* i *Salvelinus*. Također potvrđuje odvajanje mladice u zasebni rod. Filogenetska stabla dobivena metodom najveće parsimonije i najveće vjerojatnosti za gen rodopsin potvrđuju nezavisni filogenetski položaj mladice unutar Salmonidae. Za utvrđivanje točnijih odnosa unutar same porodice potrebno je napraviti istraživanje koje bi uključivalo više uzoraka. Filogenetska mreža ukazuje na iste rezultate kao i filogenetska stabla. Jasno prikazuje kako Hap1 koji prethodi Hap2 i Hap3 potječe od ancestralnog haplotipa.

Analizom genske raznolikosti za cjelokupan uzorak utvrđena je izrazito niska genska raznolikost koja se dala naslutiti i po broju haplotipova. Ukupno u svim populacijama ima jako malo polimorfni mjesta. Intraspecijska raznolikost ostalih predstavnika porodice Salmonidae veća je, što se odražava u većem broju polimorfni mjesta: *Salmo labrax* na području Žumberka ima 13 polimorfni mjesta isto kao i na području Plitvičkih jezera, *Salmo trutta* na području Žumberka i Plitvičkih jezera ima 9 polimorfni mjesta, a *Barbus balcanicus* na području Hrvatske ima 16 polimorfni mjesta (Ivić i sur. 2021, Raguž i sur. 2021, Buj i sur. 2020). Broj mutacija koji proizlazi iz broja polimorfni mjesta također je puno niži od broja mutacija kod gore navedenih vrsta. Broj haplotipova vrsta *Salmo labrax* i *Salmo trutta* veći je od 10 (Ivić i sur. 2021) što je znatno više od broja haplotipova utvrđenih ovim istraživanjem na mladici. Osim što je u ovom istraživanju utvrđen mali broj haplotipova i njihova je raznolikost mala. Raznolikost haplotipova ostalih vrsta unutar Salmonidae kreće se od 0,5 do 0,9 (Ivić i sur. 2021, Raguž i sur. 2021, Buj i sur. 2020) dok je dok je raznolikost haplotipova samo jedne populacije mladice malo veća od 0,3 (ostale populacije uopće nemaju gensku raznolikost jer sve jedinke imaju isti *cyt b* haplotip), a ukupna raznolikost je tek 0,185. Nukleotidna raznolikost skoro je zanemariva. U populacijama mladice u Savi i Ljubljanici nema genske raznolikosti, a mala genska raznolikost utvrđena je u populacijama mladice u Kupi. U Kupi se bilježi najveći broj haplotipova i njihova najveća raznolikost. Kupa je važan vodotok za mladice jer se tamo mladica prirodno mrijesti pa je vjerojatno da je u tom dijelu i najveća genska raznolikost. Uzroci malene genske raznolikosti su izgradnja brana koja sprječava migracije populacija, a vjerojatno i intenzivno poribljavanje. Naime, u uzgajalištima je uglavnom prisutna mala ili nikakva genska raznolikost jer sve jedinke potječu iz malog broja roditeljskih

parova. Unošenje takvih jedinki u prirodu dovodi do smanjenja genske raznolikosti divljih populacija. Zbog ovako malene genske raznolikosti upitno je koliko bi micanje pregrada pogodovalo populacijama mladice koje nisu spremne na promjene u okolišu.

Broj migranata po generaciji puno je manji od očekivanog s obzirom da se radi o vrsti koja dobro pliva. Migracije su gotovo nepostojeće osim manjih migracija iz populacije mladica u Ljubljani u populaciju mladica u Savi. Na migracije također utječu pregrade u vodotocima koje onemogućuju migriranje populacija. Na genskoj razini stopa migracije utvrđuje se samo ako unosi varijabilnost u populaciju, a s obzirom na nisku gensku raznolikost nema prijenosa varijabilnosti. Zbog malene genske raznolikosti nije moguće detektirati točan broj migranata pa je u ovom slučaju moguće da je stvarni broj migranata veći od utvrđenog te su potrebne adekvatnije metode (npr. obilježavanje jedinki).

Efektivna veličina populacija mladica u Ljubljani i Kupi je zadovoljavajuća i u potpunoj je suprotnosti genskoj raznolikosti. Može se usporediti s efektivnim veličinama ostalih vrsta unutra Salmonidae (Ivić i sur. 2021, Raguž i sur. 2021, Buj i sur. 2020). Za efektivnu veličinu populacije u Savi nije dobivena realna procjena.

Procjenom vremena divergencijskih događaja u evolucijskoj povijesti mladice utvrđeno je davno vrijeme divergencije mladice (još u oligocenu) od ostalih rodova unutar Salmonidae. Divergencija populacija mladice na području dunavskog slijeva poklapa se s razdobljem brojnih glacijacija u pleistocenu.

Ovo istraživanje pokazalo je važnost zaštite mladice na području dunavskog slijeva. Zbog malene genske raznolikosti ova vrsta je iznimno ugrožena i nije sposobna prilagoditi se novim promjenama u okolišu. Potrebno je uvesti dodatne mjere koje bi doprinijele očuvanju ove vrste, a uz to i povećale njezinu gensku raznolikost. Neke od tih mjera su: uklanjanje vodenih pregrada i sprječavanje gradnje novih, regulacija ribolova, obnova izvornih staništa i obnova područja u kojem se mladice mrijeste. Zbog malog broja uzoraka koji su bili uključeni u istraživanje i malene genske raznolikosti potrebno je provesti dodatna istraživanja.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Filogenetskim analizama utvrđena su tri haplotipa mladice u dunavskom slijevu Hrvatske i Slovenije.
- Haplotipovi pronađeni u populaciji mladice u Kupi (Republika Hrvatska), također su pronađeni u populacijama mladice u Ljubljani i Savi (Slovenija).
- Utvrđeno je postojanje zasebne evolucijske linije roda *Hucho* unutar Salmonidae.
- Rijeka Kupa najvjerojatnije je bila glacijalni refugij za mladice u Republici Hrvatskoj.
- Populacije mladice imaju izrazito nisku gensku raznolikost i slab protok gena što je najvjerojatnije posljedica intenzivnog poribljavanja te izgradnje brana uslijed čega dolazi do fragmentacije staništa.
- Efektivna veličina populacija mladica u Ljubljani i Kupi vjerojatno odgovara kapacitetu staništa, a za populaciju mladica u Savi nije dobivena realna vrijednost.
- Divergencija unutar vrste *Hucho hucho* započinje u pliocenu, a divergencija populacija s područja dunavskog slijeva započinje u pleistocenu.
- Zbog niske genske raznolikosti koja dovodi do nerealnih vrijednosti o broju migranata i efektivnoj veličini potrebna su daljnja istraživanja temeljena na drukčijoj metodologiji.

8. LITERATURA

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

Avise, J.C. (1998): The history and purview 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, Conservation Biology* (17), Cambridge University Press, Cambridge.

Blatnik, M., Mayaud, C., Gabrovšek, F. (2019): Groundwater Dynamics Between Planinsko polje and springs of the Ljubljana river, Slovenia: *Acta Carsologica*. *Acta Carsologica* 48(2): 199-226.

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

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

Buj, I., Vukić, J., Šanda, R., Perea, S., Čaleta, M., Marčić, Z., Bogut, I., Povž, M., Mrakovčić, M. (2010): Morphological comparison of bleaks (*Alburnus*, Cyprinidae) from the Adriatic Basin with the description of a new species. *Folia zoologica* 59: 129 – 141.

Chen, J. N., Samadi, S., Chen, W. J. (2018): Rhodopsin gene evolution in early teleost fishes. *PloS one*, 13(11): e0206918.

Crête-Lafrenière, A., Weir, L.K., Bernatchez, L. (2012): Framing the Salmonidae Family Phylogenetic Portrait: A More Complete Picture from Increased Taxon Sampling. *PLoS ONE*, 7 (10): e46662.

Ćaleta, M., Buj, I., Mrakovčić, M., Mustafić, P., Zanella, D., Duplić, A., Mihinjač, T., Katavić, A. (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.

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

Efron, B., Gong, G. (1983): A Leisurely Look at the Bootstrap, the Jackknife, and Cross-Validation. *The American Statistician* 37(1): 36-48.

Ellstrand, N. C., Rieseberg, L. H. (2016): When gene flow really matters: gene flow in applied evolutionary biology. *Evolutionary applications* 9 (7): 833–836.

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

Farias, I. P., 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(2): 89-103.

Freyhof, J., Kottelat, M. (2008): *Hucho hucho*. The IUCN Red List of Threatened Species.

Germ, M., Janež, V., Gaberščik, A. (2021): Diversity of macrophytes and environmental assessment of the Ljubljanica river (slovenia). *Diversity* 13(6): 278.

Gill, T. (1894): The differential characters of the Salmonidae and Thymallidae. *Proceedings of the United States National Museum* 17 (992): 117–122.

Gupta, S.K., Kumar, A., Hussain, S.A. (2014): Novel primers for sequencing of the complete mitochondrial cytochrome *b* gene of ungulates using non-invasive and degraded biological samples. *Conservation Genetics Resources* 6 (3): 499-501.

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.

Hedrick, P. (2009): I.15 Population Genetics and Ecology: . In S. Levin, S. Carpenter, H. Godfray, A. Kinzig, M. Loreau, J. Losos, B. Walker, D. Wilcove (Ed.), The Princeton Guide to Ecology (pp. 109-116). Princeton: Princeton University Press.

Hewitt, G. M. (2011): Biodiversity Hotspots 123–147.

Ismail, S.; Essawi, M. (2012): Genetic polymorphism studies in humans. Middle East Journal of Medical Genetics 1 (2): 57-63.

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 Gorje Nature Park in Croatia. Fundam Appl Limnol 194: 215–225.

Johns, G.C., Avise, J.C. (1998): A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. Molecular Biology and Evolution 15 (11): 1481–1490.

Kucinski, M., Fopp-Bayat, D., Liszewski, T., Svinger, VW., Lebeda, I., Kolman, R. (2015): Genetic analysis of four European huchen (*Hucho hucho* Linnaeus, 1758) broodstocks from Poland, Germany, Slovakia, and Ukraine: implication for conservation. J Appl Genetics 56 (4): 469-480.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549

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

Lipscomb, D. (1998): Basics of Cladistic Analysis. George Washington University, Washington D.C.

Mikavica, D. (1987): Dužinski i maseni rast mladice (*Hucho hucho*) iz rijeke Drine. Ribar. Jugosl. 42: 81-86.

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

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.

- Muhamedagić, S., Habibović, E. (2013): The State and Perspective of Danube huchen (*Hucho hucho*) in Bosnia and Herzegovina. *Fisheries & Aquatic Life* 21 (3): 155-160.
- Nakhleh, L., Guohua, J., Fengmei, Z., Mellor-Crummey, J. (2005): Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony. *IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference (CSB'05)*.
- Nelson, J.S. (2006): *Fishes of the World*. 4th edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- Pavlica, M. (2012): *Mrežni udžbenik iz genetike*. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Udžbenici zagrebačkog sveučilišta, elektronička izdanja, I izdanje, Zagreb.
- Pećina-Šlaus, N. (2009): *Odabrane metode molekularne biologije : laboratorijski priručnik*. Zagreb: Medicinska naklada.
- Philp, A. R., Bellingham, J., Garcia-Fernandez, J., Foster, R. G. (2000): A novel rod-like opsin isolated from the extra-retinal photoreceptors of teleost fish. *FEBS letters* 468(2-3): 181–188.
- Povz, M., Leon, T., Brilly, M. (2016): Prispevek k poznavanju ihtiofavne pritokov ljubljaničice: Podlpscica, gradascica in Horjulscica/Contribution to the knowledge of ichthyofauna of the ljubljaničica river tributaries: The podlpscica, the gradascica and the horjulscica: *Revija za terensko biologijo = journal of field biology*. *Natura Sloveniae* 18 (1): 17-22.
- Primožič, M., Kobold, M., Brilly, M. (2008): The implementation of the HBV model on the sava river basin. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science* 4(1)
- QGIS Development Team, 2009. *QGIS Geographic Information System*. Open Source Geospatial Foundation.
- Raguž, L., Buj, I., Marčić, Z., Veble, V., Ivić, L., Zanella, D., Horvatić, S., Mustafić, P., Čaleta, M., Sabolić, M. (2021): First look into the evolutionary history, phylogeographic and population genetic structure of the Danube barbel in Croatia. *Knowledge and management of aquatic ecosystems* 422(13): 13.
- Relethford, J. (2012): *Human Population Genetics*.
- Reynolds, J. B. (1996): Electrofishing. *Fisheries techniques* 2: 221–253.
- Skalin, B. (1990): Mladica kao ugrožena riblja vrsta. *Ribar. Jugosl.* 45: 22-30.

Sooley, D. R., Luiker, E.A., Barnes M.A. (1998): Standard Methods Guide for Freshwater Fish and Fish Habitat Surveys in Newfoundland and Labrador: Rivers & Streams. Fisheries and Oceans, St. John's, NF.

Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J., Rambaut, A. (2018): Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 Virus Evolution 4, vey016.

Swofford, D.L. (2003): PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.

Tomljanović, T. (2015): Distribucija i utjecaj hidroelektrana na populacije mladice (*Hucho hucho*). Ribarstvo 73 (2): 92-93.

Treer, T., Šprem, N., Piria, M. (2014): Condition of huchen (*Hucho hucho* Linnaeus, 1758) from the Croatian-Slovenian river Kupa. Journal of Applied Ichthyology 30 (1): 168-171.

Wei, J. (2016): Molecular phylogeny of the tilefish genus Branchiostegus (branchiostegidae) and the closely related genus lopholatilus utilizing the mitochondrial genes cytochrome *b* and 16S rRNA. Order No. 10182588, Adelphi University.

Weiss, S., Schenekar, T. (2016): Genetic evaluation of the self-sustaining status of a population of the endangered Danube salmon, *Hucho hucho*. Hydrobiologia 775: 153–165.

Witkowski, A., Bajić, A., Treer, T., Hegediš, A., Marić, S., Šprem, N., Piria, M., Kapusta, A. (2013): Past and present of and perspectives for the Danube huchen, *Hucho hucho* (L.), in the Danube basin. Fisheries and Aquatic Life 21 (3): 129-142.

Internet izvori:

<https://www.iucnredlist.org/species/10264/3186143> (pristupljeno 16.07.2021.)

https://balkanrivers.net/sites/default/files/Huchen_Distribution260215_klein.jpg(pristupljeno 14.08.2021.)

<https://riverwatch.eu/en/balkanrivers/background> (pristupljeno 30.06.2021.)

<https://crorivers.com/kupa/> (pristupljeno 30.06.2021.)

<http://ribolovni-savez.hr/ribolovne-vode/kupa/> (pristupljeno 20.07.2021.)

<http://zelenivir.com.hr/> (pristupljeno 20.07.2021.)

<https://www.dinarskogorje.com/sliv-rijeke-ljubljanice.html> (pristupljeno 20.07.2021.)

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 19.04.1998. godine u Čakovcu. Osnovnu školu završila sam 2012. godine u Svetom Martinu na Muri te sam iste godine upisala opći smjer u Gimnaziji Josipa Slavenskog Čakovec. Srednjoškolsko obrazovanje završila sam 2016. godine te sam se iste godine upisala na integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sudjelovala sam u manifestacijama: „Otvoreni dan Kemije“ 2017. i 2018. godine, „Noć biologije“ 2018. godine te „Dan i noć na PMF-u“ 2019. godine. Tijekom 2020.i 2021. godine odradila sam metodičku praksu iz biologije u V. gimnaziji Zagreb te metodičku praksu iz kemije u OŠ grofa Janka Draškovića u Vrapču.