Genetska varijabilnost i struktura populacija komarče Sparus Aurata (Linnaeus, 1758) u istočnom Jadranu

Žužul Vrgoč, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:226:446676

Rights / Prava: Attribution 4.0 International/Imenovanje 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department of Marine Studies

SVEUČILIŠTE U SPLITU, SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU

Poslijediplomski sveučilišni studij Primijenjene znanosti o moru

Iva Žužul Vrgoč

GENETSKA VARIJABILNOST I STRUKTURA POPULACIJA KOMARČE *SPARUS AURATA* (LINNAEUS, 1758) U ISTOČNOM JADRANU

Doktorska disertacija

Split, svibanj 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU, SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU

Poslijediplomski sveučilišni studij Primijenjene znanosti o moru

Iva Žužul Vrgoč

GENETSKA VARIJABILNOST I STRUKTURA POPULACIJA KOMARČE *SPARUS AURATA* (LINNAEUS, 1758) U ISTOČNOM JADRANU

Doktorska disertacija

Split, svibanj 2020.

Ova doktorska disertacija izrađena je na Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, pod vodstvom prof. dr. sc. Ivana Katavića, u sklopu poslijediplomskog doktorskog studija Primijenjene znanosti o moru *pri Sveučilištu u Splitu i Sveučilištu u Dubrovniku.*

Rad doktorandice u potpunosti je financiran od Hrvatske zaklade za znanost, a istraživanje je u cijelosti provedeno u sklopu projekta Utjecaj akvakulture na prirodne morske populacije - AquaPop *(HRZZ-IP-2014-09-9050), Hrvatske zaklade za znanost, pod stručnim vodstvom dr. sc. Tanje Šegvić Bubić.*

Zahvale

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Ivanu Kataviću koji je svojim znanjem, iskustvom, savjetima te podrškom doprinio izradi ovog doktorskog rada.

Posebnu zahvalu dugujem dr. sc. Tanji Šegvić Bubić, znanstvenom uzoru, na nesebičnoj pomoći tijekom izrade doktorske disertacije, koja je sve svoje znanje prenijela i bez koje ova doktorska disertacija ne bi bila potpuna. Zahvaljujem joj na strpljenju i razumijevanju.

Hvala članovima povjerenstva na vremenu koje su uložili u evaluaciju ove doktorske disertacije.

Dugujem iskrenu i neizmjernu zahvalu kolegi Igoru Talijančiću na brojnim savjetima i riječima potpore.

Dragoj kolegici Ivani Mandić zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u laboratoriju. Tvoje društvo je neprocjenjivo.

Zahvaljujem svim kolegama iz Laboratorija za akvakulturu, na prijateljskoj potpori i smijehu. Posebno hvala Jasni, Ivani L., Ivani B.G., Luki i Leonu.

Mojoj dragoj obitelji i prijateljima zahvaljujem na ljubavi i podršci. Osobito roditeljima Divni i Anti, bratu Josipu i sestri Marini na pruženom strpljenju i ljubavi.

Naposljetku, hvala mom suprugu Marku, partneru, prijatelju i najvećem osloncu. Hvala na strpljenju, podršci i ljubavi.

“Sve što jesam ili što se nadam da ću biti, dugujem svome anđelu – majci.”

Abraham Lincoln

Sadržaj

1. UVOD 1
   1.1. Karakteristike komarče (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) i gospodarsko značenje 7
   1.2. Utjecaj kaveznog uzgoja morskih riba na okoliš 11
   1.3. Razlikovna obilježja populacija različitog podrijetla 18
   1.4. Molekularni biljezi 21
      1.4.1. Mikrosatelitni biljezi 22
   1.5. Genetička raznolikost 27
   1.6. Pregled dosadašnjih istraživanja genetičke raznolikosti komarče 29
   1.7. Ciljevi i hipoteze istraživanja 31
2. MATERIJALI I METODE 35
   2.1. Područje istraživanja 35
   2.2. Izolacija DNA i priprema uzoraka 38
   2.3. Genotipizacija mikrosatelitnih biljega 39
   2.3.1. Izbor mikrosatelitnih biljega 39
   2.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) 44
   2.4. Statistička obrada podataka 46
   2.4.1. Genetička raznolikost 46
   2.4.1. Analiza genetičke varijabilnosti i populacijske strukture 47
   2.4.2. Identifikacija hibrida 48
   2.4.3. Povezanost područja mrijesta i rastilišta 49
   2.4.4. Uparivanje molekularnih i morfoloških podataka 50
3. REZULTATI 51
   3.1. Genetička raznolikost komarče u istočnom Jadranu 51
   3.2. Genetička udaljenost i populacijska struktura 61
   3.3. Identifikacija hibrida 70
   3.4. Povezanost područja mrijesta i rastilišta 73
   3.5. Uparivanje molekularnih i morfoloških podataka 75
4. RASPRAVA 79
5. ZAKLJUČAK 91
6. LITERATURA 94
7. PRILOZI 113
8. ŽIVOTOPIS 119

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu, Sveučilišni Odjel za studije mora
Sveučilište u Dubrovniku **Doktorski rad**
Poslijediplomski sveučilišni studij: Primijenjene znanosti o moru

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

GENETSKA VARIJABILNOST I STRUKTURA POPULACIJA KOMARČE *SPARUS AURATA* (Linnaeus, 1758) U ISTOČNOM JADRANU

Iva Žužul Vrgoč

Rad je izrađen u: Institut za oceanografiju i ribarstvo

Sažetak

Posljednjih godina zamijećeno je značajno povećanje ulova divlje komarče u istočnom dijelu Jadranskog mora. Smatra se kako ubrzani porast kaveznog uzgoja doprinosi povećanju populacija komarči kao posljedica bježanja iz kaveznih uzgojnih instalacija. S obzirom na izvjesnost križanja uzgojnih i prirodnih populacija, ukazala se potreba procjene razine introgresije uzgojnog genotipa u prirodnim populacijama komarče, za što je u ovoj studiji korišten standardizirani set od dvadeset i jednog neutralnog mikrosatelitnog lokusa i tri mikrosatelitna lokusa povezana s genima kandidatima (hormonom rasta, *GH*, prolaktinom, *PRL*, i proteinom modifikacije aktivnosti receptora 3, *RAMP3*). Analizirani uzorci divljih komarči su ukazali na promjene genetske strukture unutar istraživanog akvatorija u godinama uzorkovanja te smanjenu genetsku povezanost s juvenilnim jedinkama i divljim jedinkama uzorkovanim u blizini uzgajališta tuna, što upućuje na njihov privremeni boravak na lokacijama uzorkovanja duž istočnog Jadrana. Nasuprot tome, genetska analiza uzorkovanih adultnih jedinki oko uzgajališta tuna pokazuje značajnu povezanost s mlađi obližnjeg priobalja, sugerirajući da uzgajališta mogu djelovati kao potencijalna mrijestilišta, na što upućuju i rezultati razvijenog modelskog sustava Roms-Ichthyop. U predmetnoj studiji je razvijena i genetska baza divljih i uzgojnih genotipova komarče istočnog Jadrana, što predstavlja značajan resurs i alat za uspješnu identifikaciju podrijetla jedinki kao neophodan korak u izradi kvalitetne strategije upravljanja ribljim prebjezima iz kaveznih sustava.

(123 stranice, 30 slika, 16 tablica, 260 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u: Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilišna knjižnica u Splitu, knjižnica Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu.

Ključne riječi: komarča, mikrosateliti, genetska struktura, kavezni prebjezi

Mentor: prof. dr. sc. Ivan Katavić, redoviti profesor u trajnom zvanju

Ocjenjivači: 1. doc. dr. sc. Leon Grubišić, znanstveni savjetnik
2. dr. sc. Tanja Šegvić Bubić, viši znanstveni suradnik
3. doc. dr. sc. Željka Trumbić

Rad prihvaćen: 11. ožujka 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split, University Department of Marine Studies
University of Dubrovnik **Ph.D. thesis**
Institute of Oceanography and Fisheries, Split

PhD. in Biotehnical science

GENETIC VARIABILITY AND POPULATION STRUCTURE OF THE GILTHEAD SEABREAM *SPARUS AURATA* (Linnaeus, 1758) IN THE EASTERAN ADRIATIC SEA

Iva Žužul Vrgoč

Thesis performed at Institute of oceanography and fisheries

Abstract

Over the last few years, a significant increase of wild gilthead seabream in fisheries landings have been documented in coastal areas of the eastern Adriatic Sea. It has been suggested that rapid expansion of sea-cage farming contributes to increase of seabream populations through aquaculture escapes. The aim of this research was to assess the population genetic structure of wild and farmed populations along the eastern Adriatic coast and to investigate the impact of genetic introgression of escaped farmed seabream to wild seabream populations. To this end, a set of 21 neutral microsatellites and 3 microsatellites linked to candidate genes was used (growth hormone, *GH*, prolactin, *PRL*, receptor activity modifying protein 3, *RAMP3*). Wild adults demonstrated changes in genetic structure within basin in the respective sampling years and reduced connectivity with wild offspring, suggesting their temporal residency within the sampling areas of the eastern Adriatic. On the contrary, we observed a strong connection of wild seabream associated with tuna farming sites and offspring from the nearby nursery grounds indicating that the surroundings of tuna sea-cage farms could function as potential spawning grounds, which was also suggested by the Roms-Ichthyop model. A genetic database of wild and farmed gilthead seabream's genotypes was developed during the course of this study. This represents an important resource and a prerequisit for successfull identification of the animal origin as a necessary step in establishing a genetic-based escapes management startegy to control further erosion of genetic integrity.

(123 pages, 30 figures, 16 tables, 260 references, original in Croatian)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Split University Library and Library of Institute of oceanography and fisheries in Split.

Keywords: Seabream, microsatellite, genetic structure, farmed escapes

Supervisor: Ivan Katavić, Ph.D. / Full Professor

Reviewers: 1. Leon Grubišić, Ph.D.
2. Tanja Šegvić Bubić, Ph.D.
3. Željka Trumbić, Ph.D.

Thesis accepted: March, the 11th, 2020.

1. UVOD

Akvakultura je trenutno najbrže rastući sektor proizvodnje hrane u svijetu, a morska prostranstva se smatraju jednim od najvjerojatnijih područja za proširenje industrijskog uzgoja velikih razmjera (Lovatelli i sur. 2013). Potaknuta rastom stanovništva i povećanjem potrošnje po glavi stanovnika, globalna potražnja za hranom iz mora i dalje je u porastu. U razvijenim zemljama gotovo 20 % unosa proteina je ribljeg podrijetla, dok u manje razvijenim zemljama udio doseže 50 % (FAO, 2018). Zabrinjavajući trend pada ulova već desetljećima je praćen značajnim povećanjem akvakulturne proizvodnje (Katavić, 2017). Svjetska akvakulturna proizvodnja u 2016. godini iznosila je 110,2 milijuna tona, od čega je 80,2 milijuna tona uključivalo proizvodnju ribe i 30,1 milijuna tona vodenog bilja. Morsku akvakulturnu odnosno marikulturnu proizvodnju u 2016. godini činilo je 54,1 milijuna tona ribe, 17,1 milijuna tona mekušaca, 7,9 milijuna tona rakova te ostalih proizvoda. Iako svjetska akvakulturna proizvodnja ne bilježi visoku stopu godišnjeg rasta kao 1980-ih i 1990-ih (10,8 % i 9.5 %), akvakultura je i dalje najbrže rastući sektor proizvodnje hrane u svijetu, s godišnjom prosječnom stopom rasta od 5,8 % u periodu od 2001. do 2016. godine. U 2016. godini 37 zemalja je imalo veći prinos iz uzgoja nego iz ulova (FAO, 2018).

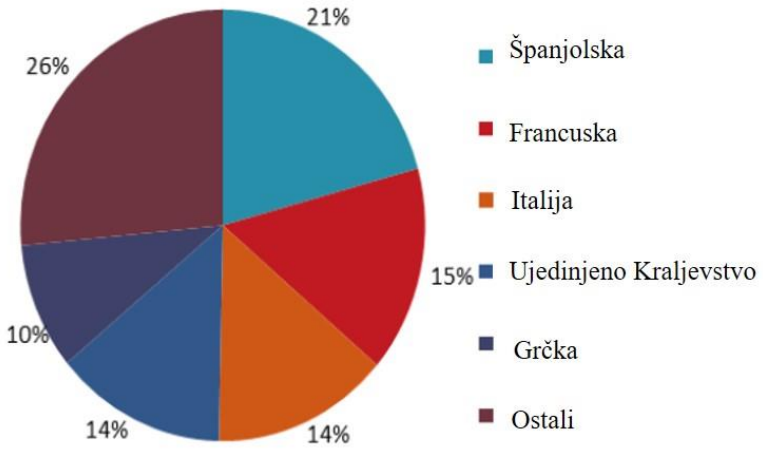
Udio proizvoda svjetske akvakulture u ukupnoj potrošnji ribe za hranu bio je 51 % u 2015. godini i prema preliminarnim procjenama 53 % u 2016. godini (FAO, 2018). Primjena novih biotehnoloških rješenja, razvoj proizvodnje na postojećim i otvaranje novih područja za akvakulturu (na kopnu i otvorenom moru) neupitno će omogućiti daljnji razvoj ove industrije (Kobayashi, 2015). Prema projekcijama Svjetske organizacije za hranu proizvodnja iz akvakulture rast će na 93,6 milijuna tona do 2030. godine, te bi tako akvakultura omogućila 62 % ukupne konzumirane ribe po glavi stanovnika (FAO, 2014).

Osim što je akvakultura prepoznata kao važan sektor u ljudskoj prehrani, ona ujedno doprinosi globalnoj ekonomiji, a posebno povećanju mogućnosti zapošljavanja i gospodarskom rastu lokalnih, napose obalnih i otočkih zajednica. Unatoč velikoj raznolikosti uzgajanih vrsta (>598), u akvakulturnoj proizvodnji na nacionalnoj, odnosno regionalnoj razini dominiraju određene vrste ili skupine, od čega u uzgoju ribe dominira 27 vrsta, čineći 90 % ukupne proizvodnje. Azija dominira u proizvodnji s 89 % ukupnog svjetskog uzgoja, od čega je najveći proizvođač Kina s 32,7 milijuna tona u 2018. godini (FAO, 2018). U Europi i Sjevernoj Americi nagli razvoj akvakulture dominirao je u razdoblju 1980-ih do 1990-ih

godina, ali od onda stagnira, najviše kao posljedica strogih regulacijskih mjera i proizvodnih standarda, iako tržište i dalje raste (Bostock i sur. 2010).

Europska unija predstavlja veliko tržište za plasman morskih proizvoda te je tržište u stalnom porastu posljednjih desetljeća. Procijenjena potrošnja ribe iznosi 25,5 kg po stanovniku, od čega se uvozi više od polovine tekućih potreba. Ukupna akvakulturna proizvodnja u Europskoj uniji iznosila je 1,3 milijuna tona (FAO, 2018). Unatoč velikom broju vrsta u uzgoju (preko 130), razmjerno mali broj vrsta predstavlja glavninu proizvodnje. Dagnje čine više od trećine ukupne proizvodnje u akvakulturi, dok pastrve i losos čine daljnjih 15 %. Neke druge morske vrste (plosnatice, lubin, komarča, plavoperajna tuna) te slatkovodne vrste (ciprinidi) također su tržišno interesantne, ali njihova proizvodnja predstavlja znatno manji udio u ukupnoj proizvodnji. Dok se uzgoj u moru primarno odvija u plutajućim kavezima, dotle se slatkovodne vrste uzgajaju u ribnjacima, odnosno protočnim kanalima (pastrva). Francuska je glavni proizvođač kamenica, Španjolska glavni proizvođač mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*), dok je Italija glavni proizvođač kućica (vongola; *Venus verrucosa*). S druge strane, Ujedinjeno Kraljevstvo je vodeće u proizvodnji lososa (*Salmo salar*) u moru, a Grčka u uzgoju lubina (*Dicentrarchus labrax*) i komarče (*Sparus aurata)*. Šaran (*Cyprinus carpio*) se najviše proizvodi u istočnoj Europi, gdje je glavni proizvođač Poljska (Katavić, 2017). U morskoj akvakulturi – marikulturi EU, losos čini 45 % ukupnog volumena proizvodnje, komarča 21 % te lubin 20 %. Gledajući vrijednost proizvoda losos je na prvom mjestu, a lubin ima veću prodajnu vrijednost nego komarča (22 % naprema 19 %) (STECF, 2018).

Tri najveća proizvođača proizvoda akvakulture, Velika Britanija, Francuska i Španjolska čine više od polovice ukupne europske proizvodnje. S Italijom i Grčkom ovih pet zemalja čine ¾ ukupne proizvodnje u akvakulturi EU (Slika 1.1.), ili su činile do 31. siječnja 2020. kada je Velika Britanija povukla članstvo u EU te se očekuje revidiranje statističkih podataka u narednim godinama. Također, vodeće zemlje u uzgoju ribe u Europi (Norveška, Turska, Farski Otoci i Island) nisu članice EU, i zajedno čine 77 % ukupnog europskog uzgoja (1,65 milijuna tona).



Slika 1. 1. Marikulturna proizvodnja u državama članicama EU u 2016. godini (Izvor: FAO, 2018).

Iz perspektive zapošljavanja, društveni značaj akvakulturne industrije ne odražava se uvijek u količinskom ili vrijednosnom doprinosu ukupnim vrijednostima Europske unije. Proizvodnja školjkaša zapošljava više radne snage u usporedbi s morskom i slatkovodnom proizvodnjom. Sektor školjkaša najčešće se sastoji od malih poduzeća u obiteljskom vlasništvu i ima velik društveni značaj za neke regije u EU.

Prateći globalne trendove, marikultura u Sredozemlju silno je napredovala 90-ih godina prošlog stoljeća, nametnuvši se kao značajan izvor hrane, zapošljavanja i zarade. U toj proizvodnji dominira Grčka s udjelom od 38 % u proizvodnji, a slijedi Turska s udjelom od 35 % te Španjolska s udjelom od 15 %, a ostale zemlje čine oko 12 % proizvodnje. Glavne uzgojne vrste su komarča (*S. aurata*) s udjelom od 49 % te lubin (*D. labrax*) s udjelom od 47 % u proizvodnji. Ostale vrste čine svega 4 % proizvodnje. U proizvodnji mlađi lubina i komarče najveći udio zauzimaju Turska, Grčka, Francuska i Italija. U uzgoju školjkaša dominiraju dvije vrste dagnji, *M. galloprovincialis* i *Mytilus edulis*, a u uzgoju kamenica *Crassostrea gigas* i *Ostrea edulis*, s tim da je gotovo cjelokupna proizvodnja školjkaša zastupljena u Španjolskoj (41 %), Francuskoj (30 %), Italiji (24 %) i Grčkoj (4 %) (STECF 2018).

Počeci akvakulturne proizvodnje na području Republike Hrvatske datiraju iz doba Rimskog carstva i bazirali su se na uzgoju školjkaša (kamenice, *O. edulis* i dagnje, *M.*

galloprovincialis), dok je tradicija uzgoja ribe u Hrvatskoj započela prije više od 110 godina uzgojem šarana, *Cyprinus carpio* (Treer i sur. 1995). Uzgoj bijele morske ribe afirmirao se prije tridesetak godina, prvenstveno komarče, *S. aurata* i lubina, *D. labrax* (Katavić & Vodopija 2000). Tov plavoperajne tune (*Thunnus thynnus*) u Republici Hrvatskoj započinje 1996. godine, a uzgoj mlađi s ciljem povećanja biomase započinje 2001. godine (Katavić i sur. 2003).

Hrvatska spada u krug mediteranskih zemalja koje su relativno rano prepoznale značenje ove gospodarske grane. Premda je proizvodnja morskih organizama u Hrvatskoj prisutna dugi niz godina, puni eksploatacijski potencijal još nije ostvaren i mogao bi biti značajno veći uz raspoložive prostorne mogućnosti i povoljne ekološke uvjete. Mnoge od mediteranskih zemalja koje su imale sličnu osnovu za razvoj marikulture kao Hrvatska danas zauzimaju značajno mjesto u proizvodnji kontrolirano uzgojenih morskih organizama (Katavić & Vodopija 2000).

Na području Republike Hrvatske registrirano je 148 farmi, od kojih je 117 za školjkaše, 30 za ribe i 4 za tune (MPS, 2015). Uzgoj se provodi duž cijelog obalnog i otočnog pojasa, a najviše u Zadarskoj županiji. Uzgaja se bijela riba, prvenstveno lubin (*D. labrax*) i komarča, (*S. aurata)* u plutajućim kavezima, te tuna (*T. thynnus*) i školjkaši, dagnja (*M. galoprovincialis*) i europska plosnata kamenica (*O. edulis*), koristeći tradicionalnu tehnologiju uzgoja na plutajućim linijskim sustavima (pergolari). Uzgoj tune (*T. thynnus*) u Hrvatskoj se temelji primarno na ulovu juvenilne ribe, individualne mase preko 8 kg, koja se potom uzgaja 18 do 36 mjeseci u plutajućim kavezima što rezultira značajnim gospodarskim (izvoz) i društvenim (zapošljavanje) učincima (Katavić i sur. 2016). Sva su uzgajališta smještena u otočnom akvatoriju istočne obale Jadrana i kao takva imaju značajan pozitivni učinak za opstojnost i razvoj lokalnih zajednica.

Ukupna proizvodnja u marikulturi u 2018. godini je iznosila 16 782 tone, od čega je 6 220 tona lubina (*D. labrax*), 5 591 tona komarče (*S. aurata*), 3 227 tona tune (*T. thynnus*) i 800 tona hame (*Argyrosomus regius*), dok proizvodanja romba (*Psetta maxima*) i zubaca (*Dentex dentex*) nije evidentirana. Međutim, uzgoj školjkaša u isto vrijeme je smanjen u odnosnu na prethodno razdoblje. U 2018. godini, uzgojeno je svega 882 tone dagnji što je 38 tona manje u odnosu na prethodnu godinu, i 54 tone kamenice što iznosi 8 tona manje u odnosu na 2017. godinu (Tablica 1.1). Najveći dio proizvodnje riba i školjkaša odlazi na domaće i EU tržište, prvenstveno u Italiju (FAO, 2018). Prije ulaska Republike Hrvatske u

EU, izvoz je bio ograničen carinskim barijerama, te je ulaskom u EU, kako se i očekivalo, došlo do povećanja proizvodnje i izvoza.



Slika 1. 2. Glavne vrste u uzgoju RH po volumenu i vrijednosti uzgoja (Izvor: FAO, 2018).

Uzgoj školjkaša uključuje uzgoj mediteranske dagnje (*M. galloprovincialis*) i europske plosnate kamenice (*O. edulis*), koristeći tradicionalnu tehnologiju uzgoja na plutajućim linijskim sustavima (pergolarima). Na području Malostonskog zaljeva i Malog mora najzastupljeniji je uzgoj kamenica, dok je uzgoj dagnje najviše prisutan u Novigradskom moru, Šibenskom zaljevu te Malostonskom i Pulskom zaljevu. Uzgoj školjkaša se također provodi u užem području Splita, Zadra i Limskog kanala. Budući da ne postoji mrijestilište za školjkaše, uzgoj dagnji i kamenica isključivo se temelji na sakupljanju mlađi iz prirode (MPS, 2019).

Uzgoj bijele ribe, prvenstveno komarče (*S. aurata*) i lubina (*D. labrax*), u 2016. godini je zauzimao 53 % ukupnog volumena proizvedene ribe odnosno 9 098 tona. Lubin i komarča su najzastupljenije vrste u uzgoju, dok neznatan udio čine druge vrste riba. Zanimljivo je da ovaj segment zauzima 59 % ukupne vrijednosti proizvoda u hrvatskoj akvakulturi, te je zadnjih godina zabilježen rast proizvodnje u smislu masenog udjela i vrijednosti, a isti se trend očekuje i u nastupnim godinama. Općenito, proizvođači u segmentu uzgoja lubina i komarče nemaju dostatnu proizvodnju mlađi, stoga ih dijelom uvoze iz drugih zemalja Europske unije, iz Italije, Francuske i Grčke. S druge strane, najveća tvrtka Cromaris iz Zadra

je unaprijedila vlastitu proizvodnju posljednjih godina što je posljedično smanjilo potrebe za uvozom mlađi.

Tablica 1.1. Proizvodnja u marikulturi Republike Hrvatske (u tonama) za razdoblje 2014.-2018. godine (Izvor: MPS, 2019).

Vrsta	**Godina**				
	2014.	**2015.**	**2016.**	**2017.**	**2018.**
Dagnja	714	746	699	920	882
Kamenica	32	52	64	62	54
Jakovljeva kapica		0,016	0,06	0,04	0,06
Tuna	2,224	2,603	2,934	2,162	3,227
Lubin	3,215	4,075	5,310	5,616	6,220
Komarča	3,655	4,488	4,101	4,830	5,591
Hama	60	67	125	253	808
Zubatac	40	4	1		
Pastrva	13				
Romb	0,5	7	0,5		
Pagar	40				
Total (t)	9,960	12,043	13,235	13,483	16,782

Dugoročni strateški cilj je pozicionirati Hrvatsku među vodeće zemlje na području proizvodnje ribe i školjkaša, te unaprijediti konkurentnost uz zadovoljavanje svih ekoloških i kvalitativnih standarda. Prema Nacionalnom strateškom planu razvoja akvakulture za razdoblje 2014. – 2020. plan je bio povećati proizvodnju bijele ribe s 3 000 tona na 10 000 tona, a planirani kapaciteti proizvodnje su već premašeni. Povoljne biološke i ekološke karakteristike Jadranskog mora, s velikom raznolikošću morskog staništa utječu na iznimnu kvalitetu proizvoda ribarstva, te su značajne komparativne prednosti sektora. Upravo stoga, Republika Hrvatska ima priliku rukovoditi se principima ekološkog pristupa (engl. *Ecosystem based approach to aquaculture*), na temelju čega marikultura u Republici Hrvatskoj može zauzeti poziciju kao relevantan segment „*Blue growth"* strategije EU-a.

Značajnu snagu sektoru daju i postojeći mehanizmi potpore udruživanju te zadovoljavajuća uloga sektora u izvozu prehrambenih proizvoda Republike Hrvatske. Određenu sinergijsku snagu sektoru daje i turizam, koji predstavlja ne samo kanal prodaje već

i mogućnost promocije mediteranske prehrane i tradicionalne kulinarske tradicije na otocima i priobalju.

1.1. Karakteristike komarče (*Sparus aurata,* Linnaeus, 1758) i gospodarsko značenje

Komarča je vrsta iz razreda koštunjača (*Osteichthyes*), podrazreda *Actinopterygii* (zrakoperke), red *Perciformes* (grgečke), porodica *Sparidae* (ljuskavke). Red *Perciformes* se sastoji od najvećeg broja vrsta riba, 20 podredova, 160 porodica, 1540 rodova te preko 10 000 vrsta (Basurco i sur. 2011). Veliki broj vrsta visoke ekonomske vrijednosti pripada porodici *Sparidae*, koja je rasprostranjena od tropskih do umjerenih voda, te se nalazi u sva tri svjetska oceana (Basurco i sur. 2011). Ovu porodicu u Mediteranu predstavlja 11 rodova (*Dentex, Sparus, Diplodus, Pagellus, Pagrus, Lithognatus, Spondyliosoma, Oblada, Crenidens, Boops* i *Sarpa*). Glavnina vrsta ove porodice obitava u relativno plitkim vodama na stjenovitim područjima priobalja. Jedinke u skupinama nastanjuju plića eutrofizirana područja koja predstavljaju rastilišta i hranilišta za rane razvojne stadije, dok odrasle jedinke nakon sezone mrijesta pokazuju solitarno ponašanje (Moretti i sur. 1999). Većina vrsta koje pripadaju ovoj porodici su karnivori, a najčešći plijen su im rakovi i školjkaši.

Komarča, *Sparus aurata*, (Slika 1.1.1.) je jedini predstavnik roda *Sparus* u Mediteranu (Jardas, 1996). Tijelo je ovalno, bočno spljošteno („podlanica“). Karakterizira je velika glava s često izraženim velikim čeonim dijelom. Profil glave je konveksan te ima male oči. Obrazi su prekriveni ljuskama, a na predškržnom poklopcu ih nema. Usta karakterizira različita veličina gornje i donje čeljusti. U gornjoj i donjoj čeljusti nalaze se 4-6 očnjaka i kutnjaci. U gornjoj čeljusti su zubi poredani u 2-4 niza, a u donjoj u 3-4 niza, od kojih su 1-2 značajno veći. Škržne lamele su relativno kratke, na prvom škržnom luku ih ima 11-13, a na ostalim lukovima 7-8. Na bočnoj pruzi se nalazi 75-85 ljuski. Na leđnoj peraji se nalaze 11 tvrdih i 13 mekih šipčica, a na analnoj 3 tvrde i 11-12 mekih šipčica. Prsne peraje su duge i šiljaste, dok su trbušne puno kraće. Repna peraja je račvasta. Boja komarče je srebrnosiva s velikom tamnom mrljom na početku bočne pruge koja također pokriva i gornji dio škržnog poklopca. Između očiju se nalazi karakteristični zlatni most („orada“). Leđna peraja je plavosive boje s crnom crtom koja se proteže po sredini cijele peraje. Repna peraja je sivozelenkasta s crnim obrubom (Moretti i sur. 1999).



Slika 1.1.1. Komarča (*Sparus aurata,* Linnaeus 1758; Izvor: Igor Talijančić).

Ova vrsta je česta u Mediteranu, a razmjerno rijetka u Crnom moru. Također, nastanjuje Atlantski ocean, od Britanskog otočja preko otočja Cape Verde, oko Kanarskih otočja pa do obale Senegala u Africi. S obzirom da je euritermna[1] i eurihalina[2], prisutna je u morskom i boćatom okolišu, kao što su obalne lagune i estuarijska područja. Pridnena je vrsta, te najčešće obitava na stjenovitim ili pjeskovitim područjima iznad livada morskih cvjetnica. Mlađe jedinke se zadržavaju do dubine od 30 m, dok se odrasle jedinke mogu pronaći i na dubinama do 150 m (Colloca & Cerasi 2005; Sola i sur. 2006; Basurco i sur. 2011; Crosetti i sur. 2014).

Komarča je protandrični hermafrodit, što znači da su najprije funkcionalni mužjaci (obično prve dvije godine s dužinom od 20-30 cm), da bi postupno kroz inverziju spola postale funkcionalne ženke. Ženke višekratno izbacuju jaja u količini od 20 000- 80 000 dnevno tijekom produžene reprodukcijske sezone koja može potrajati dva do tri mjeseca. U Mediteranu mrijest traje od listopada do prosinca u temperaturnom rasponu od 13 do 17 °C. Jaja su sferična i pelagična, promjera do 1 mm, te imaju jednu uljnu kap. Planktonska ličinačka faza do metamorfoze traje otprilike 50-ak dana na temperaturi 17-18 °C (Moretti i sur. 1999; Sola i sur. 2006).

[1] Euritermne životinje - životinje koje bez štetnih posljedica za život podnose znatne razlike u temperaturi okoliša.
[2] Eurihaline životinje - životinje koje mogu tolerirati širi raspon slanosti.

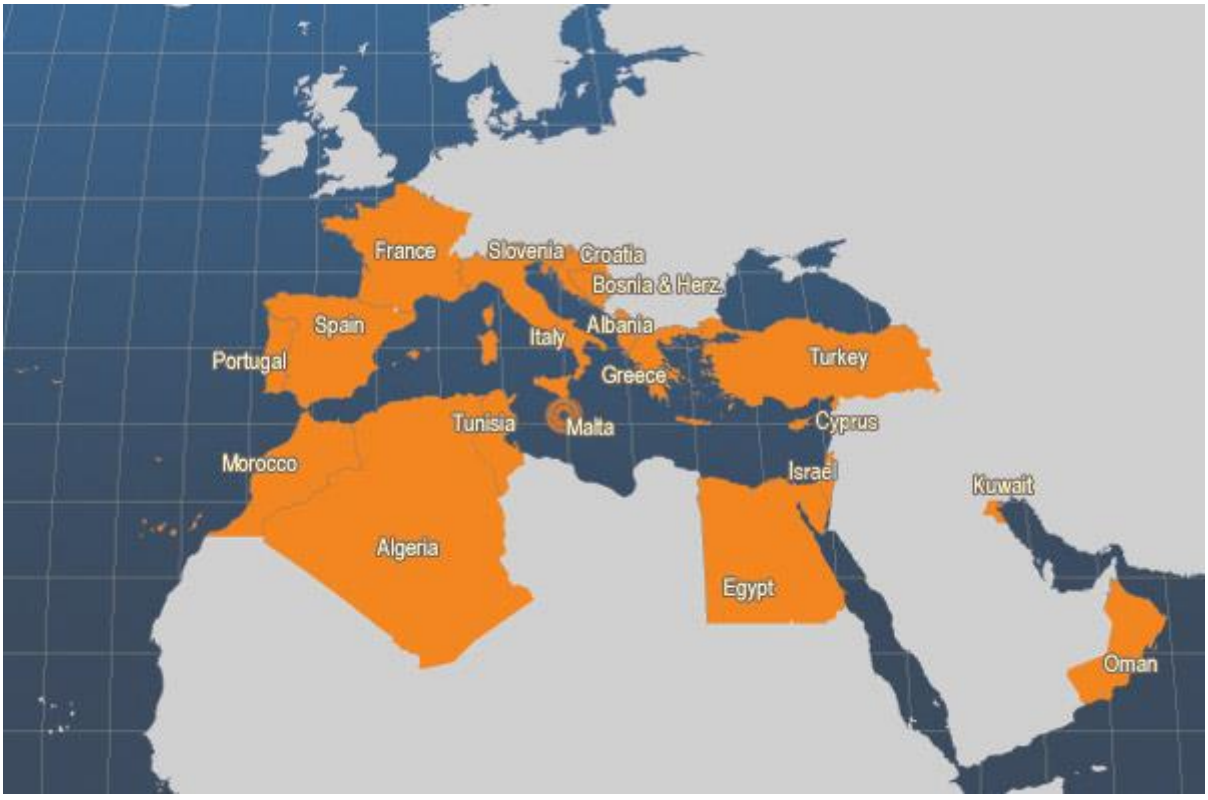
Tehnologija uzgoja. U intenzivnom uzgoju komarče proizvodnja mlađi se zasniva na uzgoju ranih razvojnih stadija u mrijestilištima iz prethodno kondicioniranih roditeljskih parova. Omjer mužjaka i ženki najčešće iznosi 3:1. Matice se drže u bazenima volumena 10-20 m^3, na gustoći od 4-8 kg/m^3. Skoro sva mrijestilišta produžavaju razdoblje mrijesta kontrolirajući temperaturu i fotoperiod. Jedna ženka tijekom produžene sezone mrijesta može proizvesti više od 1 000 000 jaja, s fertilizacijskom stopom od 90-95 % (Basurco i sur. 2011). U mrijestilištima se jaja inkubiraju u okruglim bazenima s konusnim dnom kapaciteta 100-250 L. Ovakav tip bazena omogućava kružno kretanje i dobro prozračivanje vode, te lakše odvajanje oplođenih od neoplođenih jaja. Otprilike 2 dana nakon oplodnje dolazi do izvaljenja ličinki pri temperaturi 16-17 °C. Ličinke su duge do 3 mm. Pri izvaljenju, žumanjčana vrećica sačinjava otprilike 1/3 ukupne duljine, oči im još nisu funkcionalne, usta su zatvorena, te na tijelu imaju svega nekoliko melanofora. Jedan od ključnih trenutaka u uzgoju je prelazak ličinke na aktivnu hranidbu, odnosno na živu hranu. Tri do četiri dana nakon izvaljenja započinje se s egzogenom hranidbom kolnjacima (*Brachionus pilicatis)*. U tom razdoblju, ličinke imaju relativno mali promjer usta te veličina živog plijena ne prelazi 100 μm. Nakon 2-3 tjedna od izvaljenja u prehranu se uvodi i salamurski račić (*Artemia salina*). Hranjenje živim plijenom traje otprilike do tri tjedna starosti ribe, s postupnim uvođenjem inertne odnosno ekstrudirane hrane jako malog promjera (puderi ili starteri). Prelazak s žive na inertnu hranu predstavlja stresno razdoblje za ribu, te ukoliko izostane postupnost u prelasku na novi hranidbeni režim očekuje se značajna smrtnost uzgojnog nasada (Moretti i sur. 1999).

Nasad mlađi iz mrijestilišta u kavezne sustave se provodi pri prosječnoj masi jedinki od 3 do 5 g gdje gustoća nasada iznosi 1,5 do 2,5 kg/m^3, dok promjer mrežnog oka na kavezima iznosi 5-8 mm. Uzgojni ciklus u kavezima traje od 18 do 24 mjeseca ovisno o lokaciji i temperaturi mora gdje riba dostiže masu od 350-400 g. U periodu uzgoja kad riba dostigne masu od 50-100 g (tzv. predkonzumna riba) prebacuje se u plutajuće kaveze s mrežnim tegom promjera oka od 10 do 20 mm na daljnji uzgoj (Katavić, 2006). Komercijalna veličina se može kretati od 250 g do preko 1,5 kg ovisno o strategiji proizvođača, ali i specifičnim potrebama tržišta. Hranidba se temelji na ekstrudiranim peletima s udjelom bjelančevina od 45 do 50 % i do 20 % masti. Kao i za većinu karnivornih morskih vrsta riba, izvor hrane su riblje brašno i ulje čija je ponuda ograničena i cijena visoka, te su proizvođači stalno u potrazi za alternativnim i održivim biljnim izvorima. U međuvremenu, značajno je poboljšana produktivnost kaveznog uzgoja kao posljedica unapređenja proizvodnih

tehnologija, automatizacije sustava hranjenja, procedure izlova i boljeg održavanja zdravstvenih uvjeta (Basurco i sur. 2011).

Gospodarska važnost komarče. Komarča je tradicionalno uzgajana vrsta u obalnim lagunama i morskim ribnjacima sve do početka osamdesetih godina prošlog stoljeća kada su stvoreni uvjeti za posve kontrolirani intenzivni uzgoj. Pogodna je vrsta za marikulturu zbog dobre tržišne i cjenovne prihvatljivosti, dobrog preživljavanja u uvjetima zatočeništva i hranidbenih navika koje omogućavaju korištenje kompletnih umjetnih krmiva (Katavić, 2016).

Većina uzgoja se odvija na Sredozemlju. Vodeći proizvođači su Grčka, Turska, Španjolska i Italija, dok proizvodnja raste u Hrvatskoj, Cipru, Egiptu, Francuskoj, Malti, Maroku, Portugalu i Tunisu (Slika 1.1.2.). Komarča se također uzgaja i u Crvenom moru, Perzijskom zaljevu i Arapskom moru. Najveća proizvodnja je zabilježena u Izraelu pa slijede Kuvajt i Oman (FAO 2018). Ukupna proizvodnja komarče u Republici Hrvatskoj za 2016. godinu iznosila je 4 304 tona (Tablica 1.1.1).



Slika 1.1.2. Zemlje u kojima se provodi uzgoj komarče (Izvor: FAO, 2014).

Tablica 1.1.1. Proizvodnja komarče po zemljama od 2008. do 2016. u tonama (Izvor: FEAP, 2017).

	2008.	2009.	2010.	2011.	2012.	2013.	2014.	2015.	2016.
Turska	31,670	28,362	28,157	32,187	30,743	35,701	41,873	48,000	67,612
Grčka	94,000	90,000	74,000	63,000	72,000	75,000	71,000	65,000	59,000
Španjolska	23,930	23,690	20,360	16,930	19,430	16,800	16,230	16,231	13,740
Italija	9,600	9,600	9,600	9,700	8,700	8,400	8,200	7,360	7,600
Cipar	1,600	2,572	2,799	3,065	3,121	4,444	2,919	3,656	5,136
Hrvatska	1,800	2,000	2,000	1,793	2,105	2,466	3,640	4,500	4,304
Francuska	1,636	1,648	1,377	1,500	1,300	1,477	1,105	1,502	1,671
Portugal	1,635	1,383	851,000	1,200	1,000	1,500	1,500	1,400	1,500
Ukupno	165,871	159,255	139,144	129,375	138,399	145,788	146,467	147,649	160,563

1.2. Utjecaj kaveznog uzgoja morskih riba na okoliš

Intenzifikacija uzgoja i porast broja uzgajališta potiču zabrinutost da akvakultura može predstavljati prijetnju biološkoj raznolikosti zbog štetnih utjecaja na divlje populacije i ekosustav, te se postavlja pitanje je li taj pritisak opravdan u odnosu na ekonomsku dobit. Iz tog se razloga u Europi, a i kod nas, sve više aktualizira pojam „održivosti“ (Katavić & Gavrilović 2017). Utjecaj marikulturnog procesa na okoliš ovisi o vrsti uzgajanog organizma, uzgojnoj metodi, gustoći uzgojnog stoka, vrsti hrane, hidrografskim uvjetima lokacije uzgoja i uzgajivačkoj praksi, a sam intenzitet ovisi o sposobnosti ekosustava da mineralizira otpadne tvari proizvodnje (dušik i fosfor), te o kvantitativnom i kvalitativnom sastavu otpada (Katavić & Antolić 1999). Općenito, oko 71 % fosfora, 68-86 % dušika (Islam, 2005) te 80-84 % ugljika koji se unesu u kavez preko hrane završe u morskom okolišu kao nekonzumirana hrana, produkti ekskrecije i disanja (Wu, 1995). Opasnosti po okoliš povezane s akvakulturnim aktivnostima reflektiraju se kroz prijenos bolesti, povećanje organskog otpada, opterećenost okoliša kemikalijama, te genetičke interakcije divljih i uzgojnih jedinki.

Utjecaj uzgajališta na vodeni stupac i morsko dno. Utjecaj uzgajališta izraženiji je na morsko dno nego na vodeni stupac, te se najviše očituje na bentonskim zajednicama[3] (Katavić, 2006). Stoga, odabir lokacije koja ima adekvatan prihvatni kapacitet, te u čijoj se blizini ne nalaze rijetki i ugroženi organizmi koji tvore posebne strukture poput koraljnih

[3] Životne zajednice koje žive na dnu, bilo u moru bilo u slatkoj vodi.

grebena i staništa od iznimne važnosti kao naselja morske cvjetnice *Posidonia oceanica* (Cvitković i sur. 2005) nužan je preduvjet za sprječavanje onečišćenja morskog okoliša. Negativne posljedice kaveznog utjecaja na morski okoliš se mogu značajno umanjiti primjenom bolje upravljačke prakse, odnosno novih tehnologija i drugih preventivnih mjera. (Karakassis, 2007; Katavić, 2008). Važno je istaknuti da će otpad uvijek postojati u obliku nepojedene hrane, fecesa i metaboličkih produkata. Iz tog razloga potrebno je bolje planiranje i integracija marikulture u obalni prostor, te procjene prihvatnog, odnosno asimilacijskog kapaciteta sustava. Pronalaženje odgovarajućih lokacija za uzgoj na integralnim principima, uvođenje visoko kvalitetne hrane i dobre prakse upravljanja uvelike doprinose smanjenju negativnog utjecaja uzgajališta na okoliš (Katavić i sur. 2017).

Utjecaj na morski stupac se najviše očituje u blizini samog kaveza kroz smanjenu koncentraciju otopljenog kisika i blago povećanje nutrijenata i turbiditeta (Wu, 1995; Katavić & Antolić 1999; Price & Morris 2013). Spomenuti uvjeti ukazuju da na području uzgoja nadomjestak kisika nije popraćen dostatnom dinamikom izmjene vodenih masa, bilo horizontalnim ili vertikalnim transportom, ali i primarnom produkcijom (stvaranje primarne organske tvari od anorganskih spojeva) što predstavlja pouzdan signal da proizvodnja nadmašuje ekološki prihvatljiv kapacitet ekosustava. Povišenje koncentracija dušika i fosfora može dovesti do hipernutrifikacije, a u ekstremnim slučajevima i do eutrofikacije, rezultirajući povećanom produkcijom fitoplanktonskih zajednica od kojih neke mogu biti toksične vrste. U odnosu na neka eutrofna mora, u Jadranu je fosfor limitirajući čimbenik primarne proizvodnje i stoga je povišena koncentracija fosfora u blizini uzgajališta, kao i na samom uzgajalištu, pouzdan indikator unosa nutrijenata u morski okoliš.

Dobrom uzgajivačkom praksom te praćenjem stanja uzgajališta negativni utjecaji se mogu prevenirati, odnosno znatno smanjiti. U tom pravcu, procjena utjecaja uzgajališta na okoliš i kontinuirano praćenje stanja okoliša na uzgajalištima s ciljem postizanja okolišne održivosti su bitne pretpostavke održive marikulturne prakse (Wu, 1995; Katavić, 2008).

Utjecaj kaveznog uzgoja na lokalne populacije riba. Sklonost okupljanja oko različitih prirodnih objekata, ali i umjetnih struktura (naftne platforme, umjetni grebeni) zamijećena je kod mnogobrojnih ribljih populacija. Tako priobalna i pučinska uzgajališta predstavljaju velike FAD-ove (engl. *Fish Atraction Devices*[4]), te privlače okolna ihtionaselja osiguravajući im dodatan izvor hrane. Zbog stalnog priljeva hrane s uzgajališta, brojnost

[4] Plutajući objekti na moru koji privlače brojne vrste riba u svim razvojnim stadijima, umjetnog podrijetla, kao što su naftne platforme, kavezi u uzgoju riba.

populacija oko kaveznih instalacija je veća u odnosu na područja bez uzgoja, a te populacije karakterizira bolja tjelesna kondicija koja se reflektira kroz rast i povećanje reproduktivnog potencijala (Dempster i sur. 2002; Stagličić i sur. 2017). Sanchez-Jerez i sur. (2011) su proveli istraživanja u kojima su utvrdili povećanu brojnost (52-283 puta) i broj vrsta (1,6-14 puta) u okolici ribogojilišta u odnosu na kontrolne lokacije. Na brojnim lokacijama Sredozemlja je utvrđeno da se vrste iz obitelji *Sparidae, Muglidae, Athemidae i Carangidae* zadržavaju u okolici farmi tijekom cijele godine. Slično agregiranje divljih pelagičnih vrsta oko tunogojilišta je potvrđeno na otocima Ugljanu i Braču (Šegvić-Bubić i sur. 2011c; Stagličić i sur. 2017).

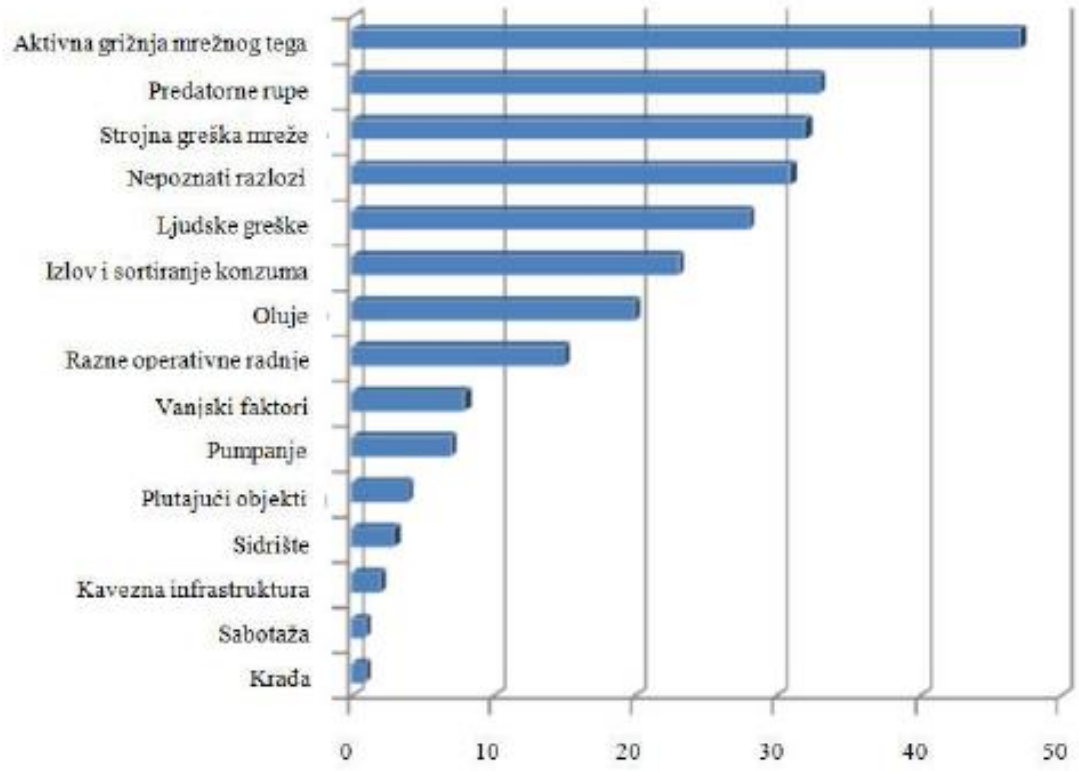
Ballester-Moltó i sur. (2017) su uočili značajnu ulogu divlje ribe u blizini uzgajališta koja je pridonijela smanjenju organskog otpada iz kaveznih sustava za 17,5 %, ističući da uklanjanje otpada varira s dubinom pa se ono izraženije odvija oko dijelova kaveza gdje je otpad intenzivniji, tj. u najdubljim dijelovima. Stoga, divlja riba koja obitava u blizini uzgajališta djeluje kao prirodni bio filter, smanjujući u znatnoj mjeri organsko opterećenje koje nastaje pri uzgoju. Međutim, na značajnost ovog učinka utječe brojnost populacija oko uzgajališta (Ballester-Moltó i sur. 2017). Tako je na nekim uzgajalištima uočena značajna brojnost divlje ribe u toku cijele godine (Fernandez-Jover i sur. 2008), dok se u drugim uzgajalištima brojnost znatno smanjuje tijekom najhladnijih mjeseci (Ballester-Moltó i sur. 2015). Prostorna varijabilnost može se objasniti obalnom geomorfologijom, topografijom morskog dna, udaljenošću od obale i raznolikošću staništa u blizini farmi (Dempster i sur. 2005), dok je vremenska varijabilnost povezana sa sezonskim uvjetima i fenologijom[5] ribe (Ballester-Moltó i sur. 2015).

Brojnim istraživanjima je potvrđeno da uzgajališta riba mogu biti rastilišta za rane razvojne stadije riba. Naime, u Sredozemlju su Fernandez-Jover i sur. (2008) utvrdili značajno naseljavanje poslijeličinačkih stadija (jedinke manje od 1 cm), gdje se dvadesetak različitih vrsta ličinki zadržavalo oko uzgajališta tijekom godine. Kako je unutar lokacije za uzgoj zabranjen ribolov, uzgajališta mogu djelovati kao mala zaštićena područja (Dempster i sur. 2006; Stagličić i sur. 2017).

Problem prebjega i utjecaj na lokalne populacije. Posljednjih godina zamijećen je sve značajniji utjecaj marikulture na lokalne prirodne populacije riba, osobito kao posljedica bijega uzgojnih jedinki iz plutajućih kaveznih instalacija. Sve uzgojne adultne i juvenilne

[5] Fenologija proučava pojave bioloških ciklusa i njihovu povezanost s klimom.

jedinke koje zbog određenih razloga pristupaju bijegu iz kaveza u morski okoliš smatraju se prebjezima. Prebjezi su neizbježna pojava u marikulturnoj praksi, a najčešće proizlaze iz ljudske pogreške pri rutinskom rukovanju kaveznim mrežama, mehaničkih kvarova i šteta uzrokovanih nepovoljnim vremenskim uvjetima ili predatorima koji trgaju mrežni teg (Slika 1.2.1.). Šest europskih država je procijenilo unos od oko 9 milijuna prebjega u morski okoliš tijekom tri godine, što je uglavnom posljedica strukturnih ili operativnih pogreški na uzgajalištima (Jackson i sur. 2015).



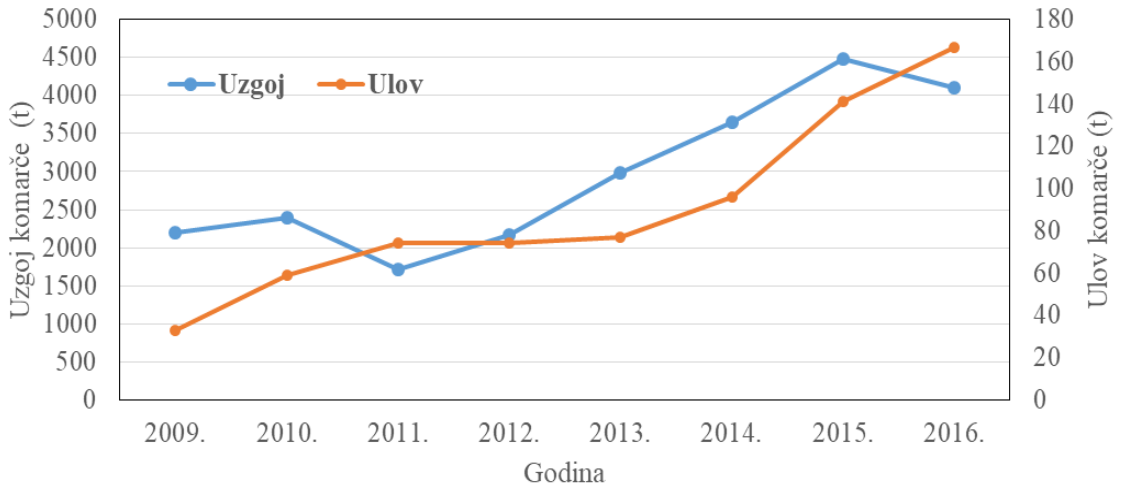
Slika 1.2.1. Najčešći uzroci bježanja ribe iz kaveza (Jackson i sur. 2015).

Prebjegle jedinke karakterizira potencijalno negativno genetičko i ekološko djelovanje na divlje populacije kroz kompeticiju za prirodna staništa, predaciju, transmisiju štetnih patogena i promjenu genetičke strukture prirodnih ihtionaselja kroz međusobno križanje. Prema Forrest i sur. (2007), čimbenici o kojima ovisi intenzitet djelovanja prebjega na ihtiopopulacije u blizini uzgajališta se očituju u stopi prebjega, selekcijskim osobinama uzgojnog stoka, uzgojnoj biomasi, veličini i intenzitetu izlova i zastupljenosti spolno zrelih jedinki, sposobnosti preživljavanja i reprodukcije odbjeglih jedinki u prirodnoj okolini koja je

određena ishranom i međusobnim križanjem s divljim jedinkama, te u veličini, distribuciji i zdravstvenom statusu ihtiopopulacija.

Osim navedenih razloga zbog kojih dolazi do prebjega (Slika 1.2.1.), odnedavno je zamijećen i drugi oblik prebjega, zbjegovi putem mrijesta. Naime, posljedica spontanog mrijesta riba u zatočeništvu jest otpuštanje velikog broja oplođenih i održivih jajnih stanica u okoliš (embrija). Buduća mlađ uzgojnog podrijetla može dugoročno ugroziti izvorni genotip prirodnih populacija zauzimanjem staništa i procesima hibridizacije (Dimitriou i sur. 2007; Jensen i sur. 2010). Upravo su preferencije potrošača koji žele veći jestivi dio ribe i gotove prerađene proizvode potaknuli proizvođače na produljenje uzgojnog ciklusa, što uzgajanim jedinkama dozvoljava potpunu gametogenezu u zatočeništvu, a samim time i spontani mrijest u kavezima kojim se otpušta velik broj oplođenih jajnih stanica iz kaveznih struktura u okolno more (Dimitrou i sur. 2007; Jensen i sur. 2010).

Intenziviranjem kaveznog uzgoja u Republici Hrvatskoj opravdana je zabrinutost zbog potencijalnog utjecaja prebjega na autohtone populacije. Nadalje, zadnjih godina primjetno je značajno povećanje brojnosti divlje komarče u Hrvatskoj kao i u Sredozemlju (Dimitriou i sur. 2007; Glamuzina i sur. 2014), što posljedično rezultira povećanjem ulova divlje komarče pri čemu ne treba zanemariti doprinos prebjega (Slika 1.2.2.).



Slika 1.2.2. Odnos uzgoja i ulova komarče u Republici Hrvatskoj (MPS, 2019).

Kao jedan od razloga povećane brojnosti divlje komarče navodi se upravo povećanje akvakulturne proizvodnje (Glamuzina i sur. 2014). Intenziviranjem uzgoja te porastom broja uzgajališta raste i njihov utjecaj na lokalni ekosustav, posebice na genetičku raznolikost divljih populacija. Brzi rast predstavlja jedno od komercijalno najvažnijih svojstava, te upravo iz tih razloga u uzgoju komarče brojni proizvođači preferiraju komarču podrijetlom iz Atlantskog oceana, koja ima znatno bolji potencijal rasta u usporedbi s lokanim populacijama (Miggiano i sur. 2005). Zbog nedostatne proizvodnje mlađi za potrebe uzgoja, Republika Hrvatska svoje potrebe dijelom nadoknađuje uvozom iz inozemstva (Italija, Francuska, Grčka), što opravdava bojazan o potencijalno štetnom utjecaju eventualnih prebjega na autohtone populacije, budući da su različitog geografskog podrijetla kao i genetičkih osobina.

Prebjezi su često okarakterizirani lošijom kondicijom i preživljavanjem u usporedbi s prirodnim populacijama. Ipak, prebjezi koji prežive u okolišu uspješno se križaju s prirodnim jedinkama, a takve interakcije su već zabilježene kod lososa u Norveškoj (Skaala i sur. 2006; Jensen i sur. 2010; Karlsson i sur. 2016; Bolstad i sur. 2017). Međusobno križanje uzgojnih i divljih populacija neupitno utječe na promjene u frekvenciji alela kao i uvođenje novih nenativnih alela, što vodi prema poremećaju genetičkog sastava lokalnih zajednica.

Uzgojne populacije znatno se genetički razlikuju od prirodnih populacija. Pri uspostavljanju matičnjaka iz velikih prirodnih populacija uzima se razmjerno mali broj jedinki. Selekcijom matičnih jedinki na željena svojstva i limitiranim brojem jedinki koje sudjeluju u stvaranju potomaka smanjuje se genetička raznolikost potomstva. S obzirom da je komarča dvospolac (protandrični hermafrodit), iste jedinke sudjeluju u stvaranju potomstva, prvo kao mužjaci, a zatim kao ženke, te tako znatno utječu na varijabilnost alela.

Nadalje, s obzirom na tržišne preferencije za većom pecaturom, produljeni uzgojni ciklus komarče omogućava spolno sazrijevanje, ne samo mužjaka nego i ženki, što u konačnici može rezultirati spontanim mrijestom u kavezima i otpuštanjem oplođenih jaja u okoliš (Somarakis i sur. 2013). Što je omjer spolova u kavezima uravnoteženiji, proizvodnja oplođenih jaja će se povećati. Jednako tako, vjerojatnost preživljavanja će biti veća što su biofizikalna svojstva okoliša u kojem se odvija uzgoj povoljnija za rast i razvoj ranih razvojnih stadija. Nedvojbeno su priobalne lagune takva područja (Dimitriou i sur. 2007).

Povećana brojnost komarče u prirodnom okolišu dovodi do sve izraženije kompeticije za prostor i hranu, što se u posljednje vrijeme očituje i u intenzivnijoj predaciji divlje komarče na uzgajalištima školjkaša. Posljedično, štete uzrokovane predacijom komarče na brojnim

uzgajalištima školjkaša duž jadranske obale, osobito dagnji, negativno utječu na opstojnost školjkarskog sektora (Šegvić-Bubić i sur. 2011a; Glamuzina i sur. 2014). Osim trofičkih interakcija, zabilježene su i druge ekološke interakcije prebjega u prirodnom staništu, kao što su genetičke interakcije s divljim populacijama (Šegvić-Bubić i sur. 2014) i širenje patogena (Arechavala-Lopez i sur. 2013b; Mladineo i sur. 2013). Recentnim telemetrijskim istraživanjima potvrđeno je da odbjegle ribe iz uzgojnih kaveza imaju visoku stopu preživljavanja u prirodnom okolišu. Nakon bijega, po nekoliko mjeseci se zadržavaju u zoni uzgajališta, ulaze u područja drugih uzgajališta kao i u obližnje priobalne vode i lokalne luke (Toledo-Guedes i sur. 2009; Arechavala-Lopez i sur. 2011, 2012c; Šegvić-Bubić i sur. 2018). Potencijalno križanje prebjega s lokalno-divljim populacijama može značajno utjecati na sposobnosti preživljavanja i reproduktivni uspjeh (engl. *fitness*) novonastalih hibridnih jedinki. Intenzitet utjecaja je u pozitivnoj korelaciji s učestalošću uzgojno-divljih interakcija, što posljedično može dovesti do depresije fitnesa na razini populacije (Hindar i sur. 2006). Naime, prirodne populacije znatno se genetički razlikuju od uzgojnih populacija. Dodatno, većina uzgojnih programa koristi limitirani broj matičnih jedinki što dovodi do križanja u bliskom srodstvu te povećava vjerojatnost pojave genetičkog otklona (engl. *genetic drift*), odnosno slučajne promjene učestalosti alela u sljedećim generacijama (Chavanne i sur. 2016). Kako se efektivna veličina populacije smanjuje, genetički otklon narušava genetičku varijaciju povećavajući vjerojatnost ispoljavanja i fiksacije štetnih alela (Slatkin,1985).

Iako se utjecaj zbjegova na lokalne populacije kod salmonidnih vrsta već duže vrijeme intenzivno proučava (Naylor i sur. 2005; Ford i sur. 2008; Glover i sur. 2017), za dvije ekonomski najvažnije vrste u Sredozemlju, komarču i lubina, sustavan pristup proučavanju utjecaja prebjega, hibridizacije, kao i razvoja preventivnih mjera još uvijek nije uspostavljen (Triantafyllidis, 2007; Arechavala-Lopez i sur. 2017; Šegvić-Bubić i sur. 2017).

Klimatske promjene, također, mogu utjecati na promjene u brojnosti i distribuciji lokalnih vrsta. Naime, od početka 20. stoljeća zabilježen je prosječan rast temperature mora za 0,7°C (Trenberth i sur. 2007), kao i godišnji trend porasta temperature u Mediteranu (Shaltout i Omstedt 2015). Promjene u brojnosti vrsta i njihova migratorna kretanja s afinitetom prema toplim vodama su već opažene u različitim područjima Sredozemnog mora (Francour i sur. 1994). S obzirom na to da je komarča suptropska (toploljubna) vrsta, povećanje temperature mora može pozitivno utjecati na preživljavanje ranih razvojnih stadija i na povećani regrutacijski uspjeh vrste.

1.3. Razlikovna obilježja populacija različitog podrijetla

U prvim istraživanjima 1980-ih korišteno je samo nekoliko metoda identifikacije prebjega koje su se temeljile na značajnim razlikama u rastu, režimu hranjenja te okolišnim parametrima u kojima žive uzgojne i divlje jedinke. Prva su istraživanja provedena na lososu primjenom metoda koje su se koristile za identifikaciju stoka u ribarstvu (Fiske i sur. 2005). Ekološke osobine, markiranje, rasprostranjenost parazita, fiziološke osobine, ponašanje, morfometrija i meristika, kalcificirane strukture, citogenetika, imunogenetika i krvni pigmenti su najčešće korištene karakteristike za analizu strukture stoka u proučavanju ribljih populacija (Ihssen i sur. 1981). Danas je razvijen veliki broj identifikatora koji se primjenjuju u detekciji prebjega, od kojih su najpoznatiji i najprimjenjivaniji: morfometrija, profil masnih kiselina, zastupljenost elemenata u tragovima i prisustvo polutanata, stabilni izotopi, organoleptička svojstva, te naposljetku genetičke razlike.

Vanjski izgled i morfologija. Vanjski izgled i morfološka obilježja u određenoj mjeri odražavaju životnu povijest riba (Grigorakis, 2007). Na vanjske karakteristike uzgojnih riba utječu uvjeti u uzgoju ističući gustoću nasada i strategije hranjenja (Grigorakis, 2007). Morfometrijski indikatori i metoda vezane mreže pokazali su se kao praktična, učinkovita i jeftina metoda za određivanje podrijetla uzgojnih jedinki, a kao najbolji morfometrijski indikator pokazao se položaj usta (Arechavala-Lopez i sur. 2011). Dosadašnjim istraživanjima fenotipskih razlika uzgojnih i divljih jedinki lubina i komarče prepoznato je da su robusnost i zbijenost tijela uzgojne komarče i lubina posljedica gustoće nasada, strategije hranjenja i procesa selekcije (Grigorakis, 2007). Kod uzgojnih komarči vidljive su malformacije koje su rezultat uzgoja u velikim gustoćama (Sola i sur. 1998; Loy i sur. 1999). Osim okom vidljivih malformacija, uzgojena komarča ima veću visinu tijela, zdepastiji tjelesni oblik i plosnatiji oblik glave (Grigorakis, 2007; Talijančić i sur. 2019). Zubi su kod uzgojne komarče manji i slabije razvijeni, okruglasto-četvrtastog oblika. Razlike su još vidljive u koži, ljuskama i perajama.

Zdepasti oblik tijela uzgojnih jedinki je generiran selekcijom u mrijestilištima i genetičkim otklonom kroz generacije. Smanjenje duljine peraja je povezano s uvjetima uzgoja i mogućnostima plivanja. Volumen i hidrodinamika kaveza, gustoća populacije, nepostojanje predatora te dostupnost hrane su doveli do smanjenog korištenja peraja, te samim time i njihovim skraćivanjem, ne zanemarujući i abraziju peraja uslijed visokih nasadnih gustoća (Arechavala-Lopez i sur. 2012b; Šegvić-Bubić i sur. 2014).

Organoleptičke karakteristike. Organoleptička svojstva (okus, miris), vanjski izgled i hranjiva vrijednost su kriteriji koji zajedno sa svježinom potrošači najviše vrednuju pri određivanju kakvoće ribe (Grigorakis, 2007). Ovo je u mnogome korelirano s biokemijskim sastavom ribe, koji zauzvrat ovisi o specifičnim karakteristikama ribe (vrsta, starost, spol), varijablama okoliša (npr. temperatura, slanost), i naposljetku hrani i hranidbi (Grigorakis, 1999). Na prehrambenu vrijednost i organoleptička svojstva ribe značajno utječu uvjeti uzgoja. Razlike u kvalitativnom sastavu i senzornim parametrima između divljih i uzgojenih riba ponajviše su uvjetovane različitom prehranom, gdje se u uzgoju koristi kompletna peletirana hrana balansiranih nutritivnih vrijednosti, dok divlje komarče svoju ishranu nalaze u rakovima i školjkašima. Razlike u organoleptičkim svojstvima između jedinki divljeg i uzgojnog podrijetla vidljive su u razlici mirisa same ribe i teksturi mišićnog tkiva (Grigorakis i sur. 2002, 2003; Šimat i sur. 2012).

Sastav i profil masnih kiselina. U intenzivnoj marikulturi visoki sadržaj proteina i masti u prehrani bitno utječu na aminokiselinski sastav i zastupljenost masti, odnosno profil masnih kiselina u tkivima uzgojne komarče (Lopparelli i sur. 2004). U tkivima divljih jedinki, u usporedbi s uzgojnim, ustanovljen je manji udio masti te viši udio vode (Attouchi & Sadok 2010; Šimat i sur. 2012). Uočene razlike u zastupljenosti masnih kiselina pripisuju se nutritivnom sastavu hrane, velikim gustoćama nasada u limitiranim prostornim uvjetima koji rezultiraju smanjenom aktivnosti ribe u uzgoju (Alasalvar i sur. 2002). Međutim, u određenim istraživanjima je uočena veća koncentracija proteina u filetima divljih jedinki u usporedbi s filetima uzgojnih jedinki (Carpene i sur. 1998; Grigorakis i sur. 2002; Orban i sur. 2003), dok u nekima razlika nije uočena (Alasalvar i sur. 2002; Flos i sur. 2002; Grigorakis i sur. 2003; Nasopoulou i sur. 2007; Attouchi & Sadok 2010, 2012). Sadržaj proteina u mišićnom tkivu ne može se isključivo povezati s prehranom s obzirom da varijabilnost može također biti uvjetovana fiziološkim i genetičkim karakteristikama jedinke i njenom veličinom, vremenom uzorkovanja i dostupnošću hrane (Grigorakis, 2007; Attouchi & Sadok 2010).

Stabilni izotopi. Stabilni izotopi dobro opisuju trofičke odnose pojedinih populacija. Ugljik (13C), dušik (15N) i kisik (18O) su tri glavna elementa od kojih se sastoje živi organizmi. Kroz složeni lanac ishrane lako se prenose iz jednog organizma u drugi. Asimilacijom određenog sastava tih elemenata jedinke dobivaju specifičan zapis okolišnih parametara. Industrijski pripravljena hrana za potrebe hranidbe riba u uzgoju nerijetko sadrži elemente koji su kopnenog podrijetla (biljni proteini i ulja) što se odražava na zastupljenost pojedinih tkivnih elemenata. Na temelju tih razlika, analiza stabilnih izotopa može se

primijeniti u determinaciji podrijetla jedinki (divlje *vs.* uzgojne). Kod lubina i komarče uočen je različiti izotopski sastav jedinki divljeg i uzgojnog podrijetla (Serrano i sur. 2007, 2008; Ottavian i sur. 2012).

Elementi u tragovima. Preko morske vode i hrane ribe ugrađuju u skelet i mišićje različite elemente u tragovima, kreirajući tako u svom tijelu specifičan odraz okoliša u kojemu obitavaju (Lal, 1989). Stoga bi profil elemenata u tragovima trebao biti jedinstven za danu populaciju koja obitava na određenom prostoru. Između divljih populacija koje su u doticaju s različitim staništima teško je dobiti značajnu razlikovnu strukturu. Međutim, između divljih i uzgojnih jedinki ta je razlika prepoznatljiva stoga što uzgajane jedinke obitavaju na uskom području koje obilježavaju posve specifična obilježja. I pored toga, pojedini literaturni navodi temeljeni na analizi elemenata u tragovima ukazuju na kontradiktorne diskriminatorne elemente u razlikovanju uzgojnih i divljih komarči (Arechavala-Lopez i sur. 2013a). Elementi u tragovima koji najviše doprinose razlikovanju podrijetla, mjereni u otolitu i ljusci su: bor (B), barij (Ba), magnezij (Mg), mangan (Mn), kalij (K), stroncij (Sr) i cink (Zn). Međutim, samo je nekoliko elemenata pokazalo konzistentne odnose uspoređujući ljuske i otolite. U obje biološke strukture zabilježene su povećane koncentracije Mg i Ba, te smanjenje Sr u uzgojnim ribama u usporedbi s divljima. Međutim, kod elemenata K, Fe i Zn uočen je suprotan obrazac, niže koncentracije zabilježene su u ljusci, a veće u otolitu uzgojnih riba (Arechavala-Lopez i sur. 2016; Šegvić-Bubić i sur. u objavi). Različiti obrasci koncentracije elemenata u ljusci i otolitu pripisuju se različitim putevima deponiranja datih elemenata. Elementi iz krvotoka se direktno ugrađuju u ljusku (Wells i sur. 2003), dok se u otolit ugrađuju kroz endolimfnu tekućinu (Campana, 1999).

Genetičke razlike. Kao posljedica selekcijskog rada s limitiranim brojem matičnih jedinki, ciljajući poželjno fenotipsko svojstvo poput rasta ili otpornosti na patogene, postupno kroz generacijski slijed akumuliraju se promjene u genetičkoj strukturi praćene smanjenjem genetičke varijabilnosti potomaka. Ova različitost može biti posljedica tehnologije uzgoja u kojoj je praksa da se iste matične jedinke koristi godinama za mrijest i dobivanje mlađi. Takav način upravljanja utječe na eliminaciju rijetko prisutnih alela, te naposljetku smanjenju njihove brojnosti. Stoga se razlike u genetičkoj strukturi divljih i uzgojnih jedinki mogu sagledati kroz tri ključna svojstva. Prva razina koja doprinosi stvaranju promjena uključuje učinak osnivača (engl. *founder effect*)[6], koji je zajednički svim uzgojnim populacijama, a

[6] U populacijskoj genetici učinak osnivača je gubitak genetske varijacije koja nastaje kada novu populaciju ustanovi vrlo mali broj jedinki iz veće populacije. To je prvi put opisao Ernst Mayr 1942. godine. Kao rezultat

praćen je gubitkom rijetkih alela kao i promjenom u frekvenciji alela. Posljedično, efektivna veličina populacije[7] je manja u uzgojnim nego u divljim populacijama (Youngson i sur. 2001). Druga razina diferencijacije se ispoljava kada su uzgojne jedinke različitog geografskog podrijetla i genetički se razlikuju od divlje populacije. Treća razina diferencijacije je učinak umjetne selekcije, kako posljedica optimizacije uzgoja gdje se provodi selekcija fenotipa na komercijalno važna svojstva.

1.4. Molekularni biljezi

U genetici, molekularni biljeg ili marker je segment DNA poznate lokacije na kromosomu koji se može koristiti za identifikaciju jedinki, populacija ili vrsta. Osnovni alat za istraživanje genetičke raznolikosti su genetički biljezi pomoću kojih se određuje prisutnost određenih alela u populaciji (Conner & Hartl 2004). Razvojem istraživačkih metoda u upotrebu ulaze molekularni biljezi (za razliku od fenotipskih biljega), a temeljna metoda istraživanja molekularnih biljega je gel elektroforeza (razdvajanje molekula na gelu upotrebom električne struje). Iako noviji markeri nerijetko zamjenjuju stare (npr. mikrosateliti su uvelike zamijenili minisatelite), važno je napomenuti da nijedan genetski biljeg nije idealan za sve primjene (Rowe i sur. 2017). Krvne grupe, koje se nasljeđuju prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja, i njihova frekvencija u populaciji bili su prvi biljezi koji su korišteni u opisu populacija. Hirszfeld & Hirszfeld (1918-19) prvi su opisali razliku u frekvenciji krvnih grupa u ljudskim populacijama.

Neki od najčešće korištenih molekularnih biljega su polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata – RFLP (engl. *restriction fragment lenght polymorphism*), nasumično umnožena polimorfna DNA – RAPD (engl. *random amplified polymorphic DNA*), polimorfizam duljine umnoženih fragmenata – AFLP (engl. *amplified fragment length polymorphism*), polimorfizam pojedinačnih nukleotida – SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*), polimorfizam jednolančane konformacije – SSCP (engl. *single strand conformational polymorphisms*), varijabilni broj uzdužno opetovanih sljedova – VNTR (engl. *variable number tandem repeats*). Istovremena upotreba više biljega u populacijskim istraživanjima

gubitka genetičke varijacije, nova populacija može se razlikovati genotipski i fenotipski od matične populacije iz koje je izvedena.

[7] Efektivna veličina populacije je broj jedinki koje bi trebale biti u idealiziranoj populaciji da bi se proizvodio sličan broj potomaka kao u realnoj populaciji od interesa. U nekim jednostavnim slučajevima, ova efektivna veličina populacije je jednaka broju reprodukcijski sposobnih jedinki u realnoj populaciji.

može ukazati na različita genetička obilježja populacije, što ovisi o brzini mutacije pojedinog biljega i njegovim značajkama.

Molekularni biljezi, kao što su mikrosateliti i polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphism*: SNP), danas se uspješno primjenjuju pri razlučivanju populacijske pripadnosti vrste, kao i pri identifikaciji hibridizacijskih procesa uzgojnih i divljih populacija (Glover i sur. 2013; Karlsson i sur. 2016).

Zbog svojih osobina, mikrosatelitni biljezi su se pokazali informativnim u provođenju genetičkih istraživanja kod riba, a prvi riblji mikrosatelitni biljezi su bili izolirani iz DNA smeđe pastrve *Salmo trutta* (Estopu i sur. 1993). Nakon toga, mikrosateliti su razvijeni za mnoge riblje vrste i upotrijebljeni za analizu genetičke strukture populacija. U svrhu istraživanja genetičke diferencijacije između divljih i uzgojnih populacija riba napravljena su mnogobrojna istraživanja (Rossi i sur. 2006; Briñez i sur. 2011; Franchini i sur. 2012; Šegvić-Bubić i sur. 2011b, 2017). Većina mikrosatelita se nalazi u nekodirajućim regijama (Li i sur. 2002), međutim mogu biti smješteni u blizini ili u kodirajućim regijama gena, poput EST-SSR (engl. e*xpressed sequence tag-simple sequence repeat*) biljega, pa njihovi polimorfizmi mogu imati utjecaj na ekspresiju funkcionalnih gena, a time i na sposobnost opstanka jedinki (Chistiakov i sur. 2006). Biljezi koji se nalaze u kodirajućim regijama često su povezani s poželjnim obilježjima za ekonomski važne vrste. Mikrosateliti razvijeni na kalupu EST sljedova korišteni su za genetičko mapiranje atlantskog lososa, *Salmo salar* (Koljonen i sur. 2002), soma, *Silurus glanis* (Waldbieser i sur. 2001), tilapiju, *Oreochromis aureus* (Shirak i sur. 2002), pastrvu, *Oncorhynchus mykiss* (Sakamoto i sur. 2000) i zebrica, *Danio rerio* (Knapik i sur. 1998).

1.4.1. Mikrosatelitni biljezi

Jedan od mogućih pristupa u istraživanju genetičke raznolikosti populacija je analiza polimorfnosti mikrosatelita. Veliki broj alela koji se nalaze u hipervarijabilnim mikrosatelitnim lokusima mogu upućivati na razlike između populacija i individua iste vrste, posebno kombiniranjem većeg broja lokusa. Ovakav pristup omogućava proučavanje strukture populacija, kretanja populacija, stupnja srodnosti, fragmentiranosti populacija, broja migranata i procjenu efektivne veličine populacije (Orsini i sur. 2004).

Izraz mikrosateliti potječe od Litt & Lutty (1989), a ovi biljezi poznati su i kao jednostavne ponavljajuće sekvence (engl. ***SSR - Simple Sequence Repeat***). Mikrosateliti su izvorno dizajnirani za istraživanje degenerativnih i neuroloških bolesti kod ljudi, ali su pokazali veliku primjenu i za druge svrhe. To su dijelovi DNA koji se sastoje od uzastopnih ponavljanja mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ili heksanukleotida raspoređenih kroz genom većine eukariota (Powell i sur. 1996). Tako se na primjer slijed baza CT može ponoviti i 20 puta zaredom, što se označava $(CT)_{20}$, a broj ponavljanja rijetko prelazi 70 (Tablica 1.4.1.1). Mikrosateliti se također mogu podijeliti prema tipu ponavljanja: (i) pravilno, kada su ponavljanja identične dužine i slijeda, $(AT)_{20}$ (ii) prekinuta ponavljanja, ponavljajući slijed je prekinut drugim nukleotidnim slijedom koji se ne ponavlja, tj. ne odgovara motivu slijeda, npr: $(AT)_{12}CG(AT)_6$, (iii) složen, kad je prisutno dva ili više različitih motiva u ponavljanju, npr. $(AT)_7(GC)_6$ (Selkoe & Toonen, 2006).

Prisutni su u kodirajućim, UTR (engl. *Untranslated Region*) i nekodirajućim regijama DNA i zapremaju velik udio genetičkog materijala (Rajendrakumar i sur. 2007). Položaj mikrosatelita potencijalno utječe na strukturu DNA, rekombinaciju i replikaciju DNA, i ekspresiju gena (Chistiakov i sur. 2006). Kashi i sur. (1997) uočili su da u promotorskim regijama prisutnost i duljina mikrosatelita može utjecati na aktivnost transkripcije. U usporedbi s RAPD i AFLP biljezima koji utvrđuju prisustvo tj. odsustvo pojedinog lokusa, mikrosateliti su kodominantni biljezi i omogućavaju razlikovanje homozigotnih i heterozigotnih genotipova (Hoshino i sur. 2012).

Tablica 1.4.1.1. Prikaz alela različitog broja ponavljanja u dinukleotidnom (alel 23 s četiri CT ponavljanja i alel 27 sa šest CT ponavljanja) i trinukleotidnom (alel 30 s pet CTT ponavljanja i alel 33 sa šest CTT ponavljanja) mikrosatelitnom lokusu.

Nukleotidni sljed	**Duljina alela**	**Motiv ponavljanja**
-CCAAGTAA**CTCTCTCT**ATGAACT-	23 bp (15 bp+8 bp)	$-(CT)_4$
-CCAAGTAA**CTCTCTCTCTCT**ATGAACT-	27 bp (15 bp+12 bp)	$-(CT)_6$
-CCAAGTAA**CTTCTTCTTCTT**ATGAACT-	30 bp (15 bp+15 bp)	$-(CTT)_5$
-CCAAGTAA**CTTCTTCTTCTTCTTCTT**ATGAACT-	33 bp (15 bp+18 bp)	$-(CTT)_6$

Najčešći izbor za molekularno genetička istraživanja su dinukleotidna, trinukleotidna i tetranukleotidna ponavljanja. Za mnoge vrste većinu mikrosatelita čine dinukleotidna ponavljanja (Selkoe & Toonen 2006). Mikrosatelitne sekvence su posebno pogodne za diferencijaciju srodnih genotipova zbog njihovog visokog stupnja varijabilnosti pa se stoga

često koriste u analizi varijabilnosti populacije (Smith & Devey 1994), kao i za identifikaciju srodnosti (Vosman i sur. 1992). Radi velikog polimorfizma, mnogi mikrosateliti omogućuju uspješnu identifikaciju jedinki i odnosa unutar porodica, omogućuju identifikaciju srodstva i veze, ne samo u prvoj, već i u daljnjim generacijama pa su istraživači u stanju analizirati reprodukcijsku moć pojedine jedinke (Crivelli i sur. 2000).

Prednosti mikrosatelita su kodominantnost, njihova velika zastupljenost u eukariotskom genomu i nasumična raspodjela (Morgante i sur. 2002; Barcaccia i sur. 2006). Mikrosateliti su svojstveni vrsti pa kontaminacije od strane neciljanih organizama predstavljaju manji problem nego kod tehnika koje koriste univerzalne početnice (početnice koje amplificiraju regije DNA kod više različitih vrsta). Korištenje mikrosatelita kao molekularnih biljega omogućava upotrebu manjih uzoraka tkiva koje je lako pohraniti za daljnju uporabu. Stabilnost DNA u usporedbi s enzimima dozvoljava uporabu jednostavnih tkivnih konzervansa, kao što je 95 % etanol za dužu pohranu (Hoshino i sur. 2012). Jedna od prednosti uporabe mikrosatelita kao molekularnih biljega je jednostavnost i jeftina detekcija putem lančane reakcije polimerazom (PCR) i primjene kapilarne elektroforeze. Za PCR[8] reakciju potrebne su male količine DNA (svega 10 ng po reakciji) te umnažanje ne zahtijeva visokokvalitetnu DNA.

Unatoč mnogim prednostima, mikrosatelitni biljezi imaju i neke nedostatke u primjeni što otežava analizu podataka. Uglavnom su ograničeni nul-alelima, homoplazijom i neravnotežom vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*). Nul-aleli su posljedica mutacija u bočnim regijama što ometa nasjedanje početnica, te time izostaje amplifikacija alela. Prisustvo nul-alela može dovesti do pogrešnih procjena učestalosti alela i segregacijskih stopa, te su povezani s nedostatkom heterozigota (pojava „lažnog“ homozigota). Homoplazija podrazumijeva prisustvo alela koji su jednaki po duljini, ali ne i po podrijetlu. Ukoliko se homoplazija zanemaruje, može se podcijeniti stvarna razlika između populacija. Homoplazija povećava evolucijsku udaljenost što može podcijeniti pouzdanost filogenetske hipoteze, ugroziti točnost analize i limitirati filogenetski zaključak (Jarne & Lagoda 1996). Međutim, u analizama populacijske genetike ona ne predstavlja značajan problem na nižim razinama udaljenosti (Jerne & Lagoda 1996; Hoshino i sur. 2012), osim u visoko mutacijskim biljezima koji imaju povećanu stopu klizanja (Anmarkrud i sur. 2008). Neravnoteža vezanosti gena, povezanost alela dvaju ili više lokusa koja nije slučajna i koja se pojavljuje u postotku različitome od očekivanoga, prvenstveno nastaje uslijed strukturiranja populacije i visokog

[8] PCR (engl. Polymerase Chain Reaction), lančana reakcija polimerazom

stupnja neslučajno odabiranih genetički srodnih reproduktivnih partnera (engl. *inbreeding*). Dodatno, jedan od nedostataka mikrosatelitnih biljega su visoki troškovi dizajna početnica. Kod nedovoljno istraženih vrsta uporaba mikrosatelita je limitirajuća jer su početnice vrsno specifične. Iste početnice se mogu koristiti kod filogenetski bliskih vrsta, kao u slučaju trlje blatarice (*Mullus barbatus*) i trlje kamenjarke (*Mullus surmulentus*) (Galarza i sur. 2007) uz prethodnu provjeru polimorfnosti lokusa.

Mikrosateliti imaju visoku stopu mutacija (između 10^{-2} i 10^{-6} mutacija po lokusu po generaciji) koja generira visoku stopu alelne raznolikosti potrebne za genetička istraživanja. Faktori koji djeluju i kontroliraju evolucijsku dinamiku mikrosatelita su: mutacijski mehanizmi, struktura i karakteristike mikrosatelita, mehanizmi popravka DNA te selekcijski utjecaji (Hoshino i sur. 2012). Podložni su pogreškama prilikom replikacije DNA zbog ponavljajućih sljedova nukleotida koje sadrže, duljini ponavljajućeg motiva, prekidima unutar motiva, sastavu nukleotidnog motiva i bočnim sekvencama (Hoshino i sur. 2012; López-Flores & Garrido-Ramos, 2012).

Varijabilnost mikrosatelitnih regija uzrokuju različiti mutacijski mehanizmi. Pogrešno sparivanje iskliznutog lanca (engl. *slipped - stand misparing*) ili replikacijsko klizanje (engl. *replication slippage*) dovodi do skraćenja ili produljenja DNA molekule prilikom replikacije (Schlötterer & Pemberton, 1994). Posljedica ovog proklizavanja je ta da novonastali komplementarni DNA lanac nosi omču kao rezultat jednog ili više ponavljanja viška, te u sljedećim replikacijskim ciklusima omča može poslužiti kao kalup, a posljedica toga je produljenje novonastalog DNA lanca (engl. *forward slippage*). Suprotno tome, ako tijekom replikacije omča nastane na lancu kalupa, u sljedećem ciklusu replikacije posljedično se javljaju strukturne aberacije tj. delecije kromosoma (engl. *backward slippage*). Nejednaka rekombinacija tijekom mejoze rezultira smanjenjem ili potpunim gubitkom mikrosatelitnih regija na jednom kromosomu i povećanjem njihovog broja na drugom. Najčešća mutacija kod mikrosatelita je promjena od jedne ponavljajuće jedinice. Takav tip mutacija omogućuje da lokusi evoluiraju procesom tzv. stupanjske mutacije (engl. *Stepwise Mutation Model* – SMM).

Osnovni mutacijski modeli koji opisuju evoluciju mikrosatelita su model beskonačnih alela (engl. *Infinite Allels Model*, **IAM**) i model stupanjske mutacije (engl. *Stepwise Mutation Model*, **SMM)**. IAM, model koji su opisali Kimura & Crow 1964. pretpostavlja da svaka mutacija uzrokuje stvaranje novog alela u populaciji. Ovaj model isključuje homoplaziju; jednaki aleli dijele isto podrijetlo. Nasuprot tome, drugi model (SMM) koji su razvili Otha & Kimura (1973) podjednako će razmotriti produljenje ili skraćivanje mikrosatelita, te su

promjene alela uzrokovane dodavanjem ili brisanjem ponavljajućeg motiva. Ovaj se model primjenjuje pri procjeni povezanosti jedinki i podstrukturiranosti populacija. Prošireni SMM (TPM model), koji su opisali Di Rienzo i sur. (1994), dopušta promjenu za nekoliko osnovnih jedinica. Stupanj mutacije je alelno specifičan pa se u različitim lokusima formiraju različiti aleli (Goldstein & Schlötter 1999). Većina studija pokazuje da je TPM najrealniji model mutacije među gore definiranim za mikrosatelitne lokuse (Estoup & Cornuet 1999; Schlötterer 2000; Ellegren 2004).

Zbog visoke stope mutacija mikrosateliti su vrlo informativni molekularni biljezi. Koriste se pri proučavanju migracijske stope, veličine populacija, srodnosti i slično. Mikrosateliti imaju moć razlučivanja relativno visokih stopa migracija i mogu ukazati na povezanost jedinki. Jedni su od rijetkih molekularnih biljega koji nam pružaju uvid u različita ekološka pitanja (Selkoe & Toonen 2006). Mikrosateliti vezani za gene poznate funkcije mogu biti testirani na povezanost s fenotipskim varijacijama i nekim drugim biološkim funkcijama (Ayers i sur. 1997). Molekularni biljezi s nižim stopama mutacije mogu biti u velikoj mjeri nepromjenjivi i samo će mjesta s najvećom stopom mutacije biti informativna. Spori mutacijski procesi omogućavaju da zapisi događaja iz daleke prošlosti duže opstanu.

Zbog svoje jednostavne primjene i informativnosti te karakteristika kao što su: kodominantnost, pouzdanost, visoka razina ponovljivosti, polimorfnost, mikrosateliti se često koriste u proučavanju populacijske strukture (Abdul-Muneer, 2014). U usporedbi s biljezima kao što su alozimi, mikrosateliti su se nametnuli kao značajan biljeg u kvantifikaciji genetičkih varijacija unutar i između populacija (Abdul-Muneer i sur. 2009) što je vidljivo iz nekoliko znanstvenih radova u kojima su mikrosateliti primijenjeni u opisu populacijske strukture. U prošlom stoljeću, Bentzen i sur. (1996) su uz pomoć mikrosatelita opisali populacijsku strukturu bakalara, ukazujući na razliku između sjeverozapadnog i jugoistočnog stoka. Utjecaj razlike saliniteta na populacijsku strukturu atlanskog bakalara korištenjem mikrosatelitnih biljega opisali su Larsen i sur. (2012). Mikrosatelitni biljezi pokazali su se značajnima u opisu strukture komercijalno važnih vrsta, uključujući brojne akvakulturne vrste: bakalar, *Gadus morhua* (Glover i sur. 2011), losos, *Salmo salar* (Rengmark i sur. 2006; Portnoy i sur. 2014), lubin, *D. labrax* (García de Leon i sur. 1995; Šegvić-Bubić i sur. 2017), komarča, *S. aurata* (Šegvić-Bubić i sur. 2011b), šaran, *Cyprinus carpio* (Yue i sur. 2004; Cheng i sur. 2010), pastrva, *Salmo trutta* (Achrem i sur. 2015), tuna, *Thunnus albacares* i *Katsuwonus pelamis* (Takagi i sur. 2001; Menezes i sur. 2008), kao i u određivanju srodstva i evolucijskih odnosa među vrstama (Tong i sur., 2002; Liao i sur. 2006; Mendonça i sur.

2012), te razlikovanju geografski izoliranih podpopulacija (Jarne & Lagoda, 1996). U novije vrijeme su sve više korišteni mikrosatelitni biljezi u blizini kodirajućih regija gena, koji su se pokazali informativnima u opisu populacijske strukture tune u uzgoju (Radonić, 2019) kao i mikrosatelitni biljezi povezani s komercijalno važnim svojstvima kao što su performanse rasta i otpornost na bolest (Ariede i sur. 2018) s ciljem kreiranja učinkovitog uzgojnog programa.

1.5. Genetička raznolikost

Genetička raznolikost dio je ukupne biološke raznolikosti, a čine ju razlike u slijedu nukleotida u molekuli DNA. Temelj je evolucijskog razvoja jer viša razina raznolikosti omogućava bolju prilagodbu u promjenjivom okolišu, a njen gubitak utječe na smanjenje dugoročne prilagodljivosti vrste. Pri tome male varijacije mogu rezultirati različitim aminokiselinskim slijedom u proteinima za koje ti geni kodiraju (engl. *replacement polymorphism*), a taj slijed može utjecati na njihovu biokemijsku funkciju, odnosno može dovesti do morfoloških nejednakosti koje utječu na reprodukciju, ponašanje ili preživljavanje jedinki u populaciji. Genetička raznolikost jest raznolikost alela i genotipova prisutnih u istraživanoj skupini, bilo da se radi o populaciji, vrsti ili skupini vrsta (Frankham i sur. 2002). Poznate su dvije glavne vrste genetičke raznolikosti: neutralna i adaptivna. Neutralna raznolikost se analizira različitim molekularno-genetičkim laboratorijskim metodama gdje otkrivene varijante gena nemaju izravan učinak na sposobnost opstanka. Selektivno je neutralna i ne sugerira adaptivni ili evolucijski potencijal vrste ili populacije. Neutralna genetička raznolikost pogodna je za istraživanje procesa poput protoka gena, genetičkog otklona, mutacija i promjene alela. Adaptivna genetička raznolikost se analizira kvantitativnim genetičkim eksperimentima u kontroliranim i uniformnim uvjetima (Holderegger i sur. 2006).

Organizam za svaku osobinu nasljeđuje alele, po jedan od svakog roditelja. Homozigotne jedinke imaju identični par alela, dok heterozigotne imaju dva različita alela. Ukoliko na lokusu u istraživanoj skupini postoji više od jednog alela kažemo da je lokus polimorfan, uz uvjet da se najučestaliji alel pojavljuje s frekvencijom manjom od 0,99 ili 0,95. Ukoliko su svi pripadnici skupine homozigoti na istraživanom alelu kažemo da je lokus fiksiran. Genetička raznolikost nastaje kao posljedica mutacija (većina mutacija nastaje tijekom replikacije DNA) i rekombinacija. Smatra se da pri tome vrijede i neutralna i teorija selekcije, odnosno da dio raznolikosti nastaje kao posljedica nasumičnog procesa (polimorfizam nastaje slučajno i

zadržava se ili gubi slučajno), a dio kao posljedica prirodne selekcije mutacija koje doprinose sposobnosti preživljavanja (Freeland, 2005). Također, genetička raznolikost je ovisna o intenzitetu mutacija (broj novih mutacija po lokusu i po generaciji) i efektivnoj veličini populacije (N_E), odnosno o broju jedinki koje se razmnožavaju u populaciji. Stoga populacije male efektivne veličine uglavnom imaju i nisku razinu genetičke raznolikosti (Ellegren, 2009a; Ellegren, 2009b).

Genetička raznolikost je važna za sposobnost prilagodbe na promjenjive uvjete u okolišu i predstavlja evolucijski potencijal vrste. Određena je udjelom heterozigotnih lokusa ili alela po svakom lokusu (Hedrick, 2000). Na razini populacije, raznolikost se opisuje udjelom polimorfnih lokusa (P), prosječnim brojem alela po lokusu (N_A), efektivnim brojem alela po lokusu (Ne), očekivanom (He) i uočenom razinom heterozigotnosti (Ho), genskom (h) i nukleotidnom raznolikošću (π) (Nei, 1973; Lacy, 1997). Genetička raznolikost zapravo predstavlja sirovi materijal za evoluciju pod utjecajem prirodne selekcije, genetičkog otklona i migracija (Ellegren, 2009a). Gubitak genetičke raznolikosti povezan je sa smanjenom reprodukcijskom moći (engl. *reproductive fitness*), a dugoročno uzrokuje smanjenje ili čak gubitak evolucijskog potencijala neke populacije (Hansson & Westerberg 2002). Gore spomenuti izraz 'reprodukcijska moć' (engl. *reproductive fitness*) definira se kao broj plodnih potomaka jedinke koji prežive do reproduktivnog razdoblja (Frankham i sur. 2002).

Očuvanje genetičke raznolikosti je nužan uvjet populacijske stabilnosti s obzirom da je raznolikost povezana s obilježjima vezanima za sposobnost preživljavanja, kao što su rast i razvoj, plodnost, metabolička učinkovitost i otpornost na bolesti jedinke odnosno populacije (Allendorf & Leary 1986; Falconer & Mackay 1996). Za očekivati je da genetička raznolikost ovisi o veličini populacije na način da je veća u velikim brojnijim populacijama nego u malima. Genetička raznolikost je također pod utjecajem subpopulacijske strukturiranosti, migracija između subpopulacija i efektivne veličine populacije. Do gubitka genetičke raznolikosti najčešće dolazi kod malih, izoliranih populacija i populacija koje su prošle kroz razdoblje "uskog grla" (engl. *bottleneck*) (Laikre i sur. 1996; Crnokrak & Roff 1999; Allendorf 2002; Lucchini i sur. 2004). Pad brojnosti jedinki u populaciji dovodi do parenja u bliskom srodstvu ili srođivanja (engl. *inbreeding*). Takve populacije gube demografsku stabilnost, udio parenja u srodstvu sve više raste, a brojnost pada. Ova povratna sprega između pada brojnosti populacije i gubitka genetičke raznolikosti uslijed parenja u srodstvu predstavlja svojevrsni „vrtlog izumiranja“ (engl. *extinction vortex*) (Frankham i sur. 2002).

Većina ugroženih vrsta i populacija imaju nižu genetičku raznolikost nego populacije i vrste koje su brojne i nisu ugrožene.

U slučaju kada je populacija mala i izolirana, genetički problemi mogu postati značajni. Srođivanje (engl. *inbreeding*) uzrokuje gubitak heterozigotnosti i veće prisustvo štetnih alela (Fankham i sur. 2002). Smanjena reproduktivna snaga potomstva poznata je kao srodnička depresija (engl. *inbreeding depression*). Srodnička depresija je često izražena unutar blisko povezanih jedinki u velikoj populaciji. Rijetki recesivni aleli štetnog djelovanja mogu postojati kao heterozigoti, a križanjem u bliskom srodstvu nastaju homozigoti kod kojih se takva svojstva ispoljavaju i mogu biti vrlo štetna za potomstvo, iako u velikim populacijama obično imaju zanemarive učinke. U malim populacijama srođivanje je učestalije nego li u većim, ali štetni aleli su rijetki zbog djelovanja selekcije. Iako je pojava srođivanja u malim populacijama prisutna, utjecaj srodničke depresije na pojedine potomke je mala. Međutim, povećanje homozigotnosti recesivnih alela utjecat će na smanjenje sposobnosti opstanka novonastalih jedinki (Rowe i sur. 2017).

Nesrodnička depresija (engl. *outbreeding depression*) je smanjenje sposobnosti opstanka potomstva uslijed reprodukcije među partnerima koji nisu u srodstvu, nesrodinička reprodukcija (Pusey & Wolf 1996). Izmjena genetičkog materijala između jedinki koje su genetički udaljene rezultira unosom novih nenativnih alela kao i smanjenjem adaptivne sposobnosti novonastalih jedinki. Ciljajući poželjna svojstva u uzgoju, jedinke kroz generacijski slijed akumuliraju promjene u genetičkoj strukturi, što je popraćeno smanjenjem genetičke varijabilnosti potomaka. Križanje uzgojnih jedinki s lokalno-divljim populacijama može značajno utjecati na sposobnosti preživljavanja i reproduktivni uspjeh potomstva. Smanjenje sposobnosti preživljavanja i reproduktivni uspjeh novonastalih hibridnih jedinki zamijećen je kod populacija lososa (*Oncorhynchus tshawytscha*) i pastrve (*S. trutta*) (Fleming i sur. 2000; Gilk i sur. 2004; Tymchuk i sur. 2007). Kod divljih populacija lubina (*D. labrax*) u Jadranu uočen je značajan unos uzgojnih genotipova atlantskog podrijetla, što može dovesti do nesrodničke depresije i smanjenja prilagodljivosti populacija (Šegvić-Bubić i sur. 2017).

1.6. Pregled dosadašnjih istraživanja genetičke raznolikosti komarče

Genetička struktura komarče (*S. aurata*) do sada je proučavana molekularnim biljezima kao što su: alozimi (Alarcón i sur. 2004; Ben Slimen i sur. 2004; Rossi i sur. 2006), AFLP -

polimorfizam dužine umnoženih fragmenata (Miggiano i sur. 2005), mitohondrijska DNA - mtDNA (Alarcón i sur. 2004) i mikrosateliti (Alarcón i sur. 2004; De Innocentiis i sur. 2004; Miggiano i sur. 2005; Karaiskou i sur. 2009; Triantafyllidis i sur. 2007; Šegvić-Bubić i sur. 2011b).

U posljednja dva desetljeća niz znanstvenih istraživanja je usmjeren prema proučavanju genetičke raznolikosti i strukture populacija komarči u Sredozemnom moru (Rossi i sur. 2006; Franchini i sur. 2012; Šegvić-Bubić i sur. 2011b, 2014). Slaba genetička strukturiranost je uočena između atlantskih i sredozemnih populacija (Alarcón i sur. 2004; De Innocentiis i sur. 2004; Rossi i sur. 2006; Franchini i sur. 2012). Unutar dijelova Sredozemnog bazena uočena je značajna genetička subpodjela populacija koja pak nije uvjetovana geografskim i/ili oceanografskim barijerama (Alarcón i sur. 2004, Ben Slimen i sur. 2004). U recentnim istraživanjima heterogeni obrazac genotipova na ograničenoj prostornoj skali pripisuje se utjecaju prebjeglih jedinki iz akvakulture koje su prošle proces domestikacije i/ili selekcije, te su unesene iz geografski različitih područja (Franchini i sur. 2012; Šegvić-Bubić i sur. 2011b, 2014).

Osim uočene populacijske strukturiranosti na nižoj geografskoj skali, uočena je i značajna genetička varijabilnost populacija komarče s obzirom na obilježja staništa u kojoj jedinke obitavaju (lagune *vs*. priobalje *vs.* otvoreno more). Dok su neutralni biljezi ukazali na znatan protok gena između različitih staništa (laguna *vs* otvoreno more), kod populacija komarči iz zapadnog dijela Sredozemlja pojavljivanje specifičnih alela na mikrosatelitnim lokusima gena kandidata (hormon rasta (*GH*), prolaktin (PRL) i protein modifikacije aktivnosti receptora 3 (*RAMP3*)) u odnosu na stanište su ukazali na lokalnu adaptaciju jedinki na specifične uvjete okoliša (Chaoui i sur. 2012). Povezanost različite veličine alela i vrste staništa dokumentirana je i za druge vrste riba poput tilapije, *Oreochromis niloticus* (Streelman & Kocher 2002) i cipla, *Mugil cephalus* (Blel i sur. 2010).

Utjecaj prebjega iz akvakulture je također prepoznat kao jedan od razloga niske genetičke strukturiranosti populacija u Sredozemlju (Alarcón i sur. 2004, Rossi i sur. 2006; Franchini i sur. 2012). Prebjezi komarče iz kaveznog uzgoja podrijetlom iz raznolikih geografskih područja (Francuska, Italija) snažno utječu na promjenu genetičke izvornosti prirodnih populacija i na protok gena među populacijama (Šegvić-Bubić i sur. 2011b). Analizom genetičke udaljenosti uzgojnih i divljih populacija komarči u istočnom dijelu Jadrana nije utvrđena povezanost populacija s obzirom na njihovo geografsko podrijetlo što upućuje na postojanje znatnog protoka gena, pogotovo između populacije prirodnih komarči iz

Malostonskog zaljeva i delte rijeke Neretve, te populacije iz uzgoja s područja poluotoka Kleka (Šegvić-Bubić i sur. 2011b). Bayesovom klaster analizom su prepoznati uzgojni genotipovi u prirodnim populacijama lubina i komarče s udjelima od 13-14 % za Jadran (Šegvić-Bubić i sur. 2011b, 2017) što se podudara s rezultatima istraživanja populacija lubina na Cipru (Brown i sur. 2015).

Osim izrazitog povećanja brojnosti divlje komarče u istočnom dijelu Sredozemnog mora (Dimitriou i sur. 2007; Glamuzina i sur. 2014), utvrđene su prilično stabilne populacije komarče i na sjevernim marginama areala njene rasprostranjenosti, uključivo obale Velike Britanije i sjeverne obale Francuske, a što se dovodi u vezu s povišenjem prosječne temperature mora (Coscia i sur. 2012; Avignon i sur. 2017). Utjecaj klimatskih promjena na brojnost i migraciju pojedinih vrsta je već prepoznat (Brierley & Kingsford 2009; Johnson & Welch, 2010), a ključnu ulogu u distribuciji vrste ima njena sposobnost prilagodbe na nova staništa (Kawecki, 2008). S obzirom na brzi odgovor komarče kroz trofičku prilagodbu na prevladavajuće uvjete novih staništa (Avignon i sur. 2017), buduća istraživanja bi se trebala usmjeriti prema razumijevanju međusobnog djelovanja selektivnih i neutralnih evolucijskih sila koje oblikuju divergencijski obrazac populacija u novim heterogenim sredinama (Coscia i sur. 2012).

1.7. Ciljevi i hipoteze istraživanja

Genetička raznolikost i struktura prirodnih populacija komarči u istočnom dijelu Jadranskog mora još uvijek nisu dovoljno istraženi. Prethodna znanstvena istraživanja, premda temeljena na oskudnom broju ispitivanih populacija i molekularnih biljega, upućuju na genetički utjecaj akvakulture na izvornost prirodnih populacija komarči (Šegvić-Bubić i sur. 2011b, 2014). Uvažavajući ekspanziju broja komarči u prirodnim staništima, kao i trend povećanja akvakulturne proizvodnje, ukazuje se potreba za sveobuhvatnim istraživanjima genetičke raznolikosti i strukture divljih i uzgojnih populacija, kao i možebitnog unosa uzgojnog genofonda u morski okoliš. Prednje su neophodne pretpostavke za očuvanje prirodne bioraznolikosti i razvoja strategije upravljanja ribljim prebjezima iz akvakulture.

Kako bi se utvrdila raznolikost i genetička struktura u predmetnom radu istraživane su prirodne populacije komarči iz sjevernog, srednjeg i južnog Jadrana, uključujući odrasle spolno zrele jedinke (roditeljska F0 generacija) te netom metamorfozirane jedinke (potomci

F1 generacija) korištenjem 24 mikrosatelitna lokusa. U istraživanju su uključene i uzgojne populacije s različitih uzgojnih lokacija duž Jadrana s obzirom da unos novih nenativnih alela putem prebjega, koji su često u istočnom dijelu Jadrana različitog geografskog podrijetla (talijanskog, francuskog i grčkog), može značajno utjecati na već adaptirane lokalne genotipove.

Uporaba molekularnih biljega pri identifikaciji prebjeglih komarči iz uzgoja, kao i hibrida uzgojnih i divljih jedinki, predstavlja znanstveni izazov. U pitanju je niz čimbenika koji uvjetuju uspješnost prepoznavanja prebjega od kojih je posebno važno izdvojiti sljedeće: (i) matičnjaci komarče u uzgoju su tek nekoliko generacija pod selekcijskim pritiskom na određeno fenotipsko svojstvo (Gjedrem i sur. 2012), te diferencijacija genotipova još nije nužno izražena, (ii) značajan disperzijski kapacitet vrste omogućava visoku stopu migracije između subpopulacija što rezultira velikom efektivnom veličinom populacija i niskom strukturiranošću, i naposljetku, (iii) nedostatak povijesnih uzoraka prije intenzivne marikulture onemogućava procjenu nultog stanja populacijske raznolikosti.

Razvoj alata za uspješnu identifikaciju podrijetla jedinki je nužan korak u pravcu uspostave odgovarajuće strategije upravljanja prebjezima i smanjenja potencijalnog utjecaja prebjega na prirodne populacije. Dosadašnje tehnike za raspoznavanje uzgojnog i divljeg podrijetla komarči i lubina su uključivale usporedbu morfoloških karakteristika tijela, ljuski i otolita, zatim profila masnih kiselina, sastava i koncentracije elemenata u tragovima (Arechavala-Lopez i sur. 2013a). Međutim, gore navedene tehnike nisu pokazale visoku preciznost u diskriminaciji podrijetla jedinki u odnosu na rezolucije pripadnosti koju omogućavaju molekularni biljezi (Arechavala-Lopez i sur. 2013a; Šegvić-Bubić i sur. 2014). Stoga, specifični genetički biljezi i uspostava višelokusne genetičke baze divljih i uzgojnih jedinki su neophodni preduvjeti za uspješnu identifikaciju prebjega, a što je vidljivo iz prakse sjevernoeuropskih zemalja.

Sukladno rečenom, postavljeni su sljedeći istraživački podciljevi:

1. Uzgojnim i prirodnim populacijama komarče odrediti polimorfnost dvadeset i jednog neutralnog mikrosatelitnog lokusa (Lee Montero i sur. 2013), te tri lokusa smještena u promotorskim i kontrolnim regijama gena kandidata, *GH*-hormon rasta (Almuly i sur. 2005), *PRL*-prolaktin (Astola i sur. 2003) te *RAMP3*- protein modifikacije aktivnosti receptora 3 (Launey i sur. 2003).

2. Neutralnim i kodirajućim mikrosatelitnim lokusima utvrditi prosječan i efektivan broj alela po lokusu, kao i frekvencije alela u populacijama.
3. Odrediti osnovne parametre intra- i interpopulacijske varijabilnosti: heterozigotnost i odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, polimorfnost, Wrightov fiksacijski indeks te genetičku udaljenost.
4. Provesti test pozitivne selekcije na trima lokusima gena kandidata koja su u uzgojnim populacijama pod izravnim djelovanjem selekcije na željena svojstva, kako bi se dobio uvid u postojanje/nepostojanje neutralnog evolucijskog obrasca na analiziranim lokusima.
5. Testirati i grafički vizualizirati pripadnost jedinki genetički sličnim subpopulacijama (klasterima) na osnovi varijabilnosti frekvencija alela neutralnih i kodirajućih lokusa, te odrediti najvjerodostojniji broj izvornih genetičkih skupova.
6. Usporediti udjele pridruženih jedinki genetički sličnim subopulacijama s obzirom na korišteni molekularni biljeg (neutralni *vs*. kodirajući), kao i uspješnost klasteriranja jedinki s obzirom na uzgojno/divlje podrijetlo i uzgojno geografsko podrijetlo.
7. Kvantificirati udio uzgojnog genotipa u prirodnim populacijama kroz identifikaciju prebjega i hibridnih potomaka.
8. Pridružiti morfološka svojstva oblika tijela svake jedinke višelokusnim genotipovima, te metodom unakrsne validacije na združenim podacima testirati pripadnost svake jedinke iz istraživanih populacija, te valorizirati rezoluciju klasifikacijskog testa s pridruženim fenotipskim svojstvom jedinke.
9. Analizirati uzgojna područja kao potencijalna mrijestilišta komarče korištenjem modela ROMS-ICHTHYOP koji simulira horizontalni transport ihtioplanktona.
10. Uspostaviti bazu višelokusnih genotipova prirodnih i uzgojnih populacija s ciljem zaštite i očuvanja genofonda.

Hipoteze ovog istraživanja su:

- Nije utvrđena polimorfnost dvadeset jednog neutralnog mikrosatelitnog lokusa (Lee Montero i sur. 2013) te tri lokusa povezana s genima kandidatima (*GH*-hormon rasta, *PRL*-prolaktin, *RAMP3*-protein modifikacije aktivnosti receptora 3).
- Populacije komarče odstupaju značajno od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

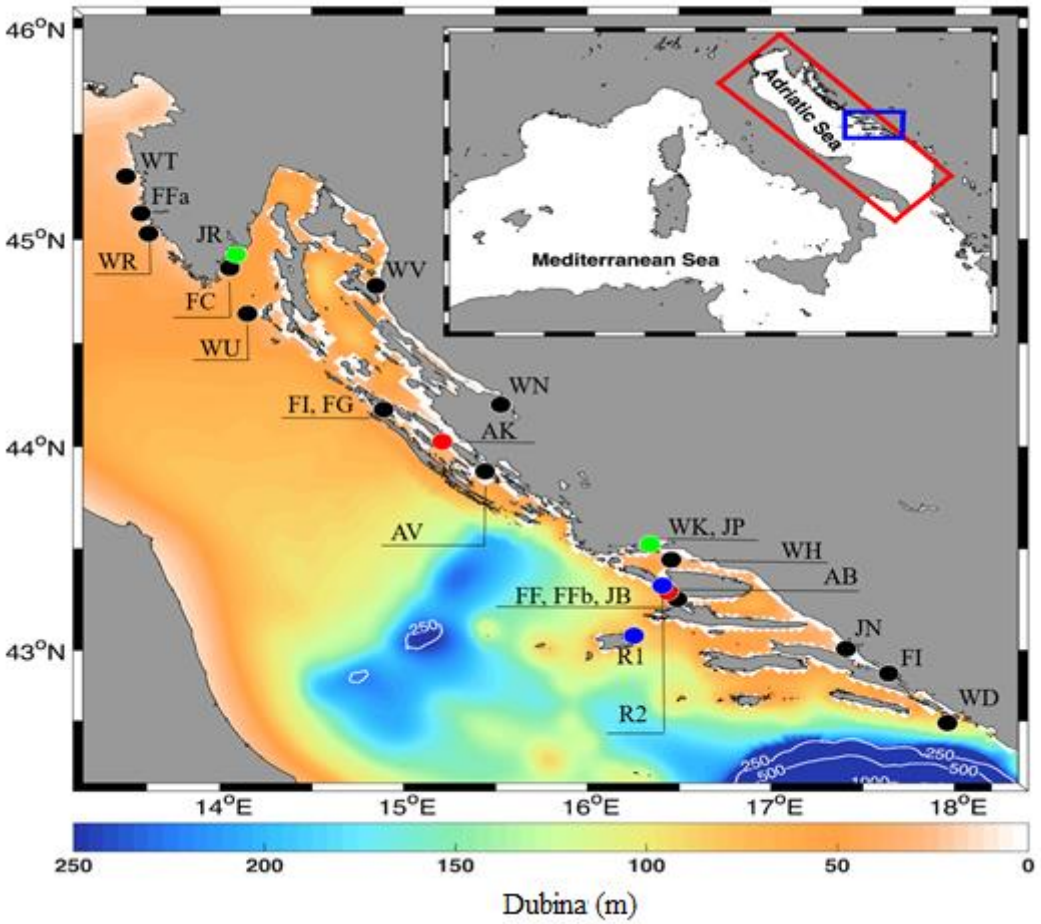
- Nije uočen neutralni evolucijski obrazac na trima lokusima gena kandidata, koji su u uzgojnim populacijama pod izravnim djelovanjem selekcije na željena svojstva.
- Nema strukturiranosti unutar i između uzorkovanih populacija komarči različitog podrijetla primjenom Bayesove klaster analize te je posljedično nemoguće identificirati prebjege i hibride.
- Nije utvrđena pripadnost jedinki istraživanim populacijama metodom unakrsne validacije gdje su morfološka svojstva pridružena višelokusnim genotipovima.
- Model ROMS-ICHTHYOP nije utvrdio mogućnost da neka područja u kojima se odvija kavezni uzgoj riba predstavljaju potencijalna područja u kojima se komarče mrijeste.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Područje istraživanja

Za potrebe predmetnog istraživanja sakupljeno je 1 586 jedinki komarče (*S. aurata*) na 22 lokacije u razdoblju od 2009. do 2017. godine. Istraživanje je obuhvatilo: (a) prirodne populacije (2-3 godine starosti, dužine 16-22 cm) uzorkovane 2015. i 2016. godine na sedam lokacija duž istočne obale Jadrana; (b) uzgajališno povezane jedinke na područjima u kojima se odvija kavezni uzgoj tune i bijele ribe (otok Ugljan i otok Brač) u razdoblju tri uzastopne godine (2015., 2016., 2017.); (c) juvenilne jedinke (2,9 do 4,5 cm) u razvojnoj fazi nakon metamorfoze, uzorkovane 2015. i 2016. godine na području estuarija Neretve, Pantane te ušća rijeka Raše i jedna populacija uzorkovana u blizini uzgajališta bijele ribe (lubina i komarče). S ciljem dobivanja što boljeg uvida u stanje populacija te potencijalnog utjecaja prebjega na prirodne populacije u istraživanju su uključene i uzgojne populacije iz različitih uzgajališta duž istočne obale Jadrana, različitog geografskog podrijetla (talijanskog, francuskog i grčkog). Uzgajališta uključena u ovo istraživanje su aktivna, s godišnjom proizvodnjom oko 100 tona ribe. Povijesni uzorci komarče koji su prikupljeni u Bračkom kanalu 2009. godine (Šegvić-Bubić i sur. 2011b) su također bili uključeni u predmetno istraživanje.

Lokacije uzorkovanja prikazane su na Slici 2.1.1., dok su podaci o broju jedinki po lokaciji te koordinate lokacija i skraćene oznake za svaku pojedinu lokaciju navedeni u Tablici 2.1.1. Prikupljanje biološkog materijala provedeno je u suradnji s lokalnim ribarima i uzgajivačima. Tijekom uzorkovanja su prikupljeni podaci o ukupnoj duljini (cm) i masi (g) jedinki, a fragment prsne peraje je izuzet i pohranjen u 96 postotnom etanolu za potrebe genetičke analize. Ovisno o lokaciji, veličina uzorka kretala se od 19 do 124 jedinke.



Slika 2.1.1. Područja prikupljanja komarči, *S. aurata* (WH, Brački kanal; WT, Tarski zaljev; WN, Novigradsko more; WR, Rovinj; WU, Unije; WV, Velebitski kanal; WK, Kaštela WD, Dubrovnik), područja uzorkovanja mlađi (YOY) (JP, Rijeka Pantana; JN, Rijeka Neretva; JR, Rijeka Raša; JB, Uvala Maslinova), uzgajališno povezane populacije (AK, Mrđina; AB, Uvala Maslinova; AV, Vrgada) i uzgojne populacije (FC, Uvala Budava; FF-FFb, Uvala Maslinova; FI, Mali Ston; FI-FG, Lamljana; FFa, Lim). Uzgajališta tuna (crvene oznake) i rastilišta (zelene oznake) su uključena u simulaciju prostorne distribucije čestica. Plave oznake predstavljaju lokacije radara (R1, R2). U desnom kutu u plavom kvadratu na karti Mediterana ucrtano je područje domene modela ASHELF2 ROMS, a u crvenom kvadratu ucrtano je područje Adriatic ROMS domene.

Tablica 2.1.1. Podatci o uzorcima komarče, *S. aurata* uključeni u istraživanje (lokacija uzorkovanja, broj uzoraka, period uzorkovanja, podrijetlo i odgovarajuće geografske koordinate lokacija uzorkovanja) koji su genetički testirani s dvije vrste biljega: 21 neutralnim mikrosatelitnim biljegom (SSR) i 3 mikrosatelita povezana s tri gena kandidata (cgSSR) (W; divlje, WA; divlje uzgajališno povezane, F; uzgojne populacije: CRO-hrvatsko, ITA-talijansko, FRA- francusko, GRE-grčko podrijetlo; * mlađ uzorkovana u blizini uzgajališta).

Lokacija	Broj uzoraka		Period uzorkovanja	Populacijske oznake	Podrijetlo	Širina	Dužina
	SSR	cgSSR					
Divlji adulti							
Brački kanal	41		2009	09WH	W	43,4067	16,4036
Tarski zaljev	80	40	Srpanj, 2015	15WT	W	45,3130	13,6028
Novigrad	90		Srpanj, 2015	15WN	W	44,2030	15,5287
Rovinj	89		Veljača, 2016	16WR	W	45,0406	13,6493
Unije	47		Veljača, 2016	16WU	W	44,6382	14,2217
Velebitski kanal	86	38	Veljača, 2016	16WV	W	44,7766	14,8508
Kaštela	29		Veljača, 2016	16WK	W	43,5228	16,3418
Dubrovnik	19		Veljača, 2016	16WD	W	42.6362	17,9932
Mlađ							
Pantana	124	48	Svibanj, 2015	15JP	W	43,5228	16,3418
Neretva	71	39	Svibanj, 2015	15JN	W	43,0522	17,4343
Pantana	25		Svibanj, 2016	16JP	W	43,5228	16,3418
Raša	34		Svibanj, 2016	16JR	W	45,0318	14,0469
Maslinova*	30		Lipanj, 2016	16JB *	W	43,2963	16,4663
Divlje- uzgojno povezane							
Mrđina	56	32	Veljača, 2015	15AK	WA	44,1794	14,8908
Maslinova	44	26	Veljača, 2015	15AB	WA	43,3007	16,4447
Vrgada	21		Veljača, 2015	15AV	WA	43,8789	15,4430
Mrđina	50		Veljača, 2016	16AK	WA	44,1794	14,8908
Maslinova	46		Veljača, 2016	16AB	WA	43,3007	16,4447
Mrđina	60		Veljača, 2017	17AK	WA	44,1794	14,8908
Maslinova	70		Veljača, 2017	17AB	WA	43,3007	16,4447
Uzgojne							
Budava	96	16	Veljača, 2015	15FC	F-CRO	44,8907	13,9981
Maslinova	97	36	Ožujak, 2015	15FF	F-FRA	43,2963	16,4663
Mali Ston	57		Ožujak, 2015	15FI	F-ITA	42,8854	17,6406
Lamljana	71		Ožujak, 2016	16FI	F-ITA	45,1321	15,2101
Lamljana	15		Ožujak, 2016	16FG	F-GRE	45,1321	15,2101
Lim	59		Travanj, 2016	16FFa	F-FRA	45,1321	13,6728
Maslinova	79	23	Veljača, 2016	16FFb	F-FRA	43,2963	16,4663
Ukupno	1586	298					

2.2. Izolacija DNA i priprema uzoraka

Genomska DNA izolirana je pomoću alkalne lize tkiva uz dodatak Proteinaze K (koncentracije 20 mg/ml; Thermo Fisher Scientific, SAD) te izdvajanjem DNA izopropanolom (Laird i sur. 1991). Prvi korak u postupku je uključivao odsijecanje manjeg dijela pohranjene peraje i potom ispiranje od alkohola destiliranom vodom. Izrezani dio tkiva ostavljen je preko noći u 200 µl lizirajućeg pufera (engl. *lysis buffer*) (2 ml 1 M Tris-HCl, 4 ml 0,5 M EDTA, 6 ml 5M NaCl, 4 ml 10 % SDS i 184 ml H_20) i 4 µl proteinaze K. Uslijedila je inkubacija u termomikseru preko noći na 55°C dok se tkivo potpuno nije razgradilo. Nakon inkubacije lizirani uzorak je kratko izmiješan te je smjesa centrifugirana (12 000 okretaja/min, 10 min). Supernatant je otpipetiran u nove sterilne plastične epruvete pazeći da se ne uzme talog, zatim je dodano 200 µL izopropanola. Smjesa je dobro promiješana, te ponovo centrifugirana 10 minuta na 13 000 okretaja/min kako bi se DNA istaložila. Izopropanol je pažljivo izliven/izlit iz epruvete, a talog s DNA je ispran s 500 µL 70 % etanola. Smjesa u tubicama je pažljivo promiješana, ručno okrenuta 2 do 3 puta, te ponovo centrifugirana 10 minuta na 13 000 okretaja/min. Konačno je cijeli etanol uklonjen, a tubica okrenuta naopačke i ostavljena da se suši od 30 minuta do sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, talog DNA je otopljen u 20-40 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), ovisno o njegovoj veličini. Izolati su ostavljeni preko noći na 4ºC radi otapanja DNA.

Prije skladištenja DNA do daljnje uporabe, koncentracija izolirane DNA izmjerena je spektrofotometrom (Implen NanoPhotometer N50-Touch). Čistoća je određena temeljem omjera valnih duljina 260/280 nm koji upućuje na kontaminaciju proteinima, a idealne vrijednosti su od 1,8 do 2,0. Vrijednosti manje od 1,8 ukazuju na kontaminaciju proteinima ili fenolima, a vrijednosti veće od 2,0 na kontaminaciju s RNA. Nadalje, određen je omjer 260/230 nm koji poprima vrijednosti >1,8 za čistu DNA, a ako to nije slučaj, upućuje na prisutnost kontaminirajućih spojeva kao što su proteini, polifenoli, ugljikohidrati. Za svaki uzorak je pripravljena radna koncentracija (15-20 ng/µl) potrebna za PCR reakciju. Razrjeđenja su napravljena tako da je iz izvorne epruvete uzet određeni volumen uzorka, izračunat prema formuli ((a*b)/c) koji se prebacio u novu sterilnu plastičnu epruvetu u koju je dodan izračunati volumen miliQ vode, a sve prema formuli (b-((a*b)/c))[9]. Uzorci su potom spremljeni na -20 ºC do daljnje uporabe.

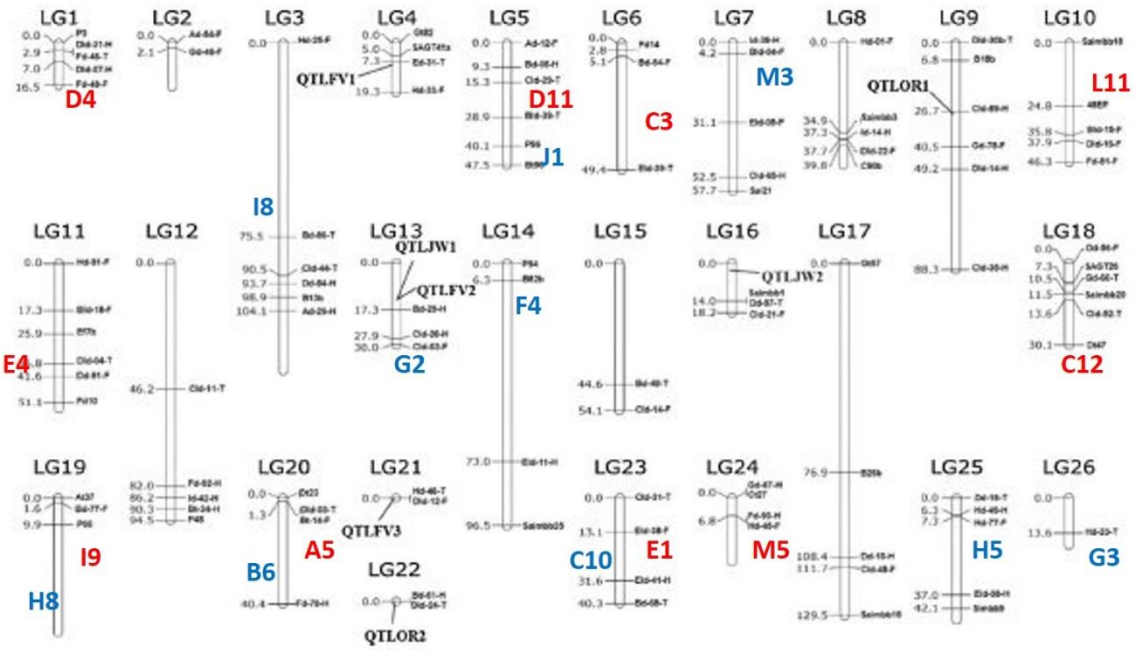
[9] a - željena koncentracija uzorka, b - volumen miliQ vode kojom se uzorak razrjeđuje, c - početna koncentracija uzorka.

2.3. Genotipizacija mikrosatelitnih biljega

2.3.1. Izbor mikrosatelitnih biljega

U ovom istraživanju korištena su 24 para mikrosatelitnih početnica specifičnih za ciljanu vrstu, od čega je 21 par neutralnih mikrosatelitnih lokusa dizajniran i optimiziran prema Le Montero i sur. (2013), te 3 mikrosatelitna lokusa povezana s genima kandidatima, odnosno hormonom rasta; *GH* (Almuly i sur. 2005), prolaktinom; *PRL* (Astola i sur. 2003) i protein modifikacije aktivnosti receptora 3; RAMP3 (Launey i sur. 2003).

21 neutralni mikrosatelitni biljeg. U predmetnom istraživanju genotipizacija svih uzoraka DNA vršila se pomoću neutralnih mikrosatelitnih biljega, primjenom začetnica specifičnih za ciljanu vrstu, podijeljenih u dvije multiplex PCR reakcije. Prva multiplex (SMsa1)[10] reakcija obuhvaća 11 mikrosatelitnih biljega (E1, C3, D4, D11, C12, I9, E4, A5, M5 i L11), a druga reakcija (SMsa2) 10 mikrosatelitnih biljega (J1, G2, G3, M3, H8, I8, L7, H5, B6, F4 i C10). Korišteni lokusi poznatog su položaja na kromosomima komarče i prikazani su na Slici 2.3.1.1.

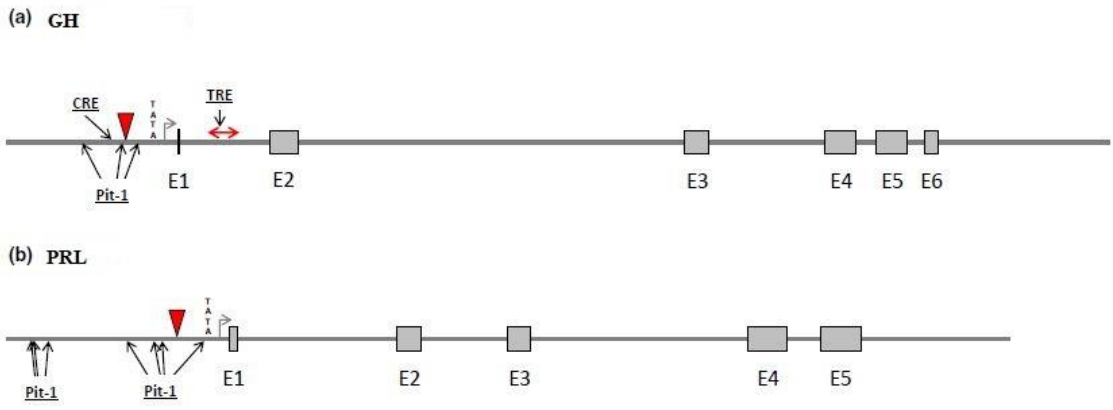


Slika 2.3.1.1. Genetička mapa komarče i položaj korištenih lokusa. Crvenom bojom su označeni lokusi koji pripadaju prvoj multiplex reakciji, *SMsa1*, a plavom bojom su označeni lokusi koji pripadaju drugoj multiplex reakciji, *SMsa2*. Izvor: Negrín-Báez i sur. 2015.

[10] *Super Multiplex Sparus aurata.*

Mikrosatelitni biljezi povezani s genima kandidatima. Višelokusna genotipizacija podskupa uzoraka DNA vršila se pomoću multipleksa cgSSR koji obuhvaća 3 mikrosatelitna biljega povezana s genima kandidatima (*GH, PRL* i *RAMP3*).

Hormon rasta (GH) i prolaktin (PRL) pripadaju obitelji strukturno srodnih polipeptidnih hormona u riba (Astola i sur. 2003). Spomenuti mikrosateliti se nalaze u promotornim regijama gena hormona rasta i prolaktina (Slika 2.3.1.2.). Promjena dužine mikrosatelita unutar promotora može utjecati na regulaciju transkripcijske aktivnosti i ekspresiju gena. U promotorskoj regiji hormona rasta je prepoznato nekoliko mikrosatelita od kojih dinukleotidni mikrosatelit pokazuje polimorfizam kod uzgojnih jedinki (aleli 250 i 254) povezan s performansama rasta ribe. Stoga se mikrosatelit *GH* može smatrati biljegom gena kandidata i koristiti pri upravljanju matičnjacima i u selekcijskim programima komarče.



Slika 2.3.1.2. Shematski prikaz strukture dvaju gena kandidata: (a) hormona rasta (*GH*, Almuly i sur. 2005) i (b) prolaktina (*PRL*, Astola i sur. 2003). Egzoni su označeni osjenčanim okvirima, mjesta vezivanja faktora transkripcije (CRE, TRE i Pit-1) označena su okomitim strelicama, dva mikrosatelita prikazana su trokutima, a vodoravna strelica prikazuje polimorfni minisatelit u prvom intronu gena GH, koji je uključen u represiju genske aktivnosti (Almuly i sur. 2008). Izvor slike: Chaoui i sur. 2012.

Kod kralježnjaka, prolaktin je svestrani hormon koji je uključen u mnoge fiziološke procese kao što su rast, metabolizam, osmoregulacija i reprodukcija (Hirano, 1987). U riba, glavna funkcija prolaktina povezana je s osmoregulacijom, sprječavajući gubitak iona i unos vode (Manzon, 2002). Riblja mlađ je izložena različitim selektivnim pritiscima tijekom

novačenja što utječe na frekvenciju lokalno adaptiranih alela u ranom životnom ciklusu kad je izložena najvišem stupnju smrtnosti (Hellberg i sur. 2002; Planes & Romans 2004). Razlike u frekvenciji alela na lokusima *GH* i *PRL* uočene su u populacijama mlađi iz različitih staništa, laguna *vs* otvoreno more (Chaoui i sur. 2012). Stoga se mikrosatelit *PRL* može smatrati biljegom gena kandidata i koristiti pri razlučivanju genetičkih razlika između populacija komarči različitog podrijetla.

Mikrosatelitne početnice. Početnice koje se vežu na 5` kraju lanca DNA označene su s F (*forward*), a R (*reverse*) označuje početnice koje se vežu na 3` kraju lanca. S različitim fluorescentnim bojama označen je po jedan član svakog para početnica, pri čemu su korištene plava (FAM), zelena (VIC), crna (NED) i crvena (PET) boja (Tablica 2.3.1.1.). Fluorescentno označene početnice su korištene kako bi se raspoznavali PCR produkti iste veličine. Svojstva parova početnica mikrosatelitnih lokusa prikazana su u Tablici 2.3.1.1. Sve početnice su otapane u TE puferu (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) kako bi se dobila otopina koncentracije 100 μM, te su čuvane na - 20° C. U sljedećem koraku, izrađena je radna otopina svih početnica u kojoj je koncentracija svake iznosila 2 μM (engl. *primer mix*) koja je dalje korištena za pripremu PCR reakcija.

Tablica 2.3.1.1. Opis istraživanih mikrosatelitnih lokusa, fluorescentne boje i kombinacija početnica u tri multiplex PCR reakcije (SMsa1, SMsa2, cgSSR), broj alela, ponavljajući motiv i izvor za svaki mikrosatelitni biljeg.

Multiplex PCR	Ime biljega	Lokus	Uzvodna i nizvodna početnica	Boja	Motiv	Raspon (bp)	Broj alela	Izvor
SMsa1	E1	Bd-68-T	F: AGGGGCGTTTCAGGTTCT R: gtttAGGTGAGTCCGTCAATCAGTGTAT	6-FAM	Di	72–90	13	Lee Montero i sur. 2013
	C3	EId-39-T	F: GAACTGTGTGAGAGAGGACAGTTG R: GAAGGAAAAATTCTGATTGGAGTTC	6-FAM	Di	104–164	43	Lee Montero i sur. 2013
	D4	P3	F: GAGGGGACACGTAAATTTGG R: gtttAACAACAGTCAAATGCTGAGTTGT	6-FAM	Di	171–207	23	Lee Montero i sur. 2013
	D11	CId-29-T	F: GCTCAGCACTACTTTAGTGTTTTGG R: gttCTGCAGGGAGGAAACAAGAC	VIC	Di	76–92	14	Lee Montero i sur. 2013
	C12	Dt47	F: TGCCTCTCTTTCACTCACTTCTC R: GCACATTGCTCCACACAGAG	VIC	Di	121–137	10	Lee Montero i sur. 2013
	I9	At37	F: GGTTAGGGTAATCAGAAATGCAATG R: gtttCTTCTCCAGTCACGATCAATAAAG	VIC	Tetra	142–178	11	Lee Montero i sur. 2013
	E4	BId-18-F	F: AGTGATGCGCTCTGGGTTTTA R: GTCTCTCAGCCTTTGAAGTGTTATC	NED	Di	64–92	26	Lee Montero i sur. 2013
	A5	Bt-14-F	F: AGCCGAGTACTTCTACTCCTCTGAT R: gtttAGTGAGGGCGGACAGATAAAG	NED	Di	106–112	8	Lee Montero i sur. 2013
	M5	Ct27	F: GAGACAGAGAGGAAGAAAAAGGATT R: gtttCAATGCTACAAGCTGCCTCAG	NED	Tetra	128–232	48	Lee Montero i sur. 2013
	L11	DId-16-F	F: GTTGTAGATCGGAGTGTGATAACG R: gttTGCTCCGAGTAAGCCATATGTA	PET	Di	103–113	9	Lee Montero i sur. 2013
SMsa2	J1	P96	F: CGCAATTAGAAGTAGGAGACTGG R: gttTGCCAGATGCAGGATGTAAG	6-FAM	Di	76–102	29	Lee Montero i sur. 2013
	G2	CId-03-F	F: ATGACTAAACATCACGTTCATGGAT R: gtttAGCTCATGGCTAACTGTGTACTTTT	6-FAM	Di	113–137	24	Lee Montero i sur. 2013
	G3	Hd-23-T	F: TCTAACTTTCTTTGAGGTCCCTCTT R: GAGGACAAGCTGAAGTACGAGTC	6-FAM	Di	150–170	12	Lee Montero i sur. 2013
	M3	BId-04-F	F: GATCTCATTATGACGGATCATTAGC R: gtttATCTTTGTCCGCATGTTTCAC	VIC	Di	83–95		Lee Montero i sur. 2013
	H8	P60	F: ATGCTGACATAACACAATGTAGCTC	VIC	Di	108–116		Lee Montero i

			R: GAGAAGTGAGGGGATACCTGAG					sur. 2013
	I8	B13b	F: ATGACAGTGTTTGAGCTCAGTGTTA R: gtttCCTGCATTCCAGCTTCAGAT	VIC	Di	128–144	33	Lee Montero i sur. 2013
	L7	Dd-57-T	F: ATCATTGTTCAGATAATGGGACAC R: gtTTCAAAATCTTTTGGTCTGTGC	NED	Di	76–80	6	Lee Montero i sur. 2013
	H5	Hd-15-H	F: CTCTCTCATGCGCACTTTCTT R: gtttCACTCCCTCTGATTTATGAGATGAT	NED	Di	91–123	23	Lee Montero i sur. 2013
	B6	Dt23	F: ACACAACACACGATTACAGCAGA R: gttTCCATGTGAGATGTCACTCTATTTC	NED	Tetra	140–208	22	Lee Montero i sur. 2013
	F4	P54	F: TGTCTCTCTATTGTCCTCTCTCCTC R: gttTGCACCTACAGCGGCATC	PET	Di	66–90	13	Lee Montero i sur. 2013
	C10	EId-38-F	F: TCTGAATAAAACATTGTCTGCAGTG R: gtttCTCAGACGGAGTATTTTTGGAACA	PET	Di	127–161	48	Lee Montero i sur. 2013
cgSSR	PRL		F: GAAGAGTTTGCTTCCATTGG R: CATCCATCCAATTAAGATGG	6-FAM	Di	310-360	21	Astola i sur. 2003
	GH		F: CCTTAAATCAGTTCAGCCG R: GGTTCAAGTTCTGGTGACTAG	VIC	Di	250-270	17	Almuly i sur. 2005
	RA MP3		F: TGTTGGAGCTTGTTGGTACAC R: GAGCTGTAAACCGCTCAGG	NED	Di	150-160	10	Launey i sur. 2003

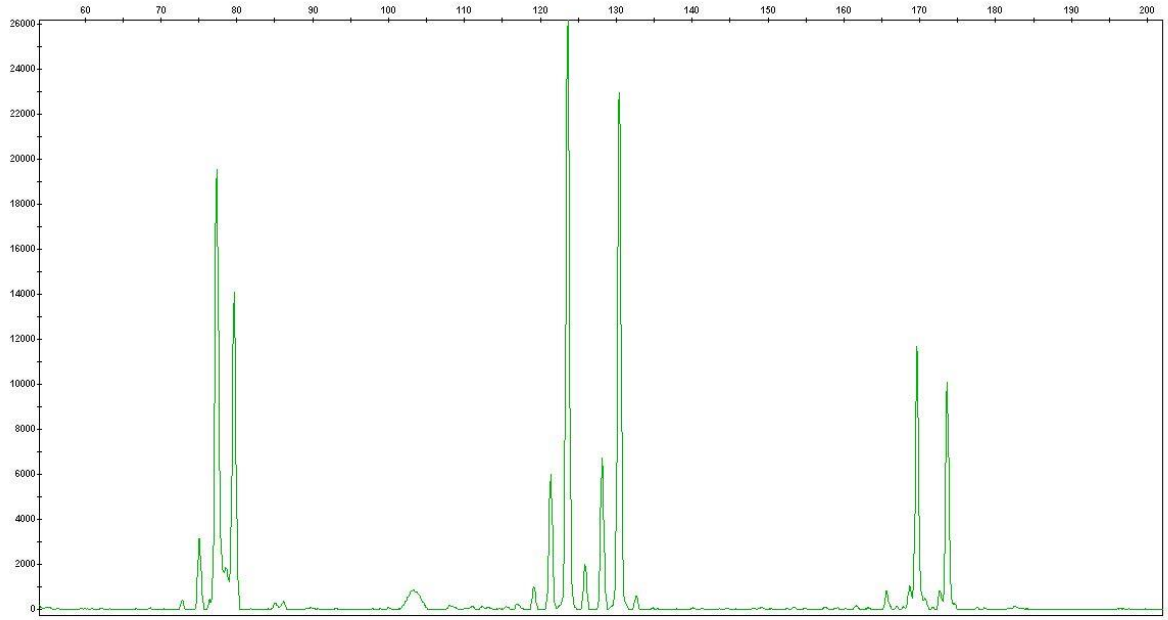
2.3.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) umnoženi su gore navedeni lokusi (Tablica 2.3.2.1.) u uređaju Eppendorf Master Cycler Nexus GX2, korištenjem Multiplex PCR kita (Qiagen). PCR reakcija za neutralne i kodirajuće biljege postavljena je prema sljedećim koracima: 5-minutna denaturacija na 95°C, zatim 27 ciklusa denaturacije na 95°C 30 s, temperatura prianjanja začetnica postavljena je na 60°C u trajanju od 1,5 min i produljenje na 72°C u trajanju od 30 s. Završno produljenje postavljeno je na 60°C u trajanju od 30 min.

Tablica 2.3.2.1. Sastav PCR reakcijske smjese.

Sastavnice	Volumen/reakcija	Finalna koncentracija
Type-it Mix	5 µl	3 mM $MgCl_2$
Primer Mix	1 µl	0,2 µM svake početnice
Voda oslobođena RNase	3 µl	_
DNA	1 µl	15 ng
Ukupni volumen reakcije	10 µl	

Dobiveni PCR produkti poslani su u servis za sekvenciranje (Macrogen), te su analizirani kapilarnom elektroforezom uz pomoć automatskog sekvencera ABI33730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) koji zahtijeva fluorescentno označene začetnice. PCR produktima je dodan dužinski standard GS500-Liz (Applied Biosystems) i označen narančastom (LIZ) bojom. Određivanje mikrosatelitnih alela provodilo se pomoću softverskog paketa GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems), pri čemu je svaki uzorak pregledan od dvije osobe kako bi se otklonile potencijalne pogreške prilikom očitavanja (Slika 2.3.2.1.).



Slika 2.3.2.1. Detektirani fragmenti lokusa D11, C12, i I9 u *GeneMapper 4.0* softverskom paketu nakon elektroforeze u ABI Prism 33730 genetičkom analizatoru. Izvor fotografije: Iva Žužul Vrgoč.

2.4. Statistička obrada podataka

2.4.1. Genetička raznolikost

Računalnim programom Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout i sur. 2004) ispitano je postojanje nul-alela, a u slučaju značajnog rezultata, procijenjena je učestalost pojavljivanja unutar populacija. Dodatna provjera prisutnosti i učestalosti nul-alela procijenjena je korištenjem računalnog programa FreeNA (Chapuis & Estoup 2007), pomoću algoritma očekivanja i maksimizacije (engl. *Expectation-Maximization Algorithm*) s postavkama od 95 % pouzdanosti (CI) i 50 000 ponavljanja. Program primjenjuje metodu korekcije ENA (engl. *Excluding Null Alleles*) za učinkovito ispravljanje pozitivne pristranosti uzrokovane prisutnošću nul-alela u procjeni genetičke udaljenosti između populacija (F_{ST} test).

Udio uspješno umnoženih uzoraka po lokusu i populaciji testiran je u Adegenet paketu (v.1.3-0) (Jombart i sur. 2010) za R softver. Analiza lokusa koji su potencijalno pod pozitivnom ili neutralnom selekcijom izvršena je pomoću Lositan programa (Antao i sur. 2008) korištenjem razlika u frekvenciji alela između populacija.

Procjena odstupanja genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE) kao i neravnoteža vezanosti gena[11] (engl. *linkage disequilibrium*) između lokusa testirana je programom Arlequin (Excoffier i sur. 2005) putem metode Markovljevih lanaca (Guo i Thompson 1992). Razina statističke značajnosti je korigirana primjenom Bonferroni metode za višestruko testiranje (Rice, 1989). Srednji broj alela po lokusu (A) i srednji efektivni broj alela po lokusu (Ae)[12] izračunat je programskim paketom POPGENE v. 1.32 (Yeh i sur. 2000), dok je program FSTAT v. 2.9.3 (Goudet, 2002) korišten za izračun alelnog bogatstva (engl. *allelic richness*, Ar)[13] i koeficijenta križanja u bliskom srodstvu, odnosno fiksacijskog indeksa (F_{IS})[14]. Uočena i očekivana heterozigotnost (H_O, H_E) analizirana je programskim paketom Arlequin (Excoffier i sur. 2005). Program NeEstimator V2 (Do i sur. 2014) korišten je za procjenu efektivne veličine populacije (N_E), pri čemu su u izračun uključene populacije koje su imale broj jedinki veći od 30. Podudarnost roditelja i potomstva testirana je pomoću programa CERVUS (Kalinowski i sur. 2007.). Stopa greške genotipiziranja postavljena je na

[11] Povezanost alela dvaju ili više lokusa koja nije slučajna i koja se pojavljuje u postotku različitome od očekivanoga.
[12] Mjera koja govori o potrebnom broju jednako frekventnih alela da bi se postigla određena genska raznolikost.
[13] Mjera broja alela po lokusu neovisno o veličini uzorka
[14] Razina srođivanja u subpopulaciji (govori o deficitu heterozigota unutar populacije).

1 %, a procijenjene su tri različite procjene (0,01, 0,1 i 0,2) udjela uzorkovanih roditeljskih kandidata.

2.4.1. Analiza genetičke varijabilnosti i populacijske strukture

Računalni program POWSIM 4.1 (Ryman & Palm 2006) korišten je za analizu statističke snage testa (engl. *power analysis*) kako bi se provjerilo je li veličina uzorka u ovom istraživanju dovoljna za uočavanje statističke razlike u veličini učinka, ukoliko takva postoji. Snaga testa ovisi o veličini uzorka, veličini učinka, razini značajnosti i snazi korištenog statističkog testa. Provedene su različite simulacije koje su uključivale različite kombinacije efektivne veličine populacije (N_E) i broja generacija (t) po vrijednosti F_{ST}-a, te je svaka simulacija izvedena 1000 puta, a snaga je određena kao omjer simulacija Fisherovog egzaktnog testa značajne vrijednosti na razini 0,05.

Razdioba genetičke varijacije između i unutar uzorkovanih populacija istražena je analizom molekularne varijance (AMOVA) i procjenom fiksacijskog indeksa (F_{ST})[15], korištenjem programa Arlequin, ver. 3.5**.** Primjenom Bonferronijeve korekcije definirana je razina statističke značajnosti (Rice, 1989). Razlike u distribuciji frekvencija alela između populacija testirane su Fisherovim egzaktnim testom u programu Arlequin uz vizualizaciju rezultata i testiranje značajnosti razlika programskim paketom STATISTICA (v. 10.0 za Windows).

Da bi se procijenila populacijska struktura uzorkovanih jedinki na neutralnom mikrosatelitnom skupu podataka i stupanj izmiješanosti između divljih i uzgojnih jedinki, provedena su različita statistička ispitivanja, uključujući multivarijantnu i Bayesovu metodu klasteriranja. Na temelju Nei udaljenosti, izvršena je analiza glavnih komponenata (PCoA) pomoću programa GENALEX 6 (Peakall & Smouse 2006).

Populacijska struktura predmetnih uzoraka analizirana je primjenom Bayesove metode klasteriranja koja je temeljena na Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algoritmu implementiranom u programu STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard i sur. 2000), a kojemu je cilj određivanje optimalnog broja nezavisnih genetičkih skupina (*K*) u uzorku na osnovi genetičkih profila jedinki. Parametri koji su korišteni u analizi bili su: model miješanja (engl. *admixture model*), s 200 000 ponavljanja (engl. *burn-in*), te s 1 000 000 interakcija (engl.

[15] Razina srođivanja između subpopulacija.

iterations), sa zadanim parametrima i bez prethodnih informacija o strukturi. *K* vrijednosti postavljene su od 1 do maksimalnog broja grupa s 10 ponavljanja. Najvjerojatniji broj genetičkih skupina (*K*) procijenjen je *ad hoc* ΔK pristupom (Evanno i sur. 2005) implementiranim u mrežnom programu Structure Harvester v. 0.6.93 (Earl & VonHoldt 2012). Programom CLUMPP v. 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) izračunata je srednja vrijednost n - nezavisno provedenih ponavljanja za zadanu *K* vrijednost. Vizualizacija dobivenih rezultata provedena je programom DISTRUCT v. 1.1 (Rosenberg, 2004). S ciljem utvrđivanja prisutnosti hijerarhijske strukture istraživanih populacija, Bayesova metoda klasteriranja implementirana u programu STRUCTURE je primijenjena s jednakim parametrima za sva ponavljanja, dok nije zabilježena najniža razina diferencijacije u svim podskupinama ili kad podskupina odgovara jednom lokalitetu/izvoru.

Paralelno s Bayesovom analizom klasteriranja, populacijska struktura analizirana je uz pomoć diskriminacijske analize glavnih komponenata (DAPC) u Adegenet paketu (v. 1.3-0) za R softver (Jombart i sur. 2010). Naredbom *find.clusters* uz korištenje *k-means* algoritma klasteriranja određen je najvjerojatniji broj genetičkih klastera, a funkcija *xvalDapc* je primijenjena uzastopno 1000 puta, za određivanje optimalnog broja glavnih komponenti koje treba zadržati u analizi. DAPC, multivarijantna metoda, identificira skupine ili klastere genetički sličnih jedinki na način da maksimizira razlike između grupa, a umanjuje varijacije unutar grupa.

2.4.2. Identifikacija hibrida

Optimalne granične vrijednosti za razlikovanje jedinki u analizi programom STRUCTURE ili za dodjeljivanje određenoj hibridnoj skupini primjenom programa NewHybrids (Anderson & Thompson 2002) određene su prema Vähä & Primmer (2006). Prvo je izdvojeno 50 „čistih“ jedinki divljeg i uzgojnog podrijetla čija je pripadnost pojedinom klasteru bila > 0,95 u preliminarnoj STRUCTURE analizi. Zatim je kreiran simulirani set podataka koji je sadržavao šest genotipskih skupina („čista linija“ roditelja, prva i druga generacija hibrida i generacija povratnog križanja F1 s čistom linijom roditelja - backcross[16]) primjenom R paketa hybriddetective (Wringe i sur. 2017). Za usporedbu ukupnih performansi svakog softvera za identifikaciju hibrida, konstruirana su tri seta podataka koja

[16] Križani hibrid s jednim od njegovih roditelja ili jedinkom genetički sličnom roditelju, kako bi se postiglo potomstvo s genetičkim identitetom koji je bliži roditelju.

sadrže različite udjele hibrida (15 %, 33 %, 66 %) i analizirani su odvojeno. Simulirani setovi podataka su zatim testirani programom STRUCTURE s podešenom vrijednosti broja klastera K=2 i ostalim vrijednostima navedenim u prethodnom poglavlju. Program NewHybrids je primijenjen za određivanje učinkovitosti (engl. *efficacy*, udio pojedinaca u grupi koji su pravilno identificirani), točnosti (engl. *accuracy,* udio identificirane skupine koja zaista pripada toj kategoriji) i performanse (engl. *performance,* rezultat učinkovitosti i točnosti) programa u otkrivanju hibrida. Prag značajne vrijednosti od 50 % je primijenjen u programu NewHybrids, dok su u programu STRUCTURE primijenjene značajne vrijednosti u rasponu od 0,60 do 0,95 za analizu dodjele jedinki određenoj klasi. Naposljetku, vrijednost praga koja ima najprikladnije performanse kasnije je korištena za identifikaciju hibrida u stvarnom skupu podataka.

Program NewHybrids v. 1.1 prikazuje posteriornu vjerojatnost dodjele jedinki jednoj od šest mogućih skupina, koje se razlikuju u stupnju izmiješanosti, u ovom slučaju uzgojne, divlje i hibridi (F1, F2, F1xF0), primjenom Jeffreyeve vjerojatnosti i zadane proporcije genotipova uz *burn-in* period od 20 000 generacija i 200 000 MCMC. Simulirana čista populacija uključena je u stvarne skupove podataka, koristeći oznake 'z' i 's koje označavaju čiste divlje ili uzgajane genotipove.

2.4.3. Povezanost područja mrijesta i rastilišta

Povezanost staništa potencijalnih roditelja s onima na kojima su uzorkovane juvenilne jedinke testirana je modelskim sustavom ROMS-ICHTHYOP. Individualno temeljeni model (IBM – *Individual Based Model*) Ichthyop je lagrangeovski disperzijski model (http://www.ichthyop.org/downloads; Lett i sur. 2008) koji omogućava proučavanje utjecaja bioloških (gustoća jajašaca, vertikalna migracija, plivanje, rast larve, smrtnost vezana uz temperaturu) i fizikalnih čimbenika (morske struje, temperatura, salinitet) na dinamiku ihtioplanktona. ROMS model sadrži potpunu trodimenzionalnu nelinearnu hidro- i termodinamiku koja se temelji na primitivnim jednadžbama gibanja, na jednadžbi kontinuiteta, na jednadžbama očuvanja topline i soli i na jednadžbi stanja. Simulacija je obuhvatila vremensko razdoblje od pet mjeseci (od vremena početka mrijesta do vremena ulova juvenilnih jedinki), računajući simulacije unaprijed, odnosno unazad u vremenu. Za verifikaciju rezultata numeričkog modela ROMS korišteni su podaci dobiveni satelitskim mjerenjem (površinska temperatura mora), a vertikalni profili temperature i slanosti su

izmjereni CTD sondom. Postavke simulacije modela s detaljnim opisom prikazani su u znanstvenom radu Žužul i sur. (2019).

2.4.4. Uparivanje molekularnih i morfoloških podataka

Pojednostavljeni ulazni set podataka koji se je sastojao od dvije divlje populacije (15_WN i 16_WK) i tri uzgojne populacije hrvatskog, francuskog i talijanskog podrijetla (15_FC, 15_FI i 15_FF), korišten je za provjeru funkcionalnosti strojnog učenja primjenom paketa AssignPOP za R softver u klasifikaciji jedinki nepoznatog podrijetla.

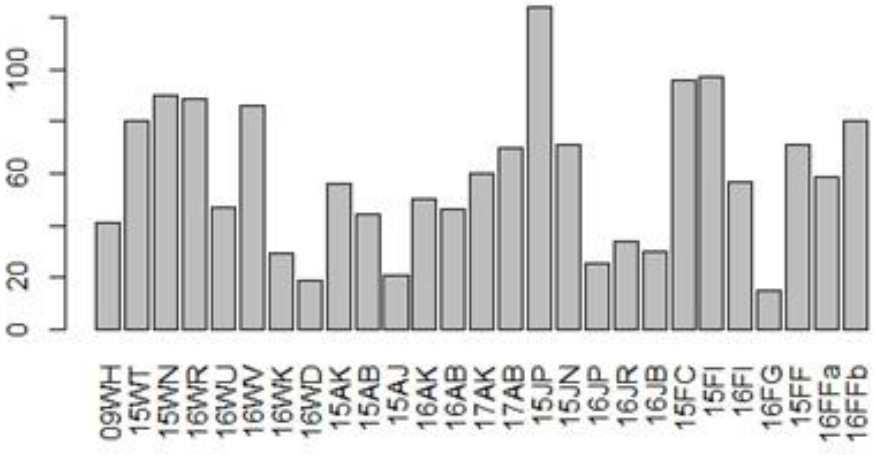
AssignPOP paketom (v. 1.3-0) za R softver (Chen i sur. 2018) testirana je pripadnost pojedinih jedinki određenim populacijama koristeći višelokusne i morfološke setove podataka. Morfološki ulazni podatci, odnosno morfološka svojstva istraživanih populacija su kvantificirana primjenom homolognih anatomskih točaka geometrijske morfometrije (Talijančić i sur. 2018), te su isti upareni s višelokusnim genotipovima kako bi se procijenio klasifikacijski uspjeh jedinki s obzirom na podrijetlo korištenjem Monte-Carlo i križne validacije s K-preklapanjem.

3. REZULTATI

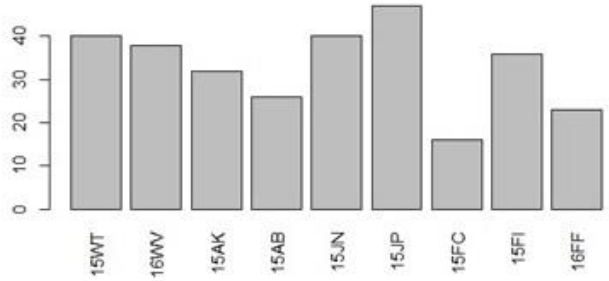
3.1. Genetička raznolikost komarče u istočnom Jadranu

Višelokusna genotipizacija izvršena je na 1 586 jedinki primjenom 21 neutralnog mikrosatelitnog biljega (SST), uz pomoć začetnica specifičnih za predmetnu vrstu. Nadalje, izvršena je genotipizacija poduzoraka od 298 jedinki primjenom triju biljega povezanih s genima kandidatima (cgSST) koje čine: hormon rasta (*GH*), prolaktin (PR*)* i protein modifikacije aktivnosti receptora 3 (*RAMP3*).

Broj uzoraka po populaciji za SST set podataka, korištenjem neutralnih mikrosatelitnih biljega, bio je u rasponu od 15 (populacija 15FG) do 124 (populacija 15JP) (Slika 3.1.1.), dok je za cgSST set podataka, korištenjem biljega povezanih s genima kandidatima, bio u rasponu od 16 (populacija 15FC) do 48 (populacija 15JP) (Slika 3.1.2.).

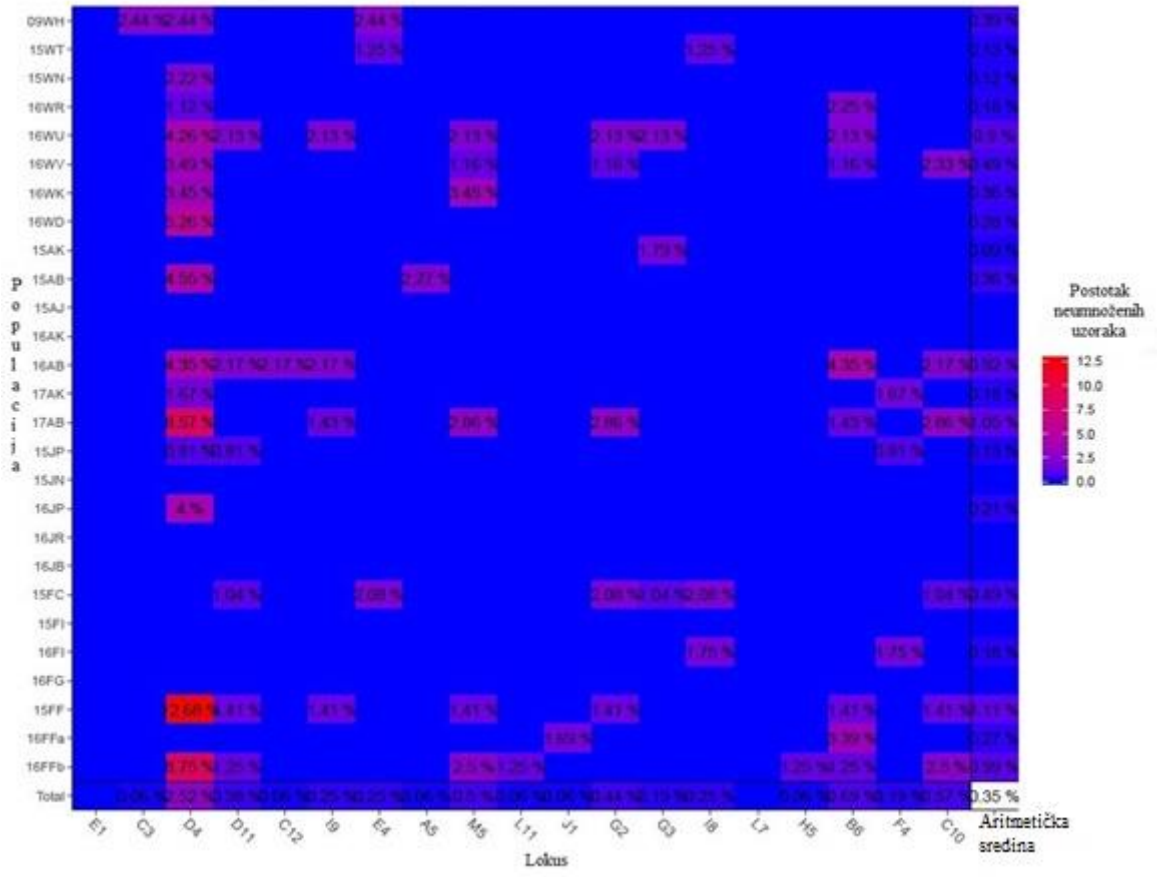


Slika 3.1.1. Broj uzoraka po populaciji komarče, *Sparus aurata*, primjenom neutralnih mikrosatelitnih biljega (cgSST).

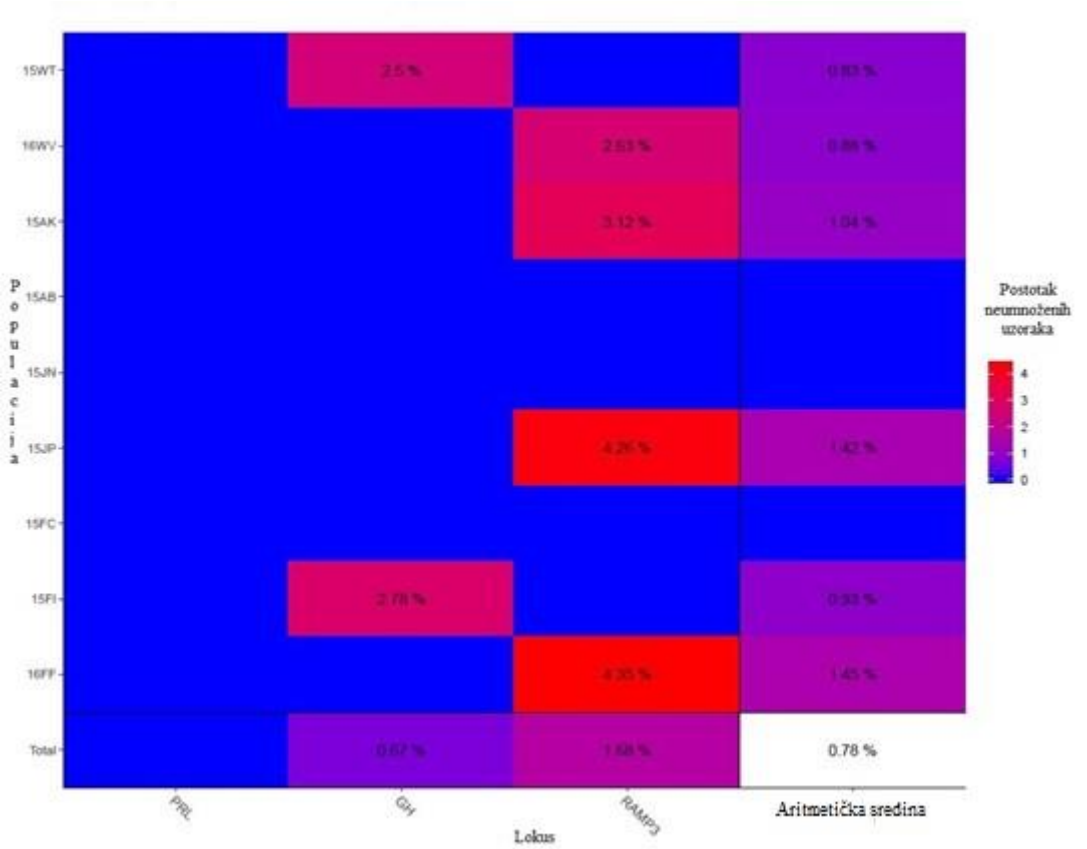


Slika 3.1.2. Broj uzoraka po populaciji komarče, *Sparus aurata,* primjenom mikrosatelitnih biljega povezanih s genima kandidatima (cgSST).

Postotak neumnoženih uzoraka po lokusu i populaciji kretao se od 0 do 1,5 %, s prosjekom od 0,3 % za neutralne biljege, SST (Slika 3.1.3.), dok je prosjek neumnoženih uzoraka za skup kandidatnih biljega, cgSST, iznosio 0,8 % (Slika 3.1.4.).

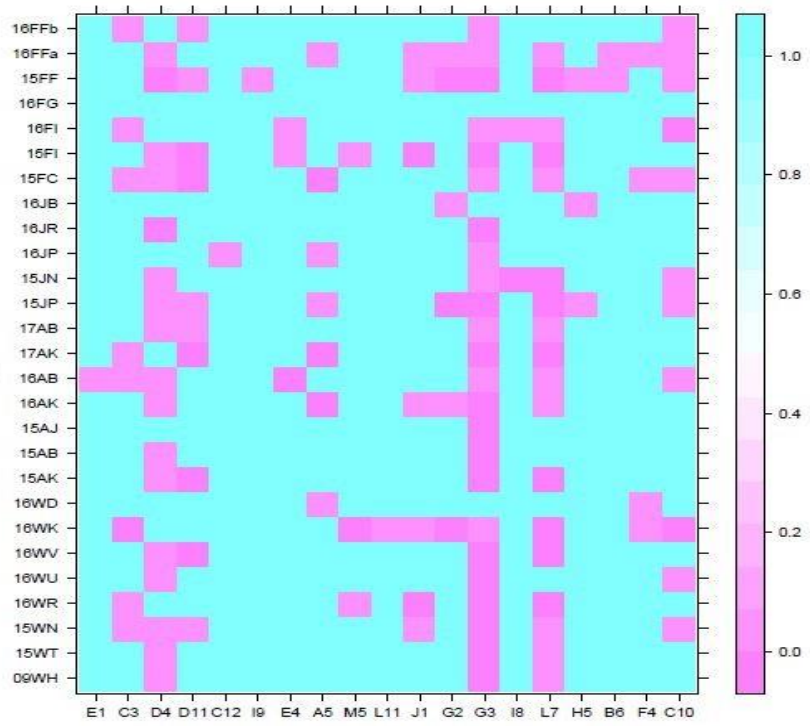


Slika 3.1.3. Postotak neumnoženih uzoraka po lokusu i populaciji za komarču, *Sparus aurata,* primjenom neutralnih mikrosatelitnih biljega (SST). Na osi x prikazani su lokusi, a na osi y populacije.

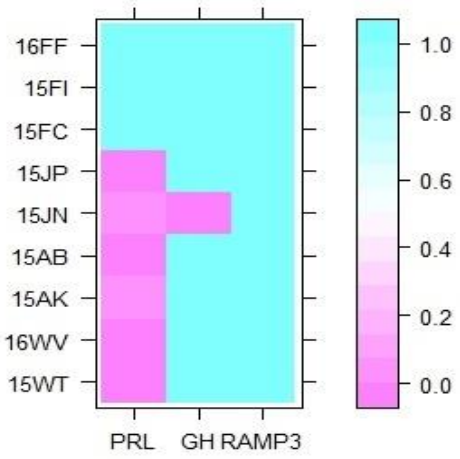


Slika 3.1.4. Postotak neumnoženih uzoraka po lokusu i populaciji za komarču, *Sparus aurata*, primjenom mikrosatelitnih biljega povezanih s genima kandidatima (cgSST). Na osi x prikazani su lokusi, a na osi y populacije.

Nakon korekcije za višestruke usporedbe (Bonferronijeve korekcije, $p<0,001$), većina populacija pokazala je značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže s tendencijom prema heterozigotnom nedostatku na neutralnim lokusima (M3, H8, G3 and L7) i lokusu povezanim s genom kandidatom (*PRL*) (Prilog: Tablica7.1; Tablica 7.2), što je pokazao i Fisherov egzaktni test (Slika 3.1.5.; Slika 3.1.6.).



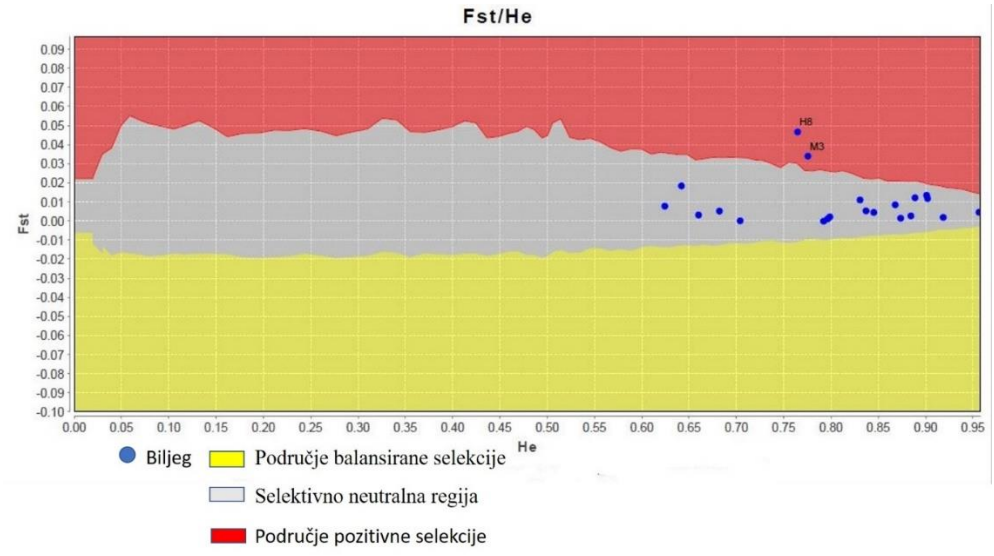
Slika 3.1.5. Prikaz odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže u uzorkovanim populacijama komarče u istočnom Jadranu po svakom ispitivanom neutralnom mikrosatelitnom lokusu (SST). Raspon boja predstavlja *p* vrijednosti testiranih odstupanja.



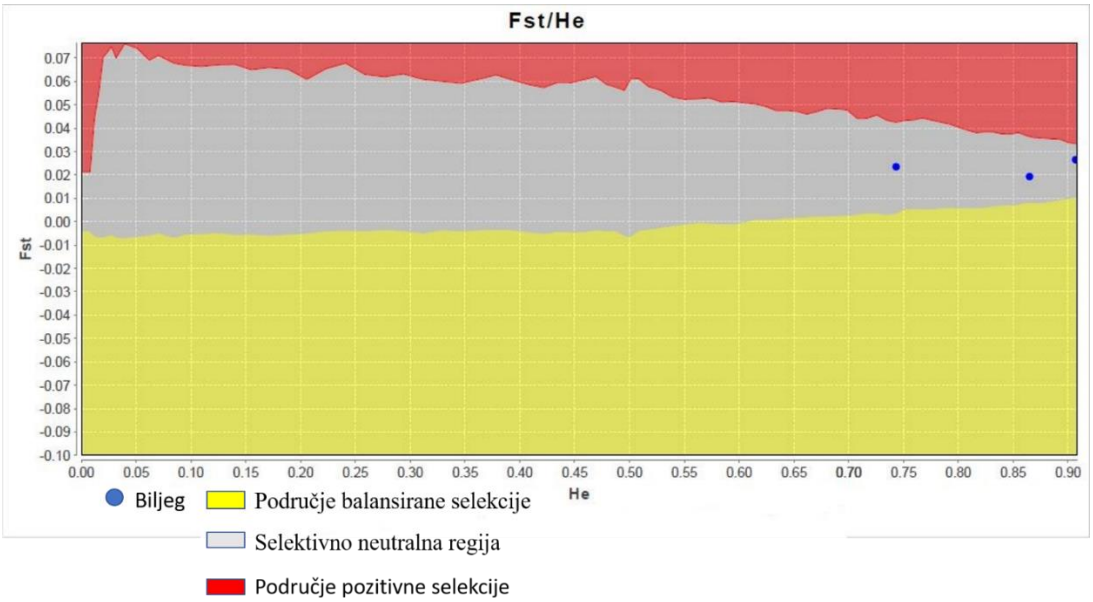
Slika 3.1.6. Prikaz odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže u uzorkovanim populacijama komarče u istočnom Jadranu primjenom lokusa povezanih s genima kandidatima (cgSST). Raspon boja predstavlja *p* vrijednosti testiranih odstupanja.

Prisutnost nul-alela identificirana je na lokusima M3, H8, G3 i L7 te lokusu povezanim s genom kandidatom *PRL*. Lokusi M3 i H8 su isključeni iz daljnje statističke obrade zbog prisustva nul-alela s udjelom većim od 0,3. Ostali lokusi s nižom prisutnošću nul-alela (G3, L7 i *PRL*) zadržani su u daljnjoj statističkoj obradi s obzirom da je procjena F_{ST} vrijednosti primjenom ENA korekcijske metode dala usporedive rezultate s F_{ST} vrijednostima bez primjene korekcije. Za neutralne mikrosatelitne lokuse, F_{ST} s korekcijom je iznosio 0,022 naspram 0,023 za F_{ST} bez korekcije. Za lokuse gena kandidata, F_{ST} s korekcijom je iznosio 0,019 naspram 0,018 za F_{ST} bez korekcije, gdje su se vrijednosti F_{ST} sa i bez korekcije preklapale u rasponu pouzdanosti od 95 %.

Primjenom programa LOSITAN, na neutralnim mikrosatelitnim lokusima (SST), uočeno je da 19 lokusa nije bilo pod djelovanjem pozitivne ili balansirane selekcije, a za lokuse H8 i M3 ustanovljeno je djelovanje pozitivne selekcije (Slika 3.1.7.). Isti lokusi su isključeni iz analize zbog značajnog prisustva nul-alela. Stoga, analizom je potvrđena neutralnost SST lokusa, tj. nepostojanje lokusa koji pokazuju atipične vrijednosti parametra F_{ST} („outlier“ lokusi). Nadalje, za tri lokusa povezana s genima kandidatima (cgSST) također nije zabilježen dokaz o djelovanju pozitivne ili balansirane selekcije, što upućuje na njihovu neutralnost (Slika 3.1.8.).



Slika 3.1.7. Grafički prikaz testa na selektivnu neutralnost 21-og neutralnog mikrosatelitnog biljega komarče, *Sparus aurata*, korištenjem programa LOSITAN. Svaka točka predstavlja određeni lokus. Sivo područje označava selektivno neutralnu regiju, žuto područje regije djelovanja balansirane selekcije, a crveno područje regije djelovanja pozitivne selekcije

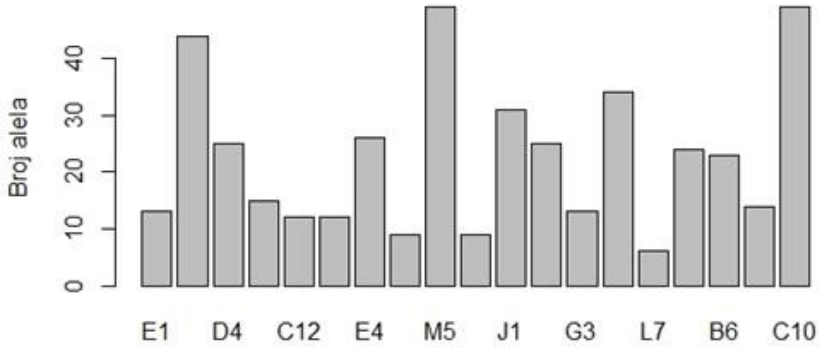


Slika 3.1.8. Grafički prikaz testa na selektivnu neutralnost 3 mikrosatelitna biljega povezana s genima kandidatima komarče, *Sparus aurata*, korištenjem programa LOSITAN. Svaka točka predstavlja određeni lokus. Sivo područje označava selektivno neutralnu regiju, žuto područje regije djelovanja balansirane selekcije, a crveno područje regije djelovanja pozitivne selekcije.

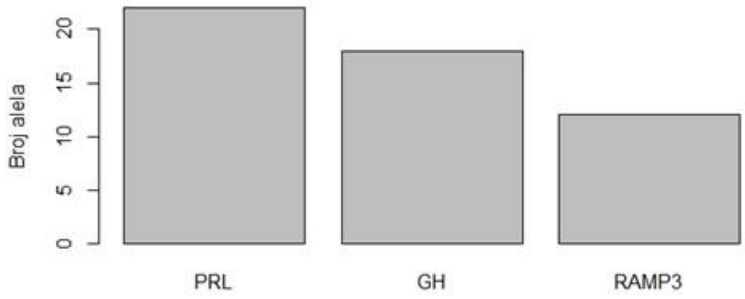
Neravnoteža vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*) između lokusa nije ustanovljena nakon Bonferronijeve korekcije ($p < 0{,}001$). U istraživanim populacijama, svih 19 lokusa su se pokazali polimorfnim. Srednja očekivana heterozigotnost (H_e) bila je veća od 0,70 za oba seta podataka (SST, cgSST), osim za populaciju 15FI (0,65) istraživanu lokusima povezanim s genima kandidatima. Srednja opažena heterozigotnost (H_o) bila je u rasponu od 0,71 (populacija 15FF) do 0,82 (populacija 16FG) za SST set, dok je za cgSST set bila u rasponu od 0,66 (populacija 15FI) do 0,76 (populacija 16WV). Srednji broj alela po lokusu (A) se kretao od 7 do 14 za oba seta podataka (SST, cgSST). Efektivni broj alela po lokusu (A_e) za SST set je bio u rasponu od 4,5 (populacija 16FFa) do 6,8 (populacija 16WV), dok je za cgSST set bio u rasponu od 4,1 (populacija 15FI) do 7,5 (15JP). Alelno bogatstvo (A_r), koje je mjera broja alela nezavisnih od veličine uzorka, kretalo se u rasponu od 6,5 (populacija 16FFa i 16JB) do 8,9 (populacija 16WD,16JR i 16AK) u SST setu podataka. Za cgSST set podataka alelno bogatstvo bilo je u rasponu od 6,6 (populacija 16FFb i 16JB) do 10,5 (populacija 16WV).

Najvarijabilniji lokus za SST set je bio M5 s rasponom broja alela od 19 (populacija 16FG) do 27 (populacija 15JP), dok je najmanje varijabilan bio lokus A5 s rasponom broja

alela od 3 (populacija 16WK) do 6 (populacija 16JB) (Slika 3.1.9.; Prilog, Tablica 7.1). U cgSST setu podataka najvarijabilniji je lokus bio *PRL* s rasponom alela od 6 (populacija 16FF) do 11 (populacija 15AB), dok je najmanje varijabilan lokus bio RAMP3 s rasponom od 4 (populacija 15FI) do 9 (populacija 16WV), Slika 3.1.10. Uočena je značajna pozitivna korelacija ($p < 0.01$) u frekvenciji alela SST lokusa između divljih populacija uzorkovanih u 2009., 2015. i 2016., što ukazuje na stabilnost u frekvenciji alela (Tablica 3.1.1).



Slika 3.1.9. Broj alela po lokusu za komarču, *Sparus aurata,* primjenom neutralnih mikrosatelitnih biljega (SST). Na osi x prikazani su lokusi, a na osi y broj alela



Slika 3.1.10. Broj alela po lokusu za komarču, *Sparus aurata*, primjenom mirkosatelitnih biljega povezanih s genima kandidatima (cgSST). Na osi x prikazani su lokusi, a na osi y broj alela.

Tablica 3.1.1. Pearsonov koeficijent korelacije frekvencije alela neutralnih mikrosatelitnih lokusa (SST set) između parova grupa divljih populacija komarče uzorkovanih 2009., 2015. i 2016 godine u istočnom Jadranu.

Izvor varijabilnosti	**r (x, y)**	**t- test (*p*-vrijednost)**
divlje2009 vs divlje2015	0,551	13,27 ($p < 0.01$)
divlje2009 vs divlje2016	0,557	13,48 ($p < 0.01$)
divlje2015 vs divlje2016	0,988	129,2 ($p < 0.001$)

Za neutralni set lokusa (SST) uzgojne populacije u usporedbi s divljim populacijama su pokazale značajno manji efektivni broj alela po lokusu (6,5 *vs* 7,3), alelno bogatstvo (7,3 *vs* 8,6), srednju zapaženu heterozigotnost (0,74 *vs* 0,76) i srednju očekivanu heterozigotnost (0,79 *vs* 0,81) (ANOVA test, $p < 0,05$). Juvenilne i uzgajališno povezane jedinke su slijedile obrazac genetičke raznolikosti uočen za divlje populacije. Za cgSST set jedino su efektivni broj alela (5,1 *vs* 8,0) i alelno bogatstvo (10,1 *vs* 7,5) bili značajno manji u uzgojnim populacijama u usporedbi s divljim.

Koeficijent križanja u bliskom srodstvu, odnosno fiksacijski indeks $F_{IS,}$ bio je u rasponu od -0,06 (populacija 16FG) do 0,10 (populacija 15FF) za SST set podataka, a -0,03 (populacija 15FI) do 0,12 (populacija 15AK) za cgSST podatke (Tablica 3.1.2). Za SST set podataka, u 33 % populacija utvrđena je statistički značajna pozitivna vrijednost F_{IS}-a, te u 11 % populacija za cgSST podataka.

Efektivna veličina populacije, N_E, (engl. *effective population size*), koja predstavlja broj reproduktivno sposobnih jedinki u idealnoj populaciji, analizirana neutralnim setom mikrosatelitnih lokusa u populacijama čija je veličina bila veća od 30 jedinki razlikovala se s obzirom na podrijetlo i starost ribe. U prosjeku, N_E je bila tri do sedamnaest puta manja u uzgojnim populacijama (164) u usporedbi s divljim (549), uzgajališno povezanim (1139) i juvenilnim populacijama (2799).

Tablica 3. 1. 2. Zbirni opis genetičke raznolikosti komarče *Sparus aurata* u istočnom Jadranu koji uključuje broj uzoraka (N), srednji broj alela (A), efektivni broj alela (Ae), bogatstvo alela (Ar), očekivanu (He) i uočenu (Ho) heterozigotnost, fiksacijski indeks (F_{IS}) i efektivnu veličinu populacije (N_E) za 21 neutralni mikrosatelitni lokus (SSR) i 3 lokusa povezana s genima kandidatima (cgSSR). Efektivna veličina populacije (N_E) za populacije čiji je broj jedinki bio manji od 30 nije analizirana. * Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže i F_{IS} pri $p < 0,05$; Srednje vrijednosti u istom stupcu označene različitim slovom se međusobno značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Pop ID	**A**		**Ae**		**Ar**		**Ho**		**He**		***F*IS**		***N*E**
	SSR	cgSSR	SSR	cgSSR	SSR	cgSSR	SSR	cgSSR	SSR	cgSSR	SSR	cgSSR	SSR
Divlje													
09WH	11,7±6,1		6,4±3,6		8,7±3,8		0,77±0,2		0,81±0,1		0,05		565 (290, 6523)
15WT	13,3±7,0	12,3±6,6	6,6±3,9	7,3±4,8	8,8±3,6	9,7±4,9	0,78±0,1	0,72±0,1*	0,80±0,1	0,81±0,2	0,03	0,11*	755 (475, 2002)
15WN	13,5±6,9		6,7±4,3		8,8±3,8		0,77±0,1		0,80±0,1		0,04		∞ (3583, ∞)
16WR	13,7±6,5		6,6±3,8		8,7±3,6		0,76±0,1*		0,80±0,1		0,05		5009 (953, ∞)
16WU	12,2±5,9		6,1±3,4		8,8±3,5		0,76±0,1		0,79±0,1		0,05		29510 (587, ∞)
16WV	13,1±6,7	13,3±4,5	6,8±3,9	7,7±5,1	8,8±3,6	10,5±4,1	0,77±0,2*	0,76±0,2	0,81±0,1	0,82±0,2	0,05*	0,07	6980 (1118, ∞)
16WK	9,7±4,5		6,0±3,3		8,4±3,6		0,74±0,2*		0,80±0,1		0,07		-
16WD	9,7±4,5		6,0±3,1		8,9±4,1		0,76±0,2		0,81±0,1		0,06		-
Ukupno	20,8±12,7	14,7±5,5	7,3±4,4	8,0±5,5	8,6[a]	10,1[a]	0,76±0,1[a]	0,73±0,1[a]	0,81±0,1[a]	0,81±0,2[a]			549 (494, 616)
Mlađ													
15JP	14,5±7,9	12,7±5,5	6,8±4,3	7,5±4,8	8,8±3,7	10,0±4,2	0,75±0,1*	0,73±0,1	0,81±0,1	0,82±0,1	0,07*	0,11	1554 (626. ∞)
15JN	12,9±6,3	11,0±5,3	6,4±3,2	7,4±4,8	8,7±3,4	9,2±4,3	0,76±0,1*	0,72±0,1*	0,81±0,1	0,81±0,2	0,06*	0,12	900 (484, 5276)
16JP	9,9±4,7		5,9±2,8		8,5±3,6		0,77±0,2		0,80±0,1		0,04		-
16JR	11,4±4,8		6,4±3,2		8,9±3,6		0,76±0,1		0,81±0,1		0,07		1513 (365, ∞)
16JB	7,56±3,4		4,4±1,6		6,5±2,6		0,72±0,1		0,75±0,1		0,04		108 (70, 218)
Ukupno	15,6±8,2	13,7±6,5	6,8±3,9	7,8±5,3	8,3[a]	9,6[ab]	0,75±0,1[ab]	0,72±0,1[a]	0,80±0,1[a]	0,81±0,2[a]			2799 (1452, 26309)

Uzgajališno povezane													
15AK	12,4±6,3	11,7±6,8	6,3±3,4	7,1±4,5	8,6±3,6	9,6±5,2	0,76±0,2	0,71±0,1	0,81±0,1	0,81±0,2	0,05	0,12	1430 (497, ∞)
15AB	11,8±5,9	11,0±5,0	6,2±3,5	6,8±4,7	8,7±3,5	9,4±4,2	0,76±0,1	0,74±0,1	0,81±0,1	0,81±0,1	0,05	0,09	3435(484, ∞)
15AV	9,4±4,0		5,4±2,6		8,4±3,3		0,74±0,2		0,79±0,1		0,06*		-
16AK	12,4±5,9		6,6±3,9		8,9±3,7		0,75±0,2*		0,81±0,1		0,08*		925 (431, ∞)
16AB	11,8±5,9		6,5±3,8		8,7±3,6		0,75±0,1*		0,81±0,1		0,07*		705 (384, 3637)
17AK	12,7±6,6		6,7±3,9		8,7±3,8		0,74±0,2		0,81±0,1		0,08*		127 (105, 160)
17AB	12.9±5.9		6.6±4.0		8.7±3.6		0.77±0.1		0.81±0.1		0.05*		521 (344, 1047)
Ukupno	16,1±8,3	14,0±7,6	7,2±4,6	7,4±5,2	8,7[a]	9,5[ab]	0,75±0,1[ab]	0,72±0,1[a]	0,81±0,1[a]	0,80±0,2[a]			1139 (899, 1534)
Uzgojne													
15FC	12,8±6,8	9,0±4,0	6,5±3,6	5,7±1,8	8,6±3,6	9,0±4,0	0,77±0,2*	0,83±0,1	0,80±0,1	0,84±0,1	0,03	0,01	89 (82, 96)
15FI	11,3±5,3	8,7±4,2	5,3±2,6	4,1±2,5	7,5±2,7	6,9±3,3	0,75±0,2*	0,66±0,3	0,78±0,1	0,65±0,3	0,04	-0,03	76 (70, 83)
16FI	10,5±4,7		4,9±2,7		7,4±2,8		0,73±0,2*		0,76±0,1		0,04		98 (83, 118)
16FG	7,4±2,9		4,6±1,8		7,4±2,9		0,82±0,2		0,78±0,1		-0,06		-
15FF	8,9±4,3		5,2±2,6		6,8±2,7		0,71±0,1*		0,78±0,1		0,10*		177 (139, 241)
16FFa	8,5±3,9		4,5±2,1		6,5±2,5		0,72±0,2*		0,74±0,1		0,02		80 (68, 96)
16FFb	9,5±4,3	7,0±2,7	4,8±2,1	3,9±1,5	6,8±2,5	6,6±2,2	0,72±0,1*	0,76±0,1	0,76±0,1	0,74±0,1	0,04	-0,03	151 (126, 188)
Ukupno	15,2±7,8	12,7±4,5	6,5±4,1	5,1±2,7	7,3[b]	7,5[b]	0,74±0,1[b]	0,73±0,2[a]	0,79±0,1[b]	0,75±0,2[a]			164 (155, 173)

3.2. Genetička udaljenost i populacijska struktura

Programom POWSIM testirana je snaga informativnosti, tj. otkrivanje stvarne strukture populacija pri određenim F_{ST} vrijednostima za oba seta mikrosatelitnih biljega. Na primijenjenom setu mikrosatelitnih biljega i veličini uzorka procijenjena je statistički značajna snaga testa za dati skup (χ^2, Fisherov test) od 100 % za SST i 95 % za cgSST u opisu genetičke udaljenosti pri F_{ST} = 0,005 i različitom efektivnom veličinom populacije (N_E) i vremenom genskog otklona (engl. *generation drift*), ukazujući da korištene analize u istraživanju mogu otkriti stvarnu strukturu populacija ukoliko su stvarne procjene F_{ST} vrijednosti na ovoj razini ili iznad. Na nižoj razini divergencije, 19 neutralnih mikrosatelitnih biljega pokazalo je veću informativnost i snagu u opisu genetičke udaljenosti u odnosu na 3 mikrosatelitna biljega povezana s genima kandidatima (Tablica 3.2.1).

Tablica 3. 2. 1. Snaga oba seta biljega u opisu stvarne razine srođivanja populacija testirana Fisherovim testom u programu POWSIM upotrebom frekvencije alela SST i cgSST seta podataka.

F_{ST}	Efektivna veličina (N_E)	Generacija otklona (t)	19 SST	3 cgSST	Prosjek pojedinačnog lokusa	
					19 SST	3 cgSST
			Fisherov egzaktni test		Fisherov egzaktni test	
0,0012	2000	5	1	0,237		
0,0025	1000	5	1	0,505	0,845	0,267
0,005	1000	10	1	0,945	0,986	0,597
0,01	1000	20	1	1		
0,025	2000	10	1	1		

Globalna F_{ST} vrijednost između 27 populacija iznosila je 0,022 ($p < 0.0001$) za SST skup i 0,019 ($p < 0.001$) za podskup cgSST podataka, ukazujući na umjerenu genetičku udaljenost između istraživanih populacija. Najviša globalna F_{ST} vrijednost u setu SST podataka uočena je kod uzgojnih populacija (0,041), dok je niža vrijednost F_{ST} uočena u tri ostale populacije: 0,015 (divlje), 0,010 (uzgajališno povezane) i 0,009 (juvenilne). Potpuni prikaz F_{ST} vrijednosti između parova populacija SST seta podataka prikazan je u Tablici 3.2.2, a u Tablici 3.2.3 je potpuni prikaz F_{ST} vrijednosti za cgSST set podataka.

Tablica 3.2.2. F_{ST} vrijednosti između parova populacija komarče, *Sparus aurata*, zasnovane na temelju 19 neutralnih mikrosatelitnih lokusa između 27 populacija. Statistički značajne vrijednosti su podcrtane pri p < 0,0001 (Bonferronijeva korekcija). Obojene vrijednosti predstavljaju skalu F_{ST} usporedbe, svijetlo ružičaste vrijednosti predstavljaju manje F_{ST} vrijednosti (0,006-0,01), ružičaste srednje F_{ST} vrijednosti (0,01-0,05), i crvene veće F_{ST} vrijednosti (i > 0,05).

	09 WH	**15 WT**	**15 WN**	**16 WR**	**16 WU**	**16 WV**	**16 WK**	**16 WD**	**15 AK**	**15 AB**	**15 AV**	**16 AK**	**16 AB**	**17 AK**	**17 AB**	**15 JP**	**15 JN**	**16 JP**	**16 JR**	**16 JB**	**15 FC**	**15 FI**	**16 FI**	**16 FG**	**15 FF**	**16 FFa**
15WT	0,071																									
15WN	0,076	0,001																								
16WR	0,076	0,001	0,001																							
16WU	0,071	0,002	0,001	0,003																						
16WV	0,071	0,001	0,001	0,000	0,002																					
16WK	0,077	0,002	0,004	0,001	0,004	0,005																				
16WD	0,064	0,000	0,001	0,002	-0,002	0,002	0,002																			
15AK	0,075	0,006	0,008	0,009	0,011	0,006	0,012	0,009																		
15AB	0,075	0,008	0,011	0,012	0,012	0,009	0,013	0,014	0,001																	
15AV	0,076	0,011	0,012	0,014	0,006	0,012	0,017	0,003	0,002	0,005																
16AK	0,069	0,007	0,006	0,008	0,008	0,007	0,009	0,006	0,001	0,003	0,002															
16AB	0,076	0,007	0,007	0,009	0,012	0,006	0,014	0,012	0,000	0,000	0,006	0,002														
17AK	0,082	0,007	0,009	0,008	0,014	0,010	0,011	0,007	0,020	0,024	0,030	0,020	0,019													
17AB	0,072	0,003	0,001	0,003	0,005	0,003	0,006	0,001	0,011	0,017	0,019	0,011	0,013	0,004												
15JP	0,072	0,008	0,008	0,010	0,008	0,008	0,012	0,007	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,023	0,014											
15JN	0,073	0,009	0,011	0,010	0,011	0,009	0,016	0,012	0,002	0,000	0,004	0,001	0,001	0,022	0,015	0,001										
16JP	0,073	0,007	0,007	0,007	0,012	0,006	0,010	0,010	0,001	0,002	0,006	-0,002	-0,001	0,019	0,014	-0,001	0,003									
16JR	0,078	0,012	0,009	0,016	0,015	0,009	0,019	0,015	0,002	0,003	0,009	0,003	0,000	0,023	0,016	0,006	0,004	0,003								
16JB	0,102	0,032	0,032	0,034	0,036	0,030	0,042	0,034	0,027	0,029	0,032	0,032	0,030	0,041	0,034	0,029	0,028	0,033	0,030							
15FC	0,083	0,011	0,014	0,011	0,014	0,014	0,014	0,010	0,018	0,021	0,022	0,019	0,019	0,006	0,010	0,019	0,023	0,019	0,027	0,043						
15FI	0,092	0,026	0,028	0,024	0,027	0,023	0,035	0,027	0,027	0,028	0,034	0,035	0,025	0,024	0,024	0,031	0,029	0,034	0,036	0,048	0,027					
16FI	0,107	0,028	0,024	0,024	0,028	0,023	0,031	0,028	0,033	0,033	0,037	0,036	0,034	0,024	0,024	0,034	0,038	0,035	0,039	0,053	0,028	0,033				
16FG	0,094	0,024	0,027	0,025	0,031	0,021	0,031	0,025	0,033	0,038	0,049	0,040	0,033	0,015	0,017	0,039	0,040	0,037	0,042	0,063	0,021	0,009	0,030			
15FF	0,091	0,027	0,029	0,030	0,033	0,025	0,035	0,028	0,021	0,021	0,023	0,023	0,022	0,039	0,030	0,023	0,021	0,025	0,021	0,006	0,041	0,044	0,056	0,058		
16FFa	0,108	0,040	0,045	0,046	0,046	0,045	0,048	0,047	0,035	0,037	0,035	0,035	0,038	0,054	0,047	0,038	0,037	0,041	0,041	0,032	0,051	0,067	0,074	0,076	0,026	
16FFb	0,092	0,024	0,025	0,026	0,027	0,023	0,029	0,027	0,035	0,038	0,041	0,036	0,037	0,033	0,021	0,037	0,039	0,040	0,041	0,025	0,039	0,044	0,053	0,053	0,020	0,045

Legenda
0,006
0,010
0,050
0,100

Za SST set podataka, kod 286 od 351 uspoređenih parova utvrđena je statistički značajna F_{ST} udaljenost nakon primjene Bonferroni korekcije. Povijesni uzorci iz 2009. godine pokazali su značajno visoku genetsku udaljenost u odnosu na ostale populacije u SST setu podataka. Statistički značajne razlike u genetskoj udaljenosti nisu utvrđene kod međusobne usporedbe divljih populacija uzorkovanih 2015. i 2016. godine duž istočne obale Jadrana, gdje su se F_{ST} vrijednosti kretale od 0,002 do 0,005. Naprotiv, uzgojno povezene populacije iz 2015. i 2016. godine pokazale su prekid protoka gena prema divljim populacijama, izuzev populacije uzorkovane 2017. godine (17AB, 17AK) koje nisu pokazale značajne razlike u usporedbi s uzgojnim populacijama jadranskog podrijetla. Nadalje, niske razine genetske udaljenosti ($p > 0.05$) uočene su za populacije koje su uzorkovane u blizini uzgajališta (uzgajališno povezane; 15AK, 15AB, 15AV, 16AK i 16AB) i populacije mlađi (15JP, 15JN, 16JP, 16JR) za obje godine uzorkovanja ($0,002 < F_{ST} < 0,009$). Jedino je mlađ (16JB) uzorkovana u blizini područja pod utjecajem akvakulture pokazala nisku razinu genetske udaljenosti s uzgojnom populacijom francuskog podrijetla (15FF), dok kod drugih populacija mlađi to nije bio slučaj. Sve uzgojne populacije različitog geografskog podrijetla pokazale su smanjen protok gena prema svim ostalim uzorkovanim populacijama, ali i značajnu međusobnu udaljenost ($0,009 < F_{ST} < 0,076$).

Tablica 3.2.3. F_{ST} vrijednosti između parova populacija komarče, *Sparus aurata*, temeljem 3 mikrosatelitna lokusa povezana s genima kandidatima (cgSST) između 9 populacija različitog podrijetla. Značajne F_{ST} vrijednosti su podcrtane pri $p < 0.001$ (Bonferronijeva korekcija). Obojene vrijednosti ukazuje na skalu F_{ST} usporedbe (0,01 – 0,05), gdje svijetlo crvena ukazuje na srednje F_{ST} vrijednosti i jarko crvena na više F_{ST} vrijednosti (iznad 0,05).

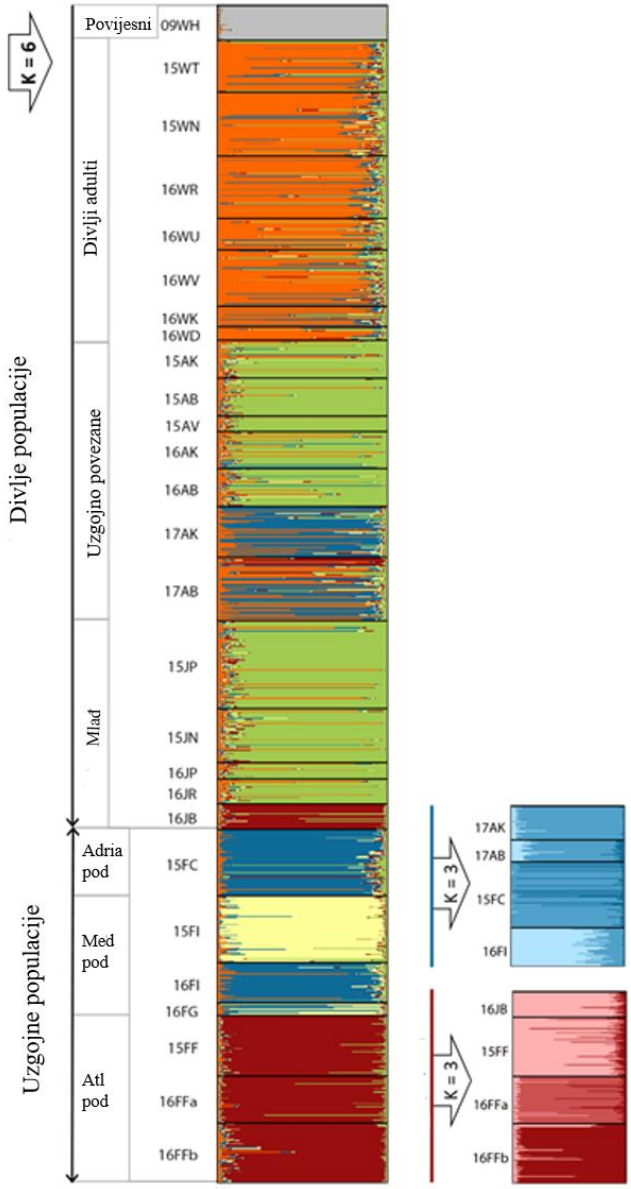
	15WT	**16WV**	**15AK**	**15AB**	**15JN**	**15JP**	**15FC**	**15FI**
16WV	0,002							
15AK	0,001	0,002						
15AB	0,004	0,001	0,002					
15JN	0,002	0,004	0,002	0,002				
15JP	0,007	0,003	0,005	0,000	0,003			
15FC	0,028	0,012	0,021	0,011	0,018	0,011		
15FI	0,050	0,038	0,047	0,050	0,040	0,045	0,093	
16FFb	0,057	0,036	0,048	0,045	0,046	0,032	0,035	0,085

Najviša razina ukupne genetičke udaljenosti F_{ST} za cgSST set podataka je uočena unutar uzgojnih populacija, za razliku od nižih vrijednosti F_{ST}-a uočenih unutar i između divljih populacija ($0{,}004 < F_{ST} < 0{,}001$). Sve statistički značajne usporedbe F_{ST} vrijednosti (ukupno 21 od 36) povezane su s uzgojnim populacijama u usporedbi s divljim populacijama (Tablica 3.2.3).

Inicijalnom analizom populacijske strukture u programu STRUCTURE i korištenjem Bayesovog modela prepoznato je postojanje šest populacija (K = 6) na istraživanom području. Divlje populacije uzorkovane duž Jadrana su svrstane u pet različitih klastera, od kojih su tri klastera isključivo povezana s divljim podrijetlom ribe, a dva su bila povezana s uzgojnim podrijetlom (Slika 3.2.1.).

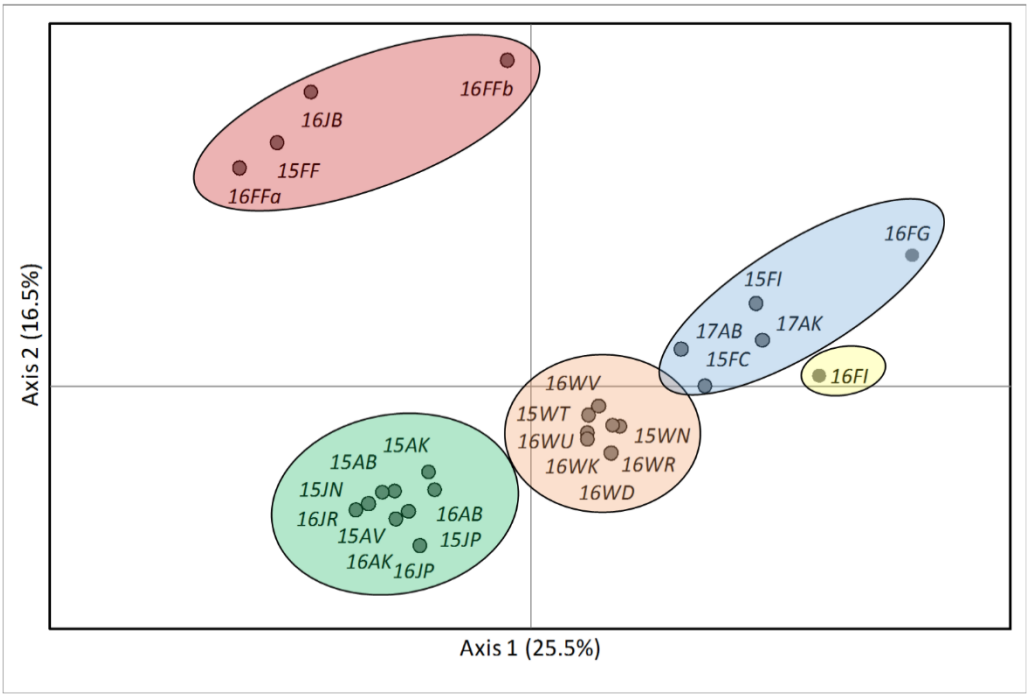
Populacije uzorkovane 2009. godine pridružene su prvom klasteru (sivi), dok je za divlje populacije uzorkovane 2015. i 2016. godine duž istočne obale Jadrana opažena genetička homogenost, te su pridružene u drugi klaster (narančasti). U skladu s rezultatima F_{ST} vrijednosti nije uočena genetička barijera između divljih kavezno povezanih populacija uzorkovanih 2015. i 2016. godine i uzorkovane mlađi u blizini glavnih prirodnih rastilišta, te su one pridružene u treći zeleni klaster. Mlađ uzorkovana u blizini uzgajališta (16JB) je pridružena četvrtom (crvenom) klasteru koji također obuhvaća uzgojne populacije atlantskog podrijetla. Uzgajališno povezane jedinke uzorkovane 2017. godine djelomično su dodijeljene trećem klasteru (narančastom) skupa s divljim populacijama, a također djelomično i petom klasteru (plavi) koji obuhvaća uzgojne jedinke mediteranskog podrijetla. Uzgojne populacije podrijetlom iz zapadnog Jadrana (Italija) formirale su zasebni šesti klaster (žuti).

Daljnja strukturiranost unutar divljih populacija (narančasti klaster) te unutar uzgajališno povezanih populacija i mlađi (zeleni klaster) nije utvrđena. Nadalje, dodatna analiza klasteriranja u koju su uvrštene jedinke uzgojnog podrijetla (crvena i plava) rezultirala je daljnjom strukturiranošću u oba podskupa s K = 3 za podskup atlantskog podrijetla grupiran s populacijama 16JB i 15FF u jedan klaster, i K = 3 za uzgojne populacije mediteranskog podrijetla skupa s divljim populacijama koje su uzgajališno povezane te su uzorkovane 2017. godine (17AK i 17AB). Daljnja podstrukturiranost nije utvrđena, što u konačnici upućuje na postojanje deset populacija na istraživanom području (K = 10) s jasnom inkorporacijom uzgojnog genotipa u divljim populacijama.



Slika 3.2.1. Hijerarhijska populacijska struktura komarče *Sparus aurata* u istočnom Jadranu temeljena na STRUCTURE analizi genotipova 19 neutralnih mikrosatelitnih lokusa. Prva hijerarhijska podjela razlučuje pripadnost jedinki u šest klastera (K = 6). U drugom koraku prikazana je dodatna strukturiranost klastera kojima je u prvom koraku STRUCTURE analize pridruženo više različitih populacija. Crne linije odjeljuju jedinke prema mjestu uzorkovanja ili podrijetlu.

Odnosi između uzorkovanih populacija, temeljeni na uparenoj Nei genetičkoj udaljenosti, prikazani su analizom glavnih komponenti (PCoA), a u analizu nisu uključeni povijesni uzorci 09WH (Slika 3.2.2.). Utvrđena je prisutnost pet glavnih grupa s raspodjelom genetički sličnih populacija kao i kod Bayesove analize klasteriranja implementirane u programu STRUCTURE.



Slika 3.2.2. Analiza glavnih komponenti populacija komarče *Sparus aurata* u istočnom Jadranu različitog podrijetla temeljena na frekvenciji alela neutralnih mikrosatelitnih lokusa. Obojenim krugovima su označene populacijske skupine kao kod STRUCTURE analize. Povijesni uzorci (09HW) nisu uključeni u ovu analizu.

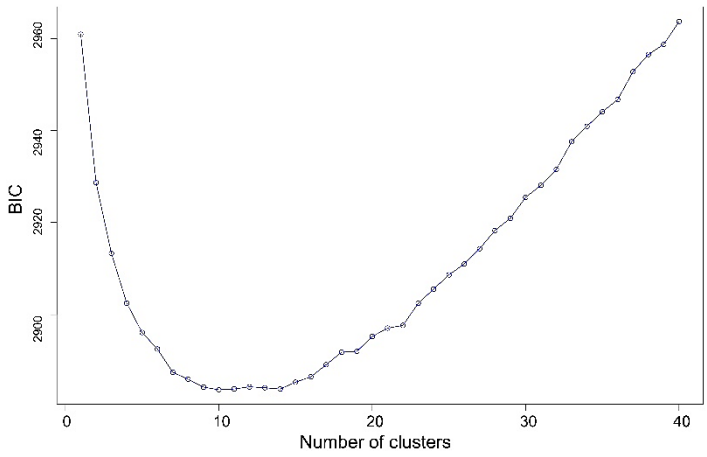
Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) zasnovani na različitim podjelama populacija uzorkovanih u ovoj studiji prikazani su u Tablici 3.2.4. Prema podjeli zasnovanoj prema podrijetlu (divlje *vs* mlađ *vs* uzgajališno povezane *vs* uzgojne) varijacija između grupa iznosila je 0,2 %, dok je unutar grupe iznosila 2,1 %. Iz podjela zasnovanih na inicijalnim rezultatima programa STRUCTURE (K = 6) vidljivo je da se većina genetičke varijacije pripisuje razlikama između glavnih klastera (1,9 %) s evidentnim protokom gena među populacijama unutar skupina (0,8 %). Nadalje, slični rezultati varijacije vidljivi su i prema podjeli rezultata glavnih komponenata (PCoA).

Tablica 3.2.4. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) komarče *Sparus aurata*, ovisno o podrijetlu ribe (divlje, mlađ, uzgajališno povezane i uzgojne), rezultatima programa STRUCTURE i PCoA analize, na osnovi 19 neutralnih mikrosatelitnih lokusa. Značajne vrijednosti temeljene na 10 000 permutacija su naznačene zvjezdicom (*).

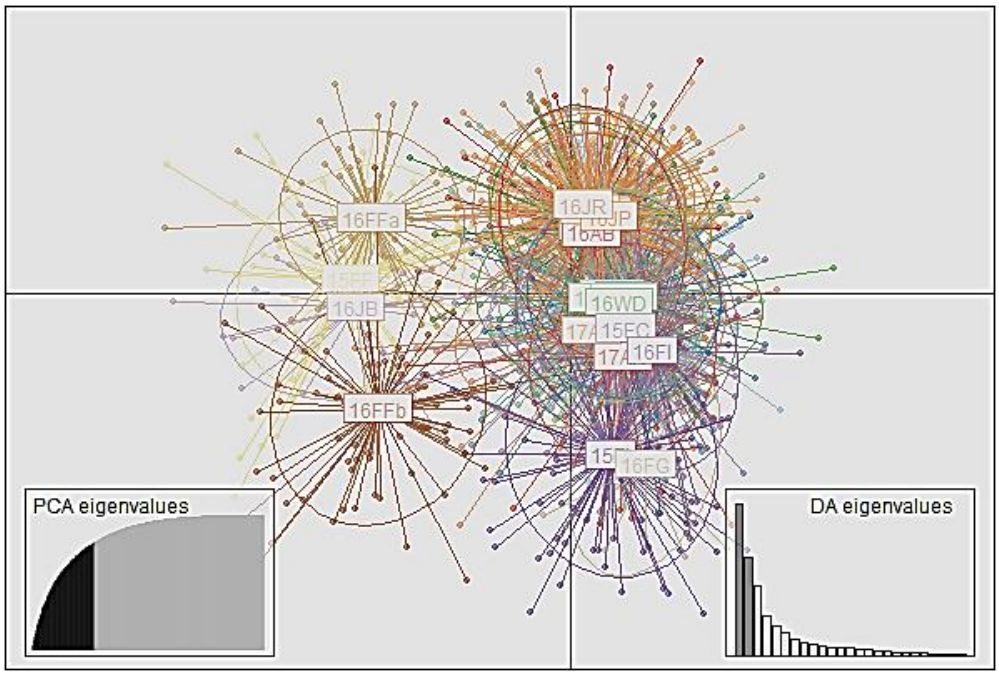
Izvor varijacije	Komponente varijance	% varijacije	F-statistika
(i) Jedna grupa			
Između populacija	0,181	2,346	F_{ST}=0,002*
Unutar populacija	7,542	97,653	
(ii) divlje *vs* **mlađ** *vs* **uzgajališno povezane** *vs* **uzgojne populacije (s povijesnom populacijom)**			
Između grupa	0,022	0,280	F_{CT}=0,002*
Između populacija unutar grupa	0,164	2,127	F_{SC}=0,021*
Unutar populacija	7,542	97,592	F_{ST}=0,024*
(iii) divlje *vs* **mlađ** *vs* **uzgajališno povezane** *vs* **uzgojne populacije (bez povijene populacije)**			
Između grupa	0,025	0,330	F_{CT}=0,003*
Između populacija unutar grupa	0,134	1,745	F_{SC}=0,017*
Unutar populacija	7,538	97,924	F_{ST}=0,021*
(iv) Prema PCoA analizi (bez povijesne populacije)			
Između grupa	0,102	1,324	F_{CT}=0,013*
Između populacija unutar grupa	0,075	0,975	F_{SC}=0,010*
Unutar populacija	7,538	97,701	F_{ST}=0,032*
(v) Prema STRUCTURE analizi (bez povijesne populacije)			
Između grupa	0,147	1,902	F_{CT}=0,019*
Između populacija unutar grupa	0,062	0,799	F_{SC}=0,008*
Unutar populacija	7,543	97,299	F_{ST}=0,027*

Sličan obrazac strukturiranosti populacija komarče potvrdila je i diskriminantna analiza glavnih komponenata (DAPC) s raspodjelom genetički sličnih populacija uočenih kod Bayesove analize klasteriranja implementirane u programu STRUCTURE. Pregib krivulje vrijednosti Bayesovog informacijskog kriterija (BIC) ukazuje na optimalan broj klastera K = 10 (Slika 3.2.3.).

(i)



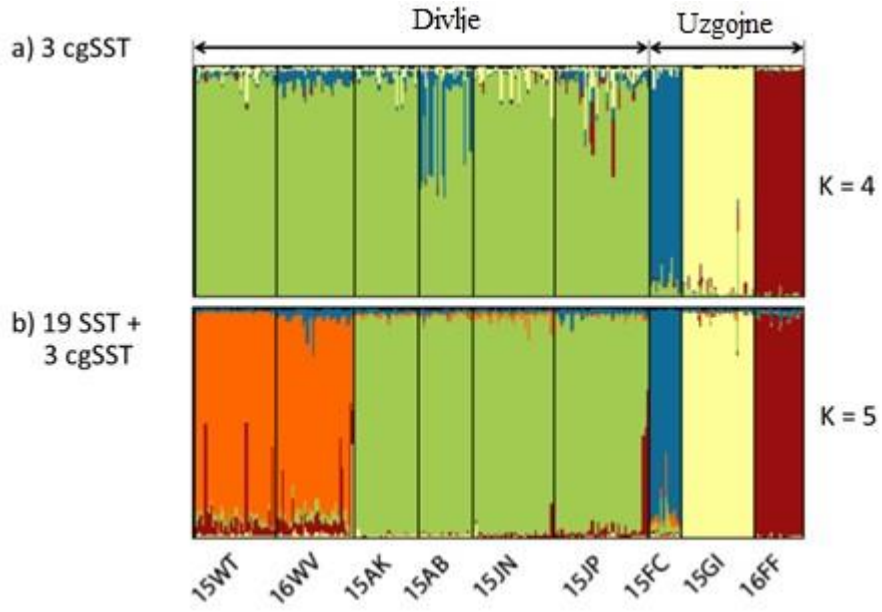
(ii)



Slika 3.2.3. Na gornjoj slici (i) je prikazan odabir optimalnog broja klastera prema Bayesovom kriteriju (engl. *Bayesian information criterion*, BIC), a na donjoj slici (ii) je prikaz distribucije populacija po genetičkoj sličnosti dobiven diskriminantnom analizom glavnih komponenti (DAPC).

Strukturiranost podskupa genotipova, cgSST seta podataka (9 populacija komarče različitog podrijetla), utvrđena je korištenjem računalnog programa STRUCTURE, gdje je inicijalna analiza sugerirala postojanje četiri klastera (K = 4) (Slika 3.2.4a.), te su sve uzgajane populacije različitog podrijetla svrstane u tri odvojena klastera (plavi, žuti, crveni), za razliku od divljih populacija (odrasli, mlađ, divlje uzgajališno povezane) koje su pokazale homogenost i dodijeljene su četvrtom klasteru. Daljnja strukturiranost nije uočena u divljim populacijama što ukazuje da tri lokusa povezana s genima kandidatima imaju snagu detekcije

selekcijskog pritiska u ispitivanim uzgojnim populacijama, dok za divlje populacije to pak nije slučaj. Nadalje, genotipovi 19 neutralnih mikrosatelitnih lokusa pridruženi su podskupu cgSST podataka. Divlje populacije slijedile su definiranu strukturu opaženu u SST setu podataka. Populacije divljih jedinki izdvojile su se u zaseban klaster (15WT i 16W; narančasti), a uzgajališno povezane i mlađ u drugi klaster (zeleni), sugerirajući tako postojanje pet klastera K = 5 (Slika 3.2.4.b).



Slika 3.2.4. Bayesova STRUCTURE analiza podskupa seta podataka genotipova komarče *Sparus aurata* temeljene na a) 3 mikrosatelitna lokusa povezana s genima kandidatima (3cg SST), b) kombinaciji tri lokusa povezana s genima kandidatima i 19 neutralnih mikrosatelitnih lokusa, (19SST 3 + 3cgSST).

S obzirom na veliku genetičku sličnost mlađi i uzgojno povezanih populacija iz 2015. i 2016. godine, korištenjem 95 % kritične vrijednosti LOD-a koji je implementiran u programu CERVUS, identificirano je ukupno 6 parova roditelja i potomaka koji povezuju mlađ u blizini glavnih rastilišta (Neretva, Raša i Pantana) s roditeljima uzorkovanim u neposrednoj blizini uzgajališta tuna. Tri juvenilne jedinke komarče uzorkovane 2015. godine na ušću rijeke Neretve povezane su s roditeljima uzorkovanima oko uzgajališta tuna u akvatoriju otoka Ugljan (15AK), dvije iz ušća rijeke Raše (2016.) i jedna s Pantane (2015.) dovedene su u vezu s roditeljima uzorkovanim oko uzgajališta tuna na otoku Braču (15AB). Nadalje, nisu

utvrđeni parovi roditelja i potomstva između divljih populacija uzorkovanih duž obale Jadrana i uzorkovane mlađi.

3.3. Identifikacija hibrida

Analiza tri simulirana seta podataka s različitim udjelima hibrida (15 %, 33 % i 66 %) ukazala je da su Q vrijednosti od 0,85 i 0,90 najbolji pragovi za pridruživanje individua u čiste ili miješane skupine empirijskog seta podataka, balansirajući između učinkovitosti i točnosti pridruživanja prilikom testiranja ukupne sposobnosti programa STRUCTURE u prepoznavanju hibrida (Prilog: Tablica 7.3).

Učinkovitost pridruživanja jedinki u skupine (a) čistoj liniji roditelja, (b) prvoj i drugoj generaciji hibrida uzgojnog ili divljeg podrijetla kao i (c) generaciji povratnog križanja F1 s čistom linijom roditelja, bila je najveća u simuliranom setu s 10 % hibrida, osim za generaciju povratnog križanja zbog većeg preklapanja jedinki s roditeljskim razredima. Greška u pridruživanju jedinki u generacije povratnog križanja opadala je s povećanjem udjela hibrida u skupu podataka (Prilog: Slika 7.1.). Ipak, niska razina razlučivanja jedinki podrijetlom iz generacije povratnog križanja je utjecala na ukupnu učinkovitost i točnost prepoznavanja hibrida, s obzirom da je takvu pripadnost izrazito zahtjevno prepoznati, a što je u konačnici utjecalo na razinu preporučenih pragova koja se kretala od 0,73 do 0,95 za udio hibrida F1 i F2 *vs* udio ukupnih hibrida generacije koji se kretao od 0,73 do 0,89 (Prilog: Tablica 7.3). Uspoređujući rezultate dobivene programima STRUCTURE i NewHybrid, uočen je relativno sličan obrazac pridruživanja jedinki, osim za skupinu od 66 % hibrida gdje je prepoznata visoka pogreška pridruživanja čistih uzgojnih jedinki hibridnim skupinama što je utjecalo na uspješnost identifikacije primjenom NewHybrid programa.

Analizom ukupnog seta SST podataka i primjenom praga od 0,9 pri razlučivanju pripadnosti jedinki, programom STRUCTURE je 75 % divljih jedinki dodijeljeno jednom od dva prepoznata klastera s isključivo divljim podrijetlom. Međutim, prepoznata je i recipročna hibridizacija divljih jedinki dodijeljenih klasterima divljeg podrijetla (narančasti i zeleni), od kojih je 14 % divljih adulta i 17,4 % uzgajališno povezanih jedinki i mlađi pokazalo miješanu pripadnost klasterima. Nadalje, 2,5 % jedinki iz zelenog klastera je u potpunosti pridruženo narančastom klasteru, kao i suprotno u 4,5 % slučajeva.

Unutar 25 % divljih jedinki koje nisu pridružene skupini čisto divljeg podrijetla, 10 % ih je pokazalo čisto uzgojno podrijetlo i 15 % uzgojno-hibridno podrijetlo, uključujući hibride različitog uzgojnog podrijetla, bilo atlantskog ili zapadno i istočno jadranskog (Tablica 3.3.1). Slični rezultati pripadnosti jedinki su uočeni primjenom programa NewHybrids koristeći prag od q > 0,5 pri razlučivanju podrijetla, gdje su svi hibridi dodijeljeni F1 generaciji (Tablica 3.3.1). U divljim populacijama opaženi su različiti udjeli hibrida, s frekvencijama u rasponu od 0 do 65 %. Općenito, najniža zastupljenost hibrida zabilježena je u populacijama mlađi (3-13 %), dok je najviša zastupljenost hibrida prepoznata u divljim populacijama uzorkovanim u područjima pod utjecajem uzgajališta tuna (17AK, 65 %; 17AB, 37 %). Nadalje, sve jedinke populacije (16JB) uzorkovane na uzgajalištu tuna u Uvali Grška (o. Brač) dodijeljene su atlantskom uzgojnom podrijetlu (86,7 %) ili su identificirane kao hibridi (13,3 %). Jedinke čistog uzgojnog podrijetla i vjerojatno nedavni prebjezi pronađeni su i u uzgojno povezanim populacijama (17AK i 17AB), te u divljim populacijama (16WR, 16WV i 16WK) s frekvencijama hibrida od 6 do 43 % (Tablica 3.3.1).

Tablica 3.3.1. Zastupljenost hibrida komarče *Sparus aurata* uzgojnog podrijetla ili jedinki uzgojnog podrijetla unutar divljih populacija koristeći programe STRUCTURE i NewHybrids. Utjecaj uzgojnog podrijetla u svakoj populaciji istaknut je bojama (plava, ružičasta, crvena) ovisno o pripadnosti trima uzgojnim populacijama.

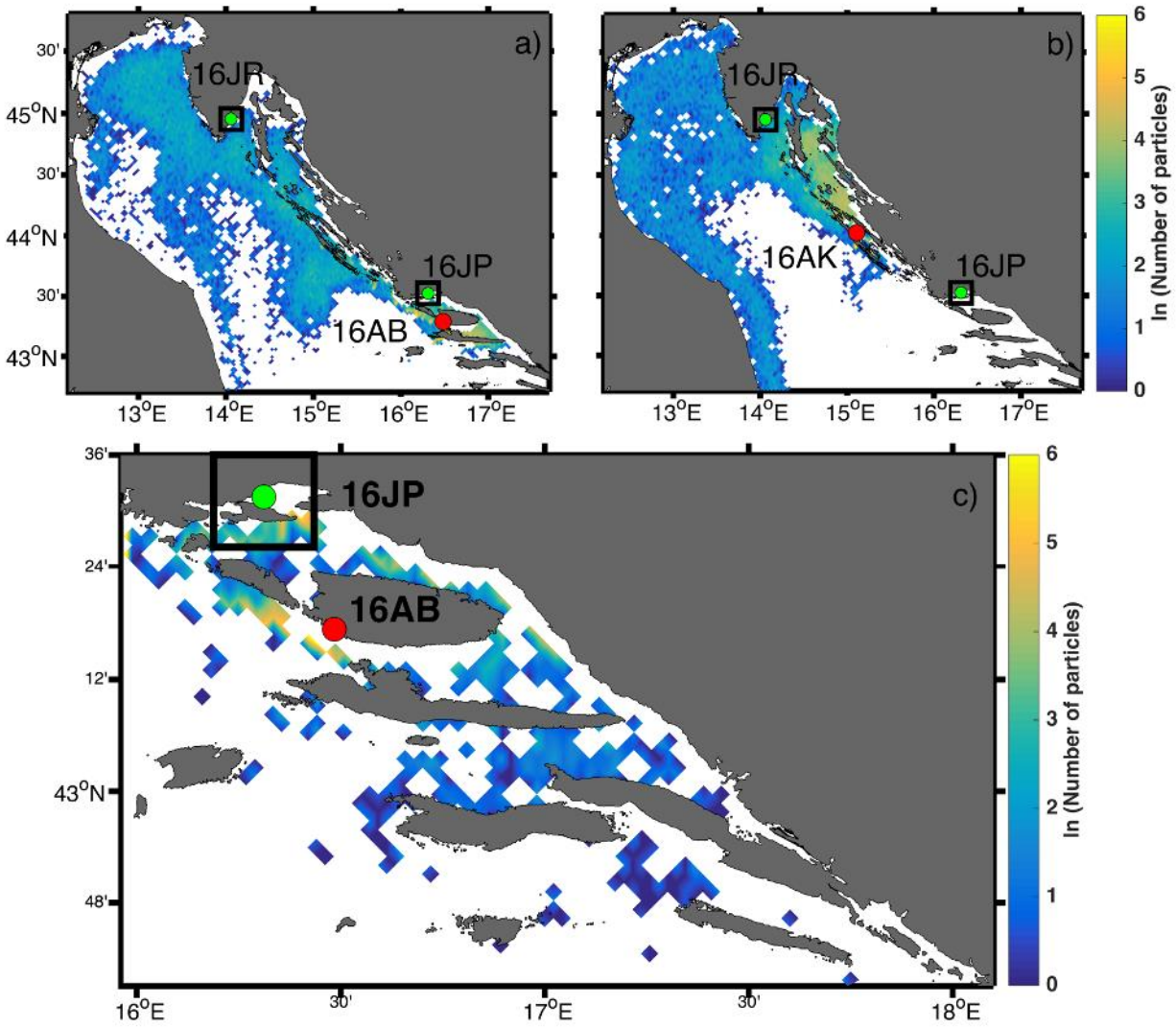
		STRUCTURE								NewHybrids	
		Hibridi uzgojnog podrijetla (%) 0.1 < q < 0.9				Uzgojno podrijetlo (%) q > 0.9				q > 0.5	
Divlje pop	Podrijetlo	Istočno jadransko podrijetlo	Zapadno jadransko podrijetlo	Atlantsko podrijetlo	Ukupno/	Istočno jadransko podrijetlo	Zapadno jadransko podrijetlo	Atlantsko podrijetlo	Ukupno/	F1 hibridi (%)	Uzgojno podrijetlo (%)
15WT	W	11,5	-	-	11,5	-	-	-	-	13,1	-
15WN	W	9,2	2,6	3,9	15,7	1,3	-	-	1,3	15,7	2,9
16WR	W	4,0	2,7	-	6,7	6,7	-	-	6,7	27,8	5,6
16WU	W	8,1	-	-	8,1	2,7	-	-	2,7	25,7	2,9
16WV	W	7,4	3,0	1,5	11,9	5,9	-	-	5,9	15,4	4,6
16WK	W	12,5	4,2	8,3	25,0	16,7	-	-	16,7	25,0	12,5
16WD	W	12,5	6,3	6,2	25,0	-	-	-	-	40,0	-
15AK	WA	6,6	-	-	6,6	-	2,2	-	2,2	2,1	-
15AB	WA	-	2,2	-	2,2	-	-	-	-	2,7	-
15AV	WA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16AK	WA	4,5	-	2,3	6,8	2,2	-	-	2,2	7,3	-
16AB	WA	2,2	6,7	-	8,9	2,2	-	-	2,2	2,4	4,9
17AK	WA	48,3	10,0	6,7	65,0	43,3	-	-	43,3	50,9	30,2
17AB	WA	22,7	1,3	13,3	37,3	22,6	-	6,7	29,3	40,4	15,8
15JP	YoY	2,9	-	0,9	3,8	-	-	-	-	1,9	-
15JN	YoY	3,1	1,6	3,1	7,8	-	-	-	-	4,8	-
16JP	YoY	5,0	-	-	5,0	-	-	-	-	-	-
16JR	YoY	-	-	3,4	3,4	-	-	-	-	-	-
16JB	YoY	-	3,3	10,0	13,3	-	-	86,6	86,6	-	100
Ukupno Hibrida / uzgoja					14,8				9,9	14,9	8,0

pop, populacije; q, raspon pridruženosti; W, divlji adulti; WA, uzgajališno povezani adulti; YoYs, mlađ.

3.4. Povezanost područja mrijesta i rastilišta

Korištenjem uparenog modelskog sustava koji se sastojao od oceanografskog modela ROMS i disperzijskog individualno temeljenog modela Ichthyop, testirana je hidrodinamička povezanost lokacija na kojima je uzorkovana mlađ komarče (Pantana kod Trogira i Raša u Istri) i lokacija unutar uzgajališta tuna na kojima su uzorkovani potencijalni roditelji (o. Brač, o. Ugljan) gdje je simulirana disperzija planktonskih embrija komarče.

Prostorna raspodjela čestica 15. svibnja 2016. dobivena simulacijom oceanografskog modela ROMS i disperzijskog individualno temeljenog modela Ichthyop pokazala je hidrodinamičku povezanost uzgajališta na otoku Braču, kao potencijalnog mrijestilišta, s prirodnim rastilištima u blizini rijeke Pantan u srednjem Jadranu i rijeke Raše u istočnom dijelu istarskog poluotoka (Slika 3.4.1.a). Ista simulacija navedenog modela pokazala je povezanost otoka Ugljana i rijeke Raše (Slika 3.4.1b). Istočna jadranska struja (IJS) koja je istaknuta i jača u južnim i središnjim dijelovima sliva tijekom zime, proljeća i jeseni, transportirala je čestice s otoka Brača i Ugljana do rijeke Raše. Simulacija Ichthyop - ASHELF2 ROMS modela za isti datum jasno je pokazala povezanost između područja uzgoja u blizini otoka Brača i Pantane kao prirodnog rastilišta (Slika 3.4.1.c). Čestice s Brača i čestice s Ugljana u jadranskoj simulaciji su transportirane istočnom jadranskom strujom (Žužul i sur. 2019).



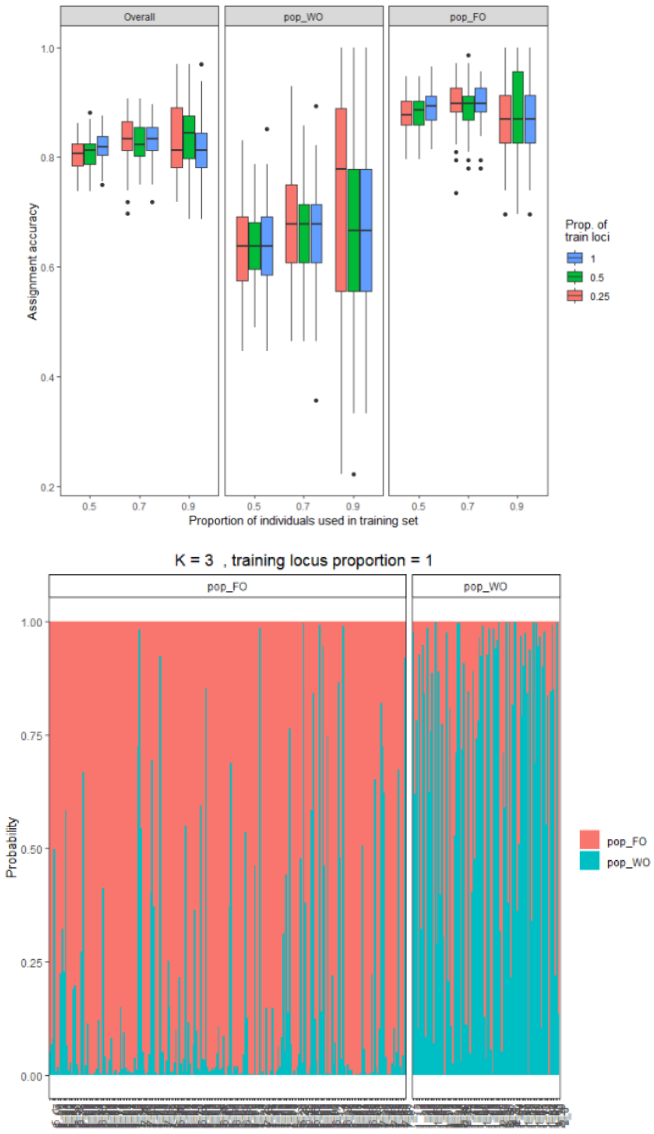
Slika 3.4.1. Prostorna raspodjela čestica dobivena simulacijom oceanografskog modela ROMS i disperzijskog individualno temeljenog modela Ichthyop pokazuje povezanost otoka Ugljana i rijeke Raše (b) i ukazuje na povezanost uzgajališta tuna na Braču s ušćem rječice Pantana u istočnom Jadranu(a,c).

3.5. Uparivanje molekularnih i morfoloških podataka

Na podskupu uzorkovanih populacija divljeg (15WN, 16WK) i uzgojnog podrijetla (15FC, 15FI i 15FF) testirana je populacijska pripadnost pojedinih jedinki koristeći višelokusne i morfometrijske setove podataka. Klasifikacijski uspjeh morfometrijskih, višelokusnih i uparenih morfometrijskih i višelokusnih podataka s obzirom na podrijetlo ribe je bio izrazito visok (> 80%). Primjenom 19 neutralnih mikrosatelitnih biljega na poznatom setu podataka uspješno su pridružene jedinke divljem (WO), odnosno uzgojnom (FO) podrijetlu s točnošću od 89 % za uzgojne jedinke i 67 % za divlje jedinke (Slika 3.5.1.).

a)

b)

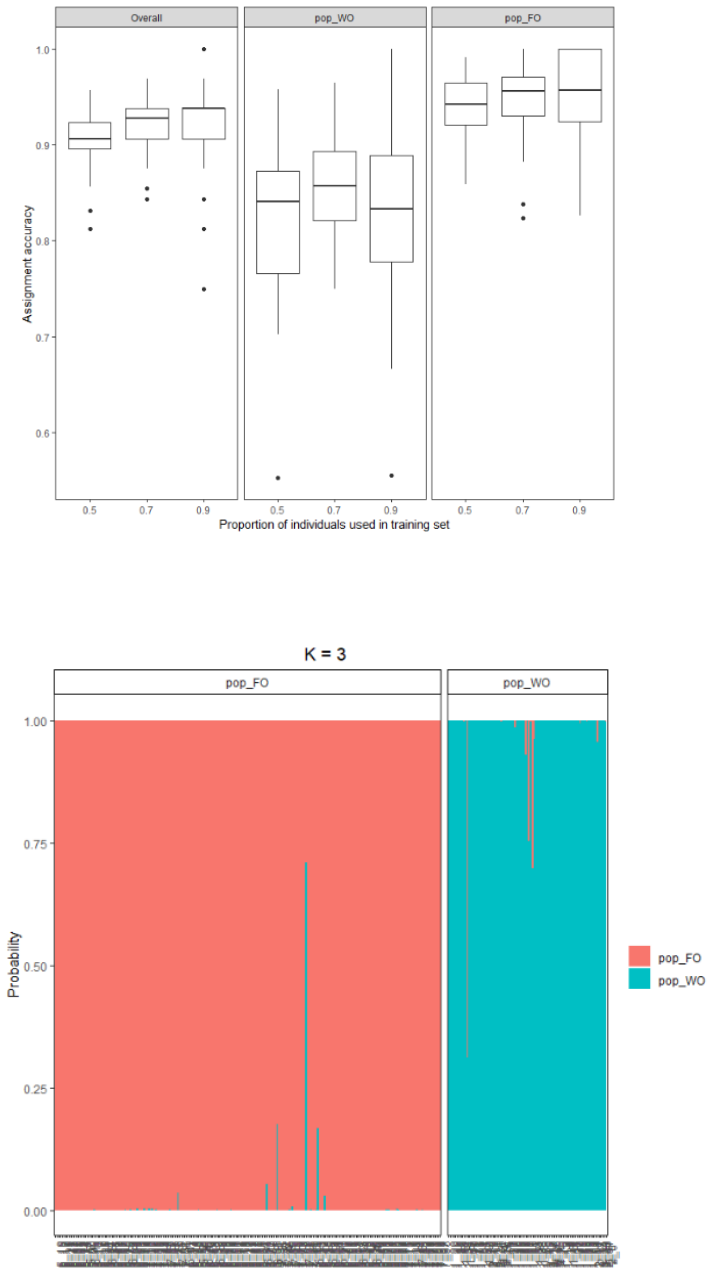


Slika 3.5.1. Klasifikacijski uspjeh (a) i genetička pridruženost jedinki komarče (b), *Sparus aurata*, različitog podrijetla, u pripadajuće klastere. Crvenom klasteru su pridruženi uzgojni genotipovi, a plavom klasteru divlji genotipovi.

Morfometrijski podatci, odnosno morfološka svojstva sadržavala su mjerenja od 18 homolognih anatomskih točaka. Procjenom poznatog seta podataka koji je sadržavao morfološka svojstva jedinki, uzgojne jedinke (FO) su kvantificirane s točnošću od 95 %, a divlje (WO) s točnošću od 84 %.

a)

b)

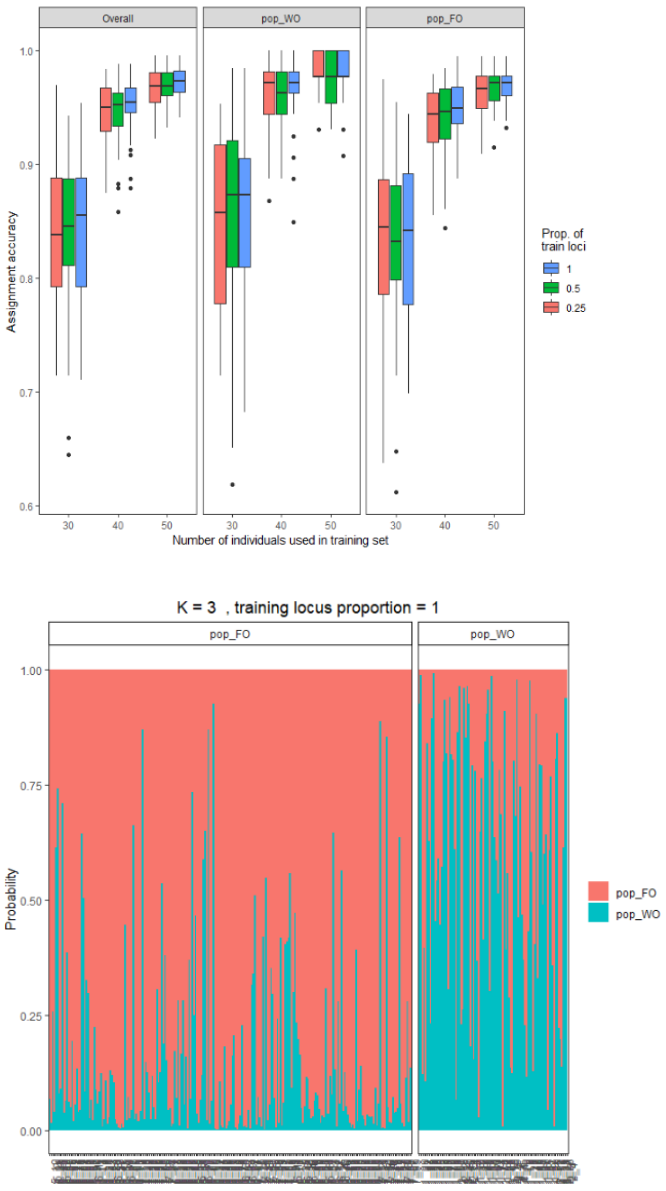


Slika 3.5.2. Klasifikacijski uspjeh (a) i rezultat pridruženosti morfoloških osobina jedinki (b) komarče, *Sparus aurata*, različitog podrijetla, u pripadajuće klastere. Crvenom klasteru su pridružene uzgojni morfološke osobine, a plavom klasteru divlje morfološke osobine.

Morfološka i višelokusna svojstva ispitivanih jedinki poznatog podrijetla uparena su u jedan cjeloviti ulazni set podataka. U uparenom setu podataka uzgojne jedinke su pridružene s točnošću od 91 %, a divlje jedinke s točnošću od 93 %.

a)

b)

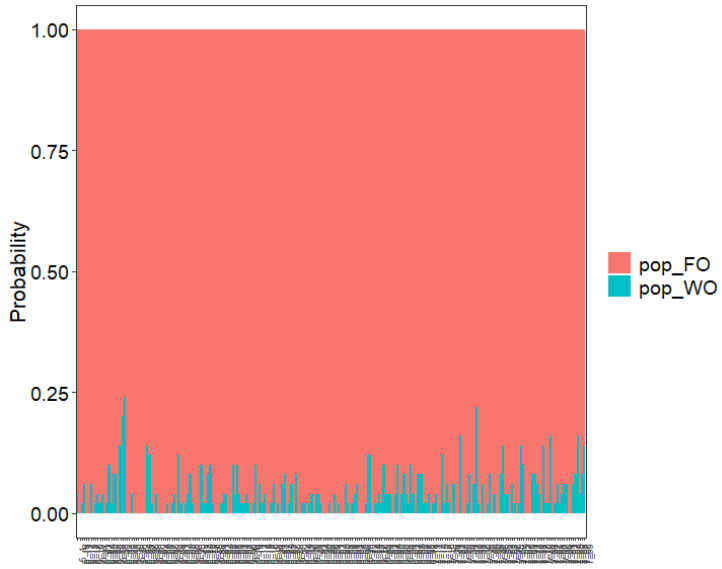


Slika 3.5.3. Klasifikacijski uspjeh (a) i rezultat pridruženosti integriranih morfoloških osobina i genotipova komarče *Sparus aurata* različitog podrijetla u pripadajuće klastere (b). Crvenom klasteru su pridružene uzgojne osobine, a plavom klasteru divlje osobine.

S obzirom da je klasifikacijski uspjeh jedinki bio visok, cjelokupni osnovni set podataka može se primijeniti u testiranju pripadnosti jedinki nepoznatog podrijetla, odnosno za određivanje njihove izvorne populacijske pripadnosti (uzgojne ili divlje).

U svrhu testiranja točnosti pridruživanja jedinki nepoznatog podrijetla odgovarajućoj populaciji, uzgojne jedinke koje su okarakterizirane kao jedinke nepoznatog podrijetla testirane su algoritmom strojnog učenja assignPOP R paketa. Testirane jedinke s izrazito su velikim postotkom (> 90 %) pridružene uzgojnoj populaciji, potvrđujući točnost i preciznost primjene modela (Slika 3.5.4.).

Provedba ovog ispitivanja je imala za cilj provjeru funkcionalnosti algoritma strojnog učenja assignPOP R paketa u klasifikaciji jedinki nepoznatog podrijetla. Daljnji razvoj primjene paketa na način da se broj biljega minimalizira zadržavajući točnost klasifikacijskog uspjeha se provodi u okviru Laboratorija za akvakulturu Instituta za oceanografiju i ribarstvo.



Slika 3.5.4. Pridruživanje jedinki komarče, *S. aurata*, nepoznatog podrijetla odgovarajućoj populaciji. Crvenom klasteru su pridružene jedinke uzgojnog podrijetla, a plavom jedinke divljeg podrijetla.

4. RASPRAVA

U svrhu raspoznavanja varijabilnosti i strukture populacija komarče u istočnom Jadranu kao molekularni biljezi korišteni su mikrosateliti, odnosno korištena su dva multipleksa koja su se sastojala od 19 neutralnih mikrosatelitnih lokusa i jednog multipleksa koji se sastojao od tri lokusa povezana s genima kandidatima. Standardizirani set neutralnih mikrosatelitnih lokusa, posebno dizajniranih za komarču, pokazao se robusnim i učinkovitim u analizi podrijetla i karakterizaciji populacija, dok su se tri lokusa povezana s genima kandidatima pokazala učinkovitima u karakterizaciji populacija uzgojnog podrijetla. Alelni polimorfizmi i očekivana heterozigotnost su usporedivi s onima promatranima u divljim i uzgojnim populacijama atlantskog i mediteranskog podrijetla komarče (Franchini i sur. 2012; García-Celdrán 2016), s izraženijom genetičkom raznolikošću lokusa odnosno populacija u usporedbi s prethodnim istraživanjima u istočnom Jadranu gdje je korišteno deset mikrosatelitskih biljega (Šegvić-Bubić i sur. 2011b; Šegvić-Bubić i sur. 2014).

Većina uzgojnih populacija je pokazala odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, vjerojatno zbog nenasumičnog parenja i miješanja populacija (Brown i sur. 2005; Karaiskou i sur. 2009; Loukovitis i sur. 2012) što je potvrđeno prethodnim istraživanjima u Jadranu (Šegvić-Bubić i sur. 2011b). Slična podudarnost u odstupanju od Hardy-Weinbergove ravnoteže utvrđena je analizom populacija lubina u Jadranu (Šegvić-Bubić i sur. 2017). Dodavanje divlje ribe u u matično jato i miješanje uzgojnih matica je uobičajena praksa posebice u slučaju komarče. S obzirom na njihovu protandričnost i rano sazrijevanje, divlji mužjaci komarče se kontinuirano uvode u mrijest s ciljem postupne inverzije spola i pretvaranja u funkcionalne ženke (Power i sur. 2011). Štoviše, problem nenasumičnog križanja je naglašen u matičnjacima komarče gdje u kontroliranoj reprodukciji svojstvo protoandričnog hermafroditizma omogućava korištenje iste jedinke, najprije kao mužjaka, a kasnije kao ženke (Karaiskou i sur. 2009).

U Jadranu je još uvijek prisutan ispodprosječan, razmjerno mali broj alela po lokusu, odnosno niže bogatstvo alela, heterozigotnost i efektivna veličina u uzgojnim populacijama nasuprot divljima. Smanjena genetička raznolikost kao odraz male efektivne veličine uzgojne populacije je posljedica visokog odstupanja u veličini matičnog stoka i manjem broju mužjaka u odnosu na ženke pri svakom mrijestu (Brown i sur. 2005).

Iako su procjene efektivne veličine populacije istraživanih jedinki bile značajno manje u populacijama iz uzgoja nego u drugim divljim populacijama, većina uzgojnih populacija imala je vrijednost F_{IS}-a blizu nule, što upućuje na to da su genetički uzgojni programi implementirani u komercijalnim mrijestilištima u mediteranskim državama vođeni s ciljem smanjenja rizika križanja (Chavanne i sur. 2016). Naime, fiksacijski indeks F_{IS} predstavlja odnos između razlika očekivane i uočene heterozigotnosti gdje fiksacijski indeks na razini vrijednosti nula ili neznatno oko vrijednosti nula znači da je populacija u ravnoteži, pa je prisutan proces panmiksije u populaciji. Međutim, kad F_{IS} indeks poprimi pozitivne vrijednosti znatno veće od nule, što je utvrđeno kod nekoliko ispitivanih populacija komarči, to sugerira višu razinu homozigotnosti od one predviđene uvjetima ravnoteže. Takvo stanje se može pripisati križanju srodnih individua zbog relativno male veličine populacija što je čest slučaj u selekcijskim programima uzgojnih vrsta.

Smanjena heterozigotnost i značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže uočena je u jadranskim divljim populacijama na nekim lokusima, ali ne sustavno za svaki lokus, što se objašnjava privremenim Wahlundovim efektom (Rosenberg i sur. 2004) uzrokovanim prirodnom ili umjetnom selekcijom ili zbog prisustva nekoliko reproduktivnih subpopulacija u uzorku (Karaiskou i sur. 2009; Šegvić-Bubić i sur. 2011b; Šegvić-Bubić i sur. 2014). Naime, ljudski posredovana selekcija u marikulturi može generirati tendenciju prema bržem rastu, ranom sazrijevanju i većem reproduktivnom ulaganju, pri čemu su posljednje dvije karakteristike već primijećene u određenim populacijama komarče iz istočnog Jadrana (Talijančić i sur. 2019), što se može odraziti i na genetički sastav populacija. Osim toga, uočene su i značajne morfološke razlike komarči oko uzgajališta i iz prirodnih staništa primjenom metoda geometrijske morfometrije (Talijančić i sur. 2019). Zdepastiji oblik tijela, manji profil glave sa superiornim položajem usta uočen je kod komarči uzgojnog podrijetla, dok su komarče divljeg podrijetla imale izduženiji oblik tijela sa supterminalnim položajem usta, što je u skladu s rezultatima Arechavala-Lopez i sur. (2012a). Naime, ovisnost promjene oblika glave i navike hranjenja kao rezultat prilagodbe dostupnosti i ponašanju plijena različite veličine je već prepoznata kod komarči (Russo i sur. 2007). Divlje komarče oko uzgajališta tuna okarakterizirane su s izraženijom visinom tijela i podtrbušnom regijom u usporedbi s divljim populacijama. Primjena kanoničke analize pri klasifikaciji jedinki po podrijetlu (divlje, uzgojno i uzgojno-povezano) u odnosu na oblik tijela, pokazala je točnost pridruživanja jedinki od 84,01 % (Talijančić i sur. 2019). Slični rezultati klasifikacijskog uspjeha jedinki divljeg i uzgojnog podrijetla zabilježeni su u populacijama Malostonskog

zaljeva (Šegvić-Bubić i sur. 2014), u području gdje je opisana epizoda bijega uzgojnih komarči u prošlom desetljeću (Glamuzina i sur. 2014). Klasifikacijski uspjeh vrednovanja ribljeg podrijetla koja je temeljena na morfometrijskim podacima je u skladu s genetičkim istraživanjima pripadnosti jedinki (Šegvić-Bubić i sur. 2011a, 2014), gdje je prepoznata introgresija uzgojnog genotipa komarče od 10 % u prirodnim staništima istočnog Jadrana (Žužul i sur. 2019).

Iako je komarča važna komercijalna vrsta za akvakulturu i ribarstvo, postoje brojne nepoznanice u njenoj biologiji, napose u populacijskim obilježjima. Različiti tipovi molekularnih biljega sugeriraju nedosljedne i zbunjujuće obrasce genetičke povezanosti populacija između različitih regija Sredozemnog mora i Atlantika. Dok su određeni autori prepoznali nisku razinu strukturiranosti populacija iz Atlantika i Mediterana (Ben-Slimen i sur. 2004; Coscia i sur. 2011), drugi su pak utvrdili snažnu genetičku razjedinjenost unutar bazena Sredozemnog mora (Ben-Slimen i sur. 2004; Šegvić-Bibić i sur. 2011b). Istraživanja populacijske strukture komarče na višegodišnjoj skali izostaju što onemogućuje formiranje šire slike populacijske strukture. Naime, varijabilnosti reprodukcijskog uspjeha divljih jedinki, uspješan pronalazak partnera/jata i oceanografski uvjeti tijekom mrijesta i ličinačkog razvoja (Hedgecock & Pudovkin 2011) mogu značajno utjecati na genetičku strukturu populacija na široj i užoj prostornoj skali i uzrokovati temporalni diskontinuitet u populacijskim odnosima. Stoga, nedosljedni obrasci populacijske strukture divlje komarče koji se iščitavaju iz različitih literaturnih navoda, mogu se dovesti u vezu s izvorom varijabilnosti koji je generiran reprodukcijskim uspjehom vrste.

S druge strane, uzgojna riba uglavnom čini genetički izdvojenu grupu u usporedbi s divljim srodnicima (Alarcón i sur. 2004; Karaiskou i sur. 2009; Loukovitis i sur. 2012). Spomenuti obrazac je potvrđen i u ovom istraživanju. Naime, glavni izvor genetičke diferencijacije je uočen između uzgojnih populacija različitog podrijetla (F_{ST} = 0,041 za SST; F_{ST} = 0,076 za cgSST) i između uzgojnih i divljih populacija. Izuzetak su interakcije uzgojnih populacija s divljim populacijama uzorkovanim u blizini uzgajališta tuna (17AB, 17AK, 16JB) u kojima je zabilježen velik broj prebjega/hibrida. Sličan obrazac divergentnih svojstava između i unutar uzgajanih populacija prepoznat je i za druge uzgajane vrste (Glover i sur. 2012; Šegvić-Bubić i sur. 2017) dovodeći u vezu selekcijske postupke za fenotipska svojstva u proizvodnom ciklusu, odvajanja male grupe jedinki od jata pri formiranju matičnjaka i možebitni genetički otklon kao uzroke za uočeni obrazac.

Među divljim populacijama zabilježene su genetičke razlike, ali samo za podatke vezane za SST skup (FST = 0,012). Dok divlje odrasle jedinke s prirodnih staništa pokazuju homogeni genetički obrazac duž hrvatske obale, divlje odrasle jedinke uzorkovane oko uzgajališta tuna, zajedno s divljom mlađi skupljene na lokacijama tri obalna rastilišta, pokazuju višegodišnju genetičku povezanost i jasan prekid protoka gena prema divljim jedinkama s prirodnih staništa.

Na maloj prostornoj ljestvici takva nepovezanost protoka gena kod različitih skupina divljih riba pruža sasvim nov uvid u dinamiku i genetičku strukturiranost populacija komarče, s obzirom da su prethodna istraživanja, koja su koristila manji broj lokusa, ukazala na izostanak strukture divljih populacija u Jadranu (Šegvić-Bubić i sur. 2011b; Franchini i sur. 2012). Niske vrijednosti F_{ST}-a i visok protok gena kod morskih ribljih vrsta, naročito kod vrsta s pelagičnom fazom ličinačkog razvoja, ne upućuju nužno na nedostatak populacijske strukture (Waples, 1989). Primijećene razlike mogu biti rezultat različite informativnosti korištenih molekularnih biljega. Naime, simpatrične vrste *Mullus barbatus* i *Mullus surmuletus*, obje s niskim vrijednostima parametra F_{ST} (0,01-0,02) pokazuju značajnu genetičku odvojenost unutar Jadranskog mora na području južnojadranske kotline, dok je istočni dio Otrantskih vrata prepoznat kao privremena barijera protoka gena (Matić-Skoko i sur. 2018).

Opseg distribucije i migracije adulta komarče još je uvijek relativno nepoznat (Sola i sur. 2006), iako relativno dugo razdoblje ličinačkog razvoja u pelagičnom okolišu do 50 dana na 17-18°C vjerojatno pridonosi razmjeni migranata među populacijama (Shanks, 2009). Uzimajući u obzir da se divlje odrasle jedinke pojavljuju u velikim jatima tijekom kasne jeseni i zime (reprodukcijska agregiranost), uočene genetičke razlike kod divljih juvenilnih jedinki mogle bi se objasniti činjenicom da te populacije funkcioniraju kao neovisne jedinke i provode isključivo trofičku migraciju od sjevera ka jugu duž istočne obale Jadrana, a mrijest se događa drugdje. Ovo je dodatno potkrijepljeno analizom srodnosti, gdje nije utvrđena roditeljska veza između gore spomenutih divljih jedinki s prirodnih staništa i mlađi. Stoga možemo svrstati populacije divlje komarče u dvije skupine: odrasle jedinke koje migriraju i rezidentne jedinke (populacije oko uzgajališta), čija se područja mrijesta međusobno ne preklapaju.

Zbog visokog kapaciteta rasprostranjenosti proučavane vrste, ove dvije skupine ne smatraju se potpuno izoliranim, obzirom da je STRUCTURE analiza identificirala dvosmjerni obrazac križanja pri nižim frekvencijama (< 17 %). Na istočnoj obali Jadranskog mora

migratorne populacije najprije se pojavljuju tijekom jeseni u sjeveroistočnim dijelovima obale (Istra i Kvarner) i postupno se spuštaju južnije, te stoga možemo nagađati da odrasle jedinke koje migriraju potječu iz talijanskih prirodnih laguna koje su vrlo važna rastilišta i hranilišta komarče duž zapadne obale (Mistri i sur. 2000). Međutim, za detaljan uvid genetičke povezanosti komarče na razini Jadranskog mora potrebno je dodatno prikupljanje uzoraka duž istočne i zapadne obale Jadrana.

Procjena efektivne veličine populacije za jedinke koje su uzorkovane oko uzgajališta tuna upućuju na postojanje velikog broja matičnih populacija, što je u skladu s nedavnim istraživanjima koja su opisala jadranska uzgajališta tuna kao područja cjelogodišnjeg i vrlo obilnog staništa divljih komarči (Stagličić i sur. 2017; Talijančić i sur. 2019). Ovaj obrazac agregacijskog ponašanja prvenstveno je pripisan trajnoj i povećanoj dostupnosti hrane za tune koja se sastoji od male plave ribe (srdele i haringe) bogate omega 3 i 6 masnim kiselinama. Nadalje, zbog stalnog unosa hrane namijenjene tunama u uzgoju, gdje dio hrane prolazi kroz oka mrežnog tega i postaje dostupna okolnim ribljim populacijama, divlja komarča oko kaveznih sustava je karakterizirana boljom tjelesnom kondicijom i gonado-somatskim indeksom naspram one iz prirodnog staništa (Stagličić i sur. 2017) što sugerira ujedno da komarča oko uzgajališta ima i veći reproduktivni potencijal. Pored uočenih morfoloških razlika komarči oko uzgajališta i iz prirodnih staništa, Talijančić i sur. (2019) su primjenom multinominalne logističke regresije uočili da je promjena spola od mužjaka prema ženki s povećanjem duljine ribe izraženija kod komarči oko uzgajališta tuna naspram komarči iz prirodnih staništa, ističući specifičnosti reproduktivne strategije vrsta u energetski bogatom okolišu. Složenost morfoloških i eko-fizioloških prilagodbi komarče u Jadranu na različite okolišne uvjete Talijančić i sur. (2019) objašnjavaju fenotipskom plastičnošću vrste. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su ribe izrazito plastične, odnosno prilagodljive novim uvjetima okoliša (Fiske i sur. 2005), međutim stupanj plastičnosti je vrsno specifičan i populacijski je varijabilan. Upravo zbog svojstva fenotipske plastičnosti, identifikacija prebjega koji se već duži vremenski period nalaze u prirodnim uvjetima predstavlja izazov za znanstvenike.

Značajna trofička podrška kod ribljih vrsta pozitivno utječe na mrijest i kasniji razvitak jaja i ličinki (Lanes i sur. 2012). Izražena genetička povezanost uzgajališno povezanih komarči i mlađi s tri obalna rastilišta upućuje na mogućnost da su uzgajališta tuna funkcionalna područja za mrijest komarče. Ovo saznanje je podržano rezultatima analize testa roditeljstva, gdje je uočeno šest parova roditelj-potomak, povezujući roditelje uzorkovane oko

uzgajališta na otoku Braču i Ugljanu s potomstvom iz sva tri rastilišta duž istočne obale Jadrana (Raša, Pantana i Neretva). Dodatno, upareni modelski sustav ROMS i Ichthyop, koji je uspješno primijenjen u istraživanjima distribucije potomstva tune u Jadranu (Džoić i sur. 2017), potvrdio je mogućnost pasivnog transporta embrija i ranih razvojnih stadija komarče od uzgajališta tuna s otoka Brača i Ugljana do rastilišta u akvatoriju rijeke Raše i Pantane u 2016. godini.

Sličan obrazac populacijske strukturiranosti komarče s istočne obale Jadrana je prepoznat primjenom multivarijantne i Bayesove analize klasteriranja, podržavajući uočene vrijednosti indeksa genetičke diferencijacije F_{ST} između parova populacija. Hijerarhijska strukturna analiza i DAPC analiza prepoznaju pripadnost jedinki iz ukupnog seta podataka u 10 različitih klastera, od kojih su 3 isključivo povezana s podrijetlom divljih populacija, a 7 s podrijetlom populacija iz uzgoja. Naime, zbog ograničenog broja nacionalnih mrijestilišta, još uvijek se izvjesna količina mlađi za potrebe uzgoja uvozi iz Francuske, Italije i Grčke. S obzirom da je riječ o genetički diferenciranim populacijama iz različitih uzgojnih linija i praksi, takva situacija povećava sposobnost programa u razlučivanju podrijetla i identifikaciji prebjega, što je evidentno iz broja klastera povezanih s uzgojnim jedinkama. Povijesna populacija iz 2009. formirala je zasebni klaster slijedom temporalnih promjena u frekvencijama alela. Kod nekoliko divljih populacija uočeno je značajno prisustvo uzgojnih genotipova, posebice u populacijama uzorkovanim u blizini uzgajališta tuna 2017. godine (17AK, 17AB), kada je zabilježen potpuni preokret u strukturi populacije u odnosu na 2015. i 2016. godinu. Oba uzgajališta tuna su smještena nekoliko kilometara od kaveznih uzgajališta komarče i moguće je da su prebjezi komarči iz obližnjih uzgajališta bili privučeni ostacima nepojedene hrane u vrijeme uzorkovanja. Naime, prisutnost drugih farmi utječe na obrazac kretanja ribe koja bježi iz drugih susjednih uzgajališta (Bridger i sur. 2001; Patterson i sur. 2013). Premda je više od polovice prebjega u ovoj studiji uzorkovano oko uzgojnih sustava, ukupan broj zbjegova zabilježen u divljim populacijama je iznosio oko 10 % što je u skladu s prethodnim istraživanjima povezanim s identifikacijom i kvantifikacijom prebjeglih organizama u prirodnom okolišu (Brown i sur. 2005; Šegvić-Bubić i sur. 2011b; Šegvić-Bubić i sur. 2014). U obalnim područjima, prostorna raspodjela prebjega je blisko povezana s uzgajalištima riba (Šegvić-Bubić i sur. 2017) u odnosu na otvorena morska područja gdje prebjezi migriraju od izvornog uzgajališta i s visokom stopom uspješnosti preživljavaju (Arechavala-Lopez i sur. 2011; Toledo-Guedes i sur. 2014). Pored toga, divlja mlađ (16JB) uzorkovana u blizini kaveznih instalacija na otoku Braču je prepoznata kao mlađ uzgojno-

atlantskog podrijetla i STRUCTURE programom je pridružena klasteru gdje pripadaju uzgojne populacije atlantskog podrijetla iz 2015. godine s otoka Brača. Zapaženi populacijski odnosi upućuju na mogućnost spontanog mrijesta uzgajanih komarči u kavezima. Ovakav obrazac već je prepoznat u Grčkoj (Dimitriou i sur. 2007) gdje su evidentirani zbjegovi putem oplođenih jaja iz kaveznih instalacija. Autori su skloni ovaj mehanizam povezati s povećanjem brojnosti populacija komarče u obalnim područjima Grčke (Dimitriou i sur. 2007).

Prema procjeni rizika utjecaja uzgoja na okoliš (Taranger i sur. 2015), uočeni broj prebjega u ovom istraživanju (< 10 %) predstavlja umjereni rizik za eventualne genetičke promjene divljih populacija. Međutim, u Jadranu su već zabilježene genetičke promjene populacijske strukture, uzimajući u obzir da divlje jedinke prikupljene tijekom ranijeg uzgojnog perioda u 2009. godini pokazuju značajno genetičko odstupanje od suvremenih divljih populacija. U slučaju atlantskog lososa, višegodišnja i kumulativna introgresija uzgojnih riba kao i gustoća i brojnost divljih populacija u prirodnim staništima prepoznati su kao glavni pokretači genetičkih promjena prirodnih populacija (Glover i sur. 2012; 2013).

Analizom simuliranog seta podataka koji je uključivao (a) čiste roditeljske linije divljeg i uzgojnog podrijetla, (b) hibride uzgojnog i divljeg podrijetla prve i druge generacije kao i (c) potomke povratnog križanja F1 i F2 s čistom linijom roditelja, programima STRUCTURE i NewHybrid je uočeno da SST set podataka osigurava potrebnu rezoluciju pri identifikaciji hibrida prve generacije, ali nije učinkovit u razlikovanju potomaka povratnog križanja F1 i F2 s čistom linijom roditelja, što je već zamijećeno i u drugim istraživanjima (Consuegra i sur. 2011; Marie i sur. 2011; Šegvić-Bubić i sur. 2017). Unatoč dovoljnom broju lokusa s visokim polimorfnim informacijskim sadržajem (> 0,75), razina genetičke diferencijacije divljih i uzgojnih populacija je još uvijek relativno niska (F_{ST} = 0,012). Takav scenarij je prepoznat kao zajedničko usko grlo u postupku identifikacije potomaka povratnog križanja (Marie i sur. 2011), a što je općenito povezano s nižim udjelom hibrida u uzorku (Marie i sur. 2011). Niska razina genetičke diferencijacije divljih i uzgojnih komarči podrijetlom iz Sredozemlja može se djelomično objasniti činjenicom o tek nedavnom uvođenju i razvoju selekcijskih programa u Hrvatskoj i drugim europskim zemljama (Chavanne i sur. 2016) gdje selekcijski pritisak kroz tek nekoliko generacijskih ciklusa nije uzrokovao značajne promjene u strukturi i zastupljenosti alela na proučavanim lokusima.

U predmetnom istraživanju, uočeno je oko 15 % hibrida s akvakulturnim podrijetlom, sa sličnom nenasumičnom prostornom distribucijom kao što je to zamijećeno i kod prebjega,

što ukazuje na uspješnu genetičku hibridizaciju i introgresiju uzgojnih genotipova komarči u divlje populacije. Određen broj divljih populacija pokazuje smanjenu alelnu raznolikost (16WK, 16WD) ili smanjenu efektivnu veličinu populacije NE, (17AK). Dugoročno, uzastopni bjegovi uzgojnih riba te potencijalno križanje s divljim populacijama mogu uzrokovati smanjenu sposobnost opstanka (*fitness*) novonastalih jedinki te mogu utjecati na sposobnost prilagodbe populacije da se nosi s promjenama okoliša (McGinnity i sur. 2009; Satake i sur. 2012).

Primjena mikrosatelitnih biljega povezana s genima kandidata, odnosno genima koji su funkcionalno povezani s rastom i osmoregulatornim kapacitetima u riba, pokazala se uspješnom u diskriminaciji jedinki uzgojnog podrijetla, čak u situacijama vrlo niske genetičke udaljenosti divljih i uzgojnih populacija, kao što je slučaj između divljih populacija i uzgojnih s istočnim i zapadnim jadranskim podrijetlom. Međutim, frekvencije alela na trima lokusima gena kandidata nisu omogućile diskriminaciju jedinki divljeg podrijetla već su sve jedinke svrstane u isti klaster. Predmetni su se biljezi prethodno pokazali informativnima pri proučavanju genetičke diferencijacije komarči iz različitih staništa (Chaoui i sur. 2012; Guinand i sur. 2016), što je bio i razlog njihovog odabira i uključivanja u ovo istraživanje. Uzgojne jedinke prolaze program selekcije na željena svojstva, te je selekcijski pritisak prepoznat primjenom ova tri biljega i aplikacijom STRUCTURE analize. Stoga, njihova primjena koja bi imala za cilj samo diskriminirati uzgojno podrijetlo od divljeg može poslužiti kao isplativ mehanizam prepoznavanja prebjega u prirodnim staništima, što bi osiguralo iskorak prema razvitku sustavnog programa detekcije prebjega uz podršku nacionalnog strateškog plana upravljanja istima.

Znanstveno-istraživački projekt PREVENT ESCAPE (*Preventing the Escape of Fish from Aquaculture,* 2009-2012) je imao za cilj podignuti svijest europske zajednice o implikacijama koje uzrokuju prebjegle jedinke iz uzgoja, te se projekt može smatrati pionirom u razvoju metoda za prepoznavanje prebjega kao i u razvoju preporuka o preveniranju i kontroli prebjega. Međutim, recentna istraživanja o problematici introgresije uzgojne komarče u drugim europskim zemljama potpuno izostaju, što je zabrinjavajuće uzevši u obzir kompleksnost ekosustava Sredozemnog mora (Coll i sur. 2010). S druge pak strane, opsežna istraživanja o genetičkim interakcijama uzgojnih i divljih populacija lososa se već desetljećima provode u Norveškoj, s ciljem zaštite izvornih populacija koje nastanjuju rijeke kojima Norveška obiluje i gdje se populacije mrijeste (Glover i sur. 2012; 2013; 2017; Skaala i sur. 2006; 2012). Karlsson i sur. (2016) proučavajući genetičku strukturu lososa iz 147

norveških rijeka ukazuju na značaju introgresiju uzgojnog genotipa u 50 % divljih populacija, s razinama većim od 10 % u 27 rijeka, gdje su također zabilježili smanjenu genetičku diferencijaciju uzgojnih i divljih populacija tijekom vremena (Glover i sur. 2012; 2013). U ovom istraživanju je zabilježen sličan obrazac utjecaja uzgojnih populacija na divlje, s 15 % hibrida akvakulturnog podrijetla i < 10 % prebjega u istraživanim populacijama.

Riblji prebjezi pokazali su visoku stopu preživljavanja od nekoliko godina i asimilaciju u prirodne populacije. Simulacijom bijega uzgojne komarče iz priobalnog uzgajališta srednjeg Jadrana i primjenom telemetrijskog praćenja, uočeno je zadržavanje i do 70 % označenih komarči u blizini kaveza tokom dva tjedna od incidenta bijega, dok je nekoliko jedinki odmah napustilo uzgojno područje pokazujući značajno svojstvo disperzijskog kapaciteta (Šegvić-Bubić i sur. 2018). Sličan obrazac distribucije prebjega komarče zabilježili su Arechavala-Lopez i sur. (2012c). Zadržavanje prebjega tokom dva tjedna u blizini uzgajališta predstavlja period prilagodbe ribe na nove okolišne uvjete, te se taj isti vremenski okvir može smatrati pogodnim za ponovni ulov prebjeglog jata. Učinkoviti ulov prebjegle ribe nakon masovnog prebjega u zapadnom Mediteranu opisali su Izquierdo-Gomez i sur. (2016) gdje su se prva dva tjedna nakon bijega pokazala ključnima u ulovu, posebno prvih nekoliko dana kad je skoro polovica biomase odbjegle ribe ponovno ulovljena. Zaključno, nakon incidenta bijega pravovaljana i brza reakcija je ključna za uspješan ulov prebjega kao i za sprječavanje utjecaja prebjega na lokalne populacije (Uglem i sur. 2008). Lokalni ribari imaju bitnu ulogu u provedbi pravovremenog izlova prebjegle ribe i od toga imaju ekonomsku korist, dok se u isto vrijeme smanjuje pritisak prebjegle ribe na lokalne populacije i ekosustav (Archevala-Lopez i sur. 2012c). Odbjegla komarča i lubin preživljavaju i do nekoliko mjeseci u divljini, ulazeći u područja drugih uzgajališta, zadržavajući se u priobalju i u lokalnim lukama, gdje su u kompeticiji s prirodnim populacijama za hranu i stanište (Toledo-Guides i sur. 2009; Arechavala-Lopez i sur. 2011; 2012c). Akustičnim odašiljanjem komarče označene na uzgajalištu srednjeg Jadrana su ulovljene komercijalnim ribolovnima alatima u Novigradskom moru nakon dvije godine od simuliranog bijega, zajedno s plovama divlje komarče. Visoka razina prilagodljivosti ribe uzgojnog podrijetla u prirodnom okolišu, kao i posljedično ekološki i genetički utjecaj na divlje populacije, čimbenici su koji su već prepoznati duž istočne obale Jadrana (Šegvić-Bubić i sur. 2011b; 2017). Komarča kao oportunist prilagođava svoju prehranu morskim organizmima koji su dostupni u okolišu (Tancioni i sur. 2003) preferirajući školjkaše i rakove (Pita i sur. 2002, Šegvić-Bubić i sur. 2011a). U zadnjem desetljeću s povećanjem brojnosti

divlje komarče uzgajališta školjkaša trpe velike gubitke na nasadima dagnji i kamenica zbog intenzivne predacije divlje komarče na uzgojnim sustavima pri čemu ne treba zanemariti i doprinos prebjega (Šegvić-Bubić i sur. 2011a).

Međutim, akvakultura osigurava zapošljavanje, te je značajan čimbenik programa ruralnog razvoja (Katavić, 2016). Razvitak moderne akvakulture moguć je samo uz znatna ulaganja u tehnologiju proizvodnje kao i bolju suradnju s raspoloživim znanstvenim potencijalima vodeći se principima održivog gospodarenja. Prebjezi su jedan od značajnijih problema s kojima se susreće akvakultura u kaveznim sustavima, a dva ključna pokretača za uspješno smanjivanje broja prebjega su definiranje standarda za konstrukciju kaveza, materijala pri njihovoj izradi i posebni postupci za postrojenja te korištenje odgovarajuće opreme (Jackson i sur. 2015). Nakon definiranja standarda uzgoja u 2006. godini (dizajn, dimenzije i rad uzgajališta), u Norveškoj se broj prebjega smanjio sa 600 000 (2001. do 2006.) na manje od 300 000 procijenjenih jedinki (2007. do 2011.), unatoč porastu uzgoja za 50 %. Norveški primjer upravljanja upućuje kako pravilne zakonodavne regulative popraćene s pravovremenom reakcijom ulova nakon incidenta prebjega mogu značajno smanjiti broj prebjega u okoliš. Suradnja s lokalnim ribarima uz primjenu morfoloških i molekularnih metoda pri identifikaciji prebjegle ribe pokazala se održivom u Norveškom primjeru upravljanja prebjezima lososa, pastrve i bakalara (Glover, 2011). Smanjena genetička raznolikost uzgojnih jedinki, kao i potomaka nastalih razmnožavanjem divljih i uzgojnih jedinki koji su molekularno prepoznati u prirodnim populacijama, sugerira kako je nužno provoditi mjere očuvanja autohtonih populacija. Porastom proizvodnje u akvakulturi istraživanja o genetičkoj raznolikosti i strukturi vrsta u uzgoju su sveprisutnija (Karaiskou i sur. 2009; Novel i sur. 2010; Franchini i sur. 2012; Somarakis i sur. 2013; ; García-Celdrán i sur. 2016; Šegvić-Bubić i sur. 2011;b 2017), a mikrosateliti su se pokazali kao pouzdan i često korišten molekularni alat u identifikaciji podrijetla ribe i u prepoznavanju genetičkog utjecaja prebjega na lokalne populacije.

Učinkovit i ekonomski isplativ alat za prepoznavanje prebjega ključan je za točnu procjenu razmjera i posljedica prebjega uzgojnih jedinki. Iako su se mikrosateliti iskazali kao jedan od pouzdanijih biljega u opisu genetičke strukture populacija, te efikasnim u identifikaciji prebjega, njihova primjena iziskuje duži vremenski period i veće financijske izdatke. Kombinacija manjeg broja mikrosatelitnih biljega, kao što su biljezi povezani s genima kandidatima, pokazala se u predmetnom istraživanju efikasnom za brzo provjeravanje uzgojnog *vs* divljeg podrijetla.

Genotipizacija uzgojnih matica, kao i kontrolirana selekcija u mrijestilištima doprinijela bi učinkovitoj detekciji prebjega. U sudskoj medicini primjena mikrosatelitnih biljega je uobičajena praksa u utvrđivanju očinstva. U Norveškoj je uspostavljen i podržan od strane resornog ministarstva jasan protokol za identifikaciju prebjega atlantskog lososa uz pomoć kojeg se uspješno povezuju prebjegle jedinke s farmom na kojoj se uzgoj odvija. Naime, norveška proizvodnja je temeljena isključivo na lokalno proizvedenoj mlađi lososa, u mrijestilištima s poznatim genetičkim profilom matičnjaka, što u konačnici omogućava uspješno molekularno povezivanje prebjega s danim matičnjakom. Dosadašnji rezultati upućuju da je detekcija prebjega lososa primjenom mikrosatelitnih biljega izvediva, međutim, postoje izazovi u provedbi ovih mjera u vidu kontrole plasmana uzgojnih jedinki u cijeloj industriji. Kako bi prepoznavanje prebjega bilo što uspješnije, Baranski i sur. (2014) ukazuju na to da uzgajališta koja su međusobno u neposrednoj blizini ne izmjenjuju uzgojni materijal kako bi se izbjeglo miješanje genotipova, odnosno da te farme ne uzimaju iz istog mrijestilišta uzgojne jedinke. Nadalje, genetička baza svih uzgojnih matica je potrebna za uspješnu provedbu projekta (Baranski i sur. 2014).

U ovom istraživanju uspostavljena je prva baza uzgojnih i divljih genotipova komarče u Hrvatskoj, što predstavlja dobru podlogu razvitku sličnih mjera poput norveških. Svakako je daljnja suradnja s uzgajalištima neophodna, kao i poticanje uzgoja lokalno proizvedene mlađi. Nadalje, uparivanje multilokusnih i morfometrijskih podataka za klasifikaciju podrijetla jedinki pruža obećavajuće rezultate u diskriminaciji podrijetla jedinki. Uzgojne jedinke koje su okarakterizirane kao jedinke nepoznatog podrijetla s izrazito velikim postotkom (> 90 %) pridružene su odgovarajućoj populaciji. S obzirom da je u provjeri funkcionalnosti algoritma strojnog učenja assignPOP R paketa korišteno 19 neutralnih biljega, daljnji razvoj primjene ovog algoritma, na način da se broj biljega minimalizira zadržavajući točnost klasifikacijskog uspjeha, je krajnji cilj Laboratorija za akvakulturu.

Zbog visokog potencijala rasprostranjenja ličinki i velike varijacije u preživljavanju, kao i utjecaja klimatskih promjena i drugih antropogenih čimbenika, stupanj do kojeg ovi procesi doprinose oblikovanju genetičke raznolikosti populacija je izazovniji od procjene introgresije same po sebi. Unatoč kontinuiranoj introgresiji uzgojne komarče u prirodna staništa istočnog Jadrana (Šegvić-Bubić i sur. 2011b; 2014) koja najviše pogađa divlje populacije u blizini uzgajališta, treba primijetiti da ova toploljubna vrsta pokazuje izrazitu adaptabilnost na različite okolišne uvjete na način da povećava svoju dominaciju u obalnim ekosustavima i širi se prema sjevernom arealu svoje distribucije. Iako je kroz predmetno

istraživanje uspostavljena solidna baza divljih i uzgojnih genotipova istočnog Jadrana, kao prvi korak prema razvoju strategije sprječavanja daljnje erozije genetičkog integriteta prirodnih populacija, gore spomenute adaptacije zahtijevaju dodatnu pažnju, te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se dobio bolji uvid u stanje populacija komarče na nižoj i višoj geografskoj skali rasprostranjenosti.

5. ZAKLJUČAK

Značajan porast populacija divljih komarči u obalnim područjima Sredozemnog mora i njihovo širenje prema sjeveru je uočeno zadnjih godina (Avignon i sur. 2017; Dimitriou i sur. 2007; Glamuzina i sur. 2014). Iako njihov opseg ovisno o regiji može značajno varirati, promjene u temperaturi uzrokovane klimatskim promjenama smatraju se barem djelomično odgovornima za povećanje brojnosti populacija s obzirom da je komarča toploljubna vrsta, te porast temperature mora može biti koristan čimbenik za mrijest i uspjeh novačenja (Glamuzina i sur. 2014). Dodatno, u posljednjem desetljeću došlo je do značajnog porasta uzgoja komarči u Hrvatskoj (Eurostat, 2019) čime je povećan rizik mogućeg bježanja ribe iz kaveznih instalacija i njihov mrijest u istima, u kojem slučaju prebjegle jedinke mogu utjecati na ekologiju i genetičku strukturu lokalnih populacija (Šegvić-Bubić i sur. 2014).

U ovom istraživanju korištena su dva seta mikrosatelitnih biljega za analizu 19 neutralnih mikrosatelitnih lokusa i tri lokusa povezana s genima kandidatima, kako bi se dobio uvid u genetičku raznolikost, povezanost i strukturu populacija komarči u obalnim područjima istočnog Jadranskog mora kroz trogodišnje vremensko razdoblje, uspoređujući 1 586 jedinki grupiranih prema podrijetlu (divlje populacije naspram onih iz uzgoja ili naspram uzgajališno povezanih) i ontogenetskom statusu (mlađ naspram adulti).

Na osnovu provedenog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. Standardizirani set neutralnih mikrosatelitnih lokusa pokazao se robusnim i učinkovitim u analizi podrijetla i karakterizaciji populacija, dok su se tri lokusa povezana s genima kandidatima pokazala učinkovitima u karakterizaciji populacija uzgojnog podrijetla.

2. Većina uzgojnih populacija je pokazala odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, vjerojatno iz razloga nenasumičnog parenja i miješanja populacija.

3. Efektivna veličina populacije, broj alela po lokusu te heterozigotnost istraživanih jedinki bile su značajno manje u populacijama iz uzgoja nego u divljim populacijama. Tako je globalna F_{ST} vrijednost između 27 populacija iznosila 0,022 ($p < 0,0001$) za SST skup i 0,019 ($p < 0,001$) za podskup cgSST podataka, ukazujući na umjerenu genetičku udaljenost između istraživanih populacija. Najviša globalna F_{ST} vrijednost u setu SST podataka uočena je kod uzgojnih populacija (0,041), dok je niža vrijednost F_{ST} uočena u tri ostale populacije: 0,015 (divlje) 0,010 (uzgajališno povezane) i 0,009 (mlađ). Nadalje, u prosjeku, efektivna veličina

populacije je bila tri do sedamnaest puta manja u uzgojnim populacijama (164) u usporedbi s divljima (549), uzgajališno povezanima (1139) i juvenilnim populacijama (2799).

4. Višegodišnja homogena genetička struktura divlje komarče iz prirodnih staništa popraćena smanjenom genetičkom povezanošću s divljim komarčama oko uzgajališta tuna i populacijama mlađi upućuje da divlje plove samo privremeno borave u istočnom Jadranu. Dobra prostorna pokrivenost s višegodišnjim periodom uzorkovanja osiguravaju pouzdanost zaključka. Obilne plove komarči koje se prvo pojavljuju u sjevernom Jadranu tijekom jeseni i postupno migriraju južnije povezane su s trofičkim migracijama, pri čemu se mrijest događa drugdje u Sredozemlju. Ovakav primjer trofičke migracije je već prepoznat u Jadranu za nekoliko vrsta (Druon i sur. 2016).

5. Posljednjih godina porast brojnosti divljih komarči uočen je u području kaveznog uzgoja tuna. Niska razina genetičke udaljenosti i izostanak strukture između kavezno povezanih komarči i mlađi iz obalnih rastilišta uočena u dvije uzastopne godine (2015.-2016.) ukazuje da se akvatoriji gdje se provodi uzgoj tuna može smatrati i prirodnim mrijestilištima divljih komarči.

6. Združivanje numeričkog oceanografskog modela ROMS i individualno temeljenog modela Ichthyop je potvrdilo hidrodinamičku povezanost uzgajališta tuna na otoku Braču i Ugljanu s prirodnim rastilištima (Pantan i Raša), što potvrđuju rezultati identifikacije roditeljstva gdje je identificirano šest parova roditelja i potomaka koji povezuju mlađ u blizini glavnih rastilišta (Neretva, Raša i Pantana) s roditeljima uzorkovanim u neposrednoj blizini uzgajališta tuna.

7. Primjena 19 neutralnih mikrosatelitnih biljega (SMsa1 i SMsa2) omogućila je razlučivanje podrijetla komarče bez prethodnog znanja o podrijetlu, kao i identifikaciju prebjega i hibrida u divljim populacijama komarče. Ukupno, prebjezi komarče i hibridi s uzgojnim podrijetlom čine 25 % prirodne populacije, sa zabilježenim godišnjim trendom rasta, posebice u populacijama koje su uzorkovane u blizini uzgajališta tuna u 2017. godini (17AK i 17AB), gdje su uočeni čisti divlji genotipovi s vrlo niskim frekvencijama. Stoga ovi rezultati ukazuju na uspješnu i široko rasprostranjenu introgresiju gena uzgojnih komarči u divlje populacije, što mijenja genetičku strukturu divlje populacije.

8. Biljezi kandidatnih gena povezani s molekularnim funkcijama važnim za odabir ekonomski važnih svojstava u akvakulturi (primjerice stope rasta) i postupku pripitomljavanja (osmoregulacijski kapaciteti) smatraju se selektivno neutralnima. Na temelju raspodjele alela na spomenutim lokusima Bayesovom analizom klasteriranja su uspješno diskriminirane

uzgojne populacije različitog geografskog porijekla koje su već nekoliko generacija pod selekcijom, međutim, to nije bio slučaj za divlje skupine (divlje odrasle jedinke, mlađ i divlje jedinke oko uzgajališta tuna) koje su identificirane primjenom 19 neutralnih mikrosatelitnih biljega. Ovih nekoliko lokusa mogu biti korisni za brzo provjeravanje uzgojnog *vs* divljeg podrijetla.

9. Upareni višelokusni i morfometrijski podaci za klasifikaciju podrijetla jedinki pružaju obećavajuće rezultate u diskriminaciji podrijetla. S obzirom da je u provjeri funkcionalnosti algoritmom strojnog učenja assignPOP R paketa korišteno 19 neutralnih biljega, daljnji razvoj primjene paketa je neophodan, na način da se broj biljega minimalizira zadržavajući točnost klasifikacijskog uspjeha, s ciljem razvoja informativnog i ekonomski isplativog alata za prepoznavanja prebjega.

10. Široko rasprostranjena introgresija gena uzgojnih komarči u divlje populacije je prepoznata u ovom istraživanju. Ako se ovakav trend introgresije nastavi, izvornost prirodnog genotipa će se u potpunosti narušiti, te su mjere prevencije neophodne. Stoga je preporuka, po uzoru na Norvešku, razviti smjernice i regulative koje bi doprinijele ublažavanju danog problema kroz definiranje standarda za kavezni uzgoj (dizajn, dimenzije i rad uzgajališta), protokola ulova prebjega i monitoringa njihovog podrijetla.

11. Predmetno istraživanje je rezultiralo uspostavom prve višelokusne genetičke baze divljih i uzgojnih populacija komarči iz istočnog Jadrana, što je prvi korak prema razvoju strategije upravljanja prebjezima i sprječavanju daljnje erozije genetičkog integriteta prirodnih populacija. Rastući uzgoj i s njim povezani potencijalni utjecaji u vidu genetičkih interakcija divljih i uzgojnih jedinki upućuju na potrebu nastavka istraživanja kako bi se dobio bolji uvid u stanje populacija komarče u Jadranu.

6. LITERATURA

Abdul Muneer, P. M., A. Gopalakrishnan & K. K. Musammilu. 2009. Genetic variation and population structure of endemic yellow catfish, *Horabagrus brachysoma (Bagridae)* among three populations of Western Ghat region using RAPD and microsatellite markers. Mol. Biol. Rep. 36: 1779-1791.

Abdul Muneer, P. M. 2014. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. Genet. Res. Int.

Achrem, M., L. Skuza, J. Domagała, M. Pilecka-Rapacz & R. Czerniawski. 2015. Genetic Variation of *Salmo trutta* L. Populations from the Catchment Areas of the Rega, Parseta and Wieprza Rivers Evaluated by RAPD and SSR Markers. Folia. Biol. 63: 1-7.

Alarcón, J. A., A. Magoulas, T. Georgakopoulos, E. Zouros & M. C. Alvarez. 2004. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture. 230: 65-80.

Alasalvar, C., K. D. A. Taylor & F. Shahidi. 2002. Comparative quality assessment of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. J. Agric. Food Chem. 50: 2039–2045.

Allendorf, F. W. & R. F. Leary. 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. U: Conservation biology: the science of scarcity and diversity (Soulé, M. E. ur.). Sinauer. Sunderland. 57–76.

Allendorf, F. W. 2002. Genetics aspects of viability in small populations with special emphasis on the Scandinavian wolf population. U: Genetics and the Persistance of Small Populations. Report from an International Expert Workshop (Liberg, O. ur.). Farna. Herrgard. 44.

Almuly, R., Y. Poleg-Danin, S. Gorshkov, G. Gorshkova, B. Rapoport, M. Soller, & B. Funkenstein. 2005. Characterization of the 5′ flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter. Fish. Sci. 71(3): 479–490.

Anderson, E. C. & E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. Genetics. 160: 1217-1229.

Anmarkrud, J. A., O. Kleven, L. Bachmann & J. T. Lifjeld. 2008. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. BMC Evol. Biol. 8: 138.

Antao, T., A. Lopes, R. J. Lopes, A. Beja-Pereira & G. Luikart. 2008. LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method. BMC Bioinform. 9: 323

Arechavala – Lopez, P., I. Uglem, D. Fernandez – Jover, J. T. Bayle – Sempere, P. Sanchez – Jerez. 2011. Immediate post – escape behaviour of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Mediterranean Sea. J. Appl. Ichthyol. 27: 1375-1378.

Arechavala – Lopez, P., P. Sanchez – Jerez, J. T. Bayle – Sempere, D. G. Sfakianakis & S. Somarakis. 2012a. Discriminating farmed gilthead sea bream *Sparus aurata* and European sea bass *Dicentrarchus labrax* from wild stocks through scales and otoliths. J. Fish Biol. 80: 2159-2175.

Arechavala – Lopez, P., P. Sanchez – Jerez, J. T. Bayle – Sempere, D. G. Sfakianakis & S. Somarakis. 2012b. Morphological differences between wild and farmed Mediterranean fish. Hydrobiologia. 679: 217-231.

Arechavala-Lopez P., I. Uglem, D. Fernandez-Jover, J. T. Bayle-Sempere, P. Sanchez-Jerez. 2012c. Post-escape dispersion of farmed seabream (*Sparus aurata L*.) and recaptures by local fisheries in the Western Mediterranean Sea. Fish. Res. 121 – 122: 126 – 135.

Arechavala – Lopez, P., D. Fernandez – Jover, K. D. Black, E. Ladoukakis, J. T. Bayle – Sempere, P. Sanchez – Jerez T. & Dempster. 2013a. Differentiating the wild or farmed origin of Mediterranean fish: a review of tools for sea bream and sea bass. Review. Aqua. 4: 1-21.

Arechavala – Lopez, P., P. Sanchez – Jerez, J. T. Bayle – Sempere, I. Uglem & I. Mladineo. 2013b. Reared fish, farmed escapees and wild fish stocks – a triangle of pathogen transmission of concern to Mediterranean aquaculture management. Aquac. Environ. Interact. 3: 153-161.

Arechavala-Lopez, P., Milošević-González, M & P. Sanchez-Jerez. 2016. Using trace elements in otoliths to discriminate between wild and farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Int. Aquat. Res. 8: 263-273.

Arechavala-Lopez, P., K. Toledo-Guedesa, D. Izquierdo-Gomeza, T. Šegvić-Bubić & Sanchez- P. Jereza. 2017. Implications of Sea Bream and Sea Bass Escapes for Sustainable Aquaculture Management: A Review of Interactions, Risks and Consequences. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. 26: 214-234.

Ariede, R. B., M. V. Freitas, M. E. Hata, V. A. Mastrochirico-Filho, F. Pilarski, S. R. Batlouni, F. Porto-Foresti & D. T. Hashimoto. 2018. Microsatellites associated with growth performance and analysis of resistance to *Aeromonas hydrophila* in tambaqui Colossoma macropomum. Front Genet. 18:9-3.

Astola, A., M. Ortiz, J. A. Calduch-Giner, J. Pérez-Sánchez & M. M. Valdivia. 2003. Isolation of Sparus auratus prolactin gene and activity of the cis-acting regulatory elements. Gen. Comp. Endocrinol. 134(1): 57-61.

Attouchi M. & S. Sadok. 2012. The effects of essential oils addition on the quality of wild and farmed sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. Food. Bioprocess. Tech. 5: 1803-1816.

Attouchi, M. & S. Sadok. 2010. The effect of powdered thyme sprinkling on quality changes of wild and farmed gilthead sea bream fillets stored in ice. Food. Chem. 119: 1527-1534.

Avignon, S., E. Tastard, S. Weston, G. Duhamel & F. Denis. 2017. Morphological identification and DNA barcoding used for diet analysis of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in its expanding northerly range. Aquat. Living. Resour. 301-11.

Ayers, N. M., A. M. McClung, P. D. Larkin, H. F. J Bligh, C. A. Jones & W. D Park. 1997. Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. Theor. Appl. Genet. 94: 773-781

Ballester-Moltó, M., P. Sanchez-Jerez & F. Aguado-Giménez. 2017. Consumption of particulate wastes derived from cage fish farming by aggregated wild fish. An experimental approach. Mar. Environ. Res. 130: 166-173.

Ballester-Moltó, M., P. Sanchez-Jerez, B. García-García & F. Aguado-Giménez. 2015. Husbandry and environmental conditions explain temporal variability of wild fish assemblages aggregated around a Mediterranean fish farm. Aquac. Environ. Interact. 7: 193-203.

Baranski, M., C. Jacq, S. Karlsson, B. J. Hayes & R. Blonk. 2014. SporLaks–Industry-wide tracing of Norwegian farmed Atlantic salmon. Final report.

Barcaccia, G., F. Arzenton, T. F. Sharbel, S. Varotto, P. Parrini & M. Lucchin. 2006. Genetic diversity and reproductive biology in ecotypes of the facultative apomict *Hypericum perforatum* L. Heredity., 96: 322.

Barcaccia, G., L. Pallottini, P. Parrini & M. Lucchin. 2006. A genetic linkage map of a flint maize (*Zea mays var. Indurata L.)* Italian landraces using one way pseudo-test cross strategy and multilocus PCR based markers. Maydica. 51: 469-480.

Basurco, B., A. Lovatelli & B. Garcia. 2011. Current status of Sparidae aquaculture. U: Pavlidis M, Mylonas C (ur.), Sparidae – biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species. Wiley – Blackwell, New Delhi., 1-16.

Ben Slimen, H., H. Guerbej, A. Ben Othmen, I. O. Brahim, H. Blel, N. Chatti & A. El Abed. 2004. Genetic differentiation between populations of gilthead seabream (*Sparus aurata*) along the Tunisian coast. Cybium. 28: 45-50.

Bentzen, P., C. T. Taggart, D. E. Ruzzante & D. Cook. 1996. Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the northwest Atlantic. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 2706-2721.

Blel, H., J. Panfili & B. Guinand. 2010. Selection footprint at the first intron of the Prl gene in natural populations of the flathead mullet (*Mugil cephalus, L*. 1758). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 387: 60-67.

Bolstad, G., H. Hindar, K. Robertsen, G. Jonsson, B. Sægrov, H. Diserud & B. T. Barlaup. 2017. Gene flow from domesticated escapes alters the life history of wild Atlantic salmon. Nat. Ecol. Evol. 1: 1-5.

Bostock, J., B. McAndrew, R. Richards, K. Jauncey, T. Telfer, K. Lorenzen & R. Corner. 2010. Aquaculture: global status and trends. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci. 365: 2897-2912.

Bridger, C. J., R. K. Booth, R. S. McKinley & D. A Scruton. 2001. Site fidelity and dispersal patterns of domestic triploid steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) released to the wild. ICES J. Mar. Sci. 58: 510-516.

Brierley, A. S. & M. J. Kingsford. 2009. Impacts of Climate Change on Marine Organisms and Ecosystems. Curr. Biol. 19: 602-614.

Briñez, R., O. Caraballo & V. Salazar. 2011. Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers. Revista MVZ Córdoba. 16: 2491-2498.

Brown, C., D. Miltiadou & CS. Tsigenopoulos. 2015. Prevalence and survival of escaped European seabass *Dicentrarchus labrax* in Cyprus identified using genetic markers. Aquac. Environ. Interact. 7: 49-59.

Brown, R. C., M. Tsalavouta, V. Terzoglou, A. Magoulas, & B. J. McAndrew. 2005. Additional microsatellites for *Sparus aurata* and cross-species amplification within the Sparidae family. Mol. Ecol. Notes. 5: 605-607.

Campana, S. E. 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. Mar. Ecol. Prog. Ser. 188: 263-297.

Carpene, E., B. Martin & L. Dalla Libera. 1998. Biochemical differences in lateral muscle of wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata L*.). Fish. Physiol. Biochem. 19: 229- 238.

Chaoui, L., P. A. Gagnaire, B. Guinand, J. P. Quignard, C. Tsigenopoulos, M. H. Kara & F. Bonhomme. 2012. Microsatellite Length Variation in Candidate Genes Correlates with Habitat in the Gilthead Sea Bream *Sparus Aurata*. Mol. Ecol. 21: 5497-5511.

Chapuis M. P & Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Mol. Biol. Evol. 24: 621-631.

Chavanne, H., K. Janssen, J. Hofherr, F. Contini, P. Haffray & H. Komen. 2016. Aquatrace Consortium. A comprehensive survey on selective breeding programs and seed market in the European aquaculture fish industry. Aquacult. Int. 24: 1287-1307.

Chen, K. Y., E. A. Marschall, M. G. Sovic, A. C. Fries, H. L. Gibbs & S. A. Ludsin. 2018. assign POP: An r package for population assignment using genetic, non-genetic, or integrated data in a machine-learning framework. Methods Ecol Evol. 9: 439-446.

Cheng, L., L. Liu, X. Yu, D. Wang & J. Tong. 2010. A linkage map of common carp (*Cyprinus carpio*) based on AFLP and microsatellite markers. Anim. Genet. 41: 191-198.

Chistiakov, D. A., B. Hellemans & F. A. Volckaert. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. Aquaculture. 255: 1-29.

Coll, M., C, Piroddi, J. Steenbeek, K. Kaschner, F. Ben Rais Lasram & J. Aguzzi. 2010. The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. PLoS ONE. 5: e11842

Colloca, F. & S. Cerasi. 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme. Sparus aurata. Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO. Rim. Dostupno sa: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/*Sparus_aurata*/en, pristupljeno: ožujak, 2019.

Conner, J. D. & D. L. Hartl. 2004. A primer of ecological genetics, Sinauer Associates Incorporated. Sunderland.

Consuegra, S., N. Phillips, G. Gajardo, & C. Garcia de Leaniz. 2011. Winning the invasion roulette: escapes from fish farms increase admixture and facilitate establishment of non-native rainbow trout. Evol. Appl. 4, 660-671.

Coscia, I. & S. Mariani. 2011. Phylogeography and population structure of European sea bass in the north-east Atlantic. Biol. J. Linnean. Soc. 104: 364-377.

Coscia, I., E. Vogiatzi, G. Kotoulas, C. S. Tsigenopoulos & S. Mariani. 2012. Exploring neutral and adaptive processes in expanding populations of gilthead sea bream, *Sparus aurata L*., in the North-East Atlantic. Heredity. 108: 537-546.

Crivelli, A. J., G. Poizat, P. Berrebi, D. Jesensek, & J. F. Rubin. 2000. Conservation biology applied to fish: the example of a project for rehabilitating the marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia.

Crnokrak, P. & D. A. ROFF. 1999. Inbreeding depression in the wild. Heredity. 83: 260-270.

Crosetti, D., A. R. Rossi & S. De Innocentis. 2014. Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). AquaTrace species leaflet.

Cvitković, I., A. Žuljević, B. Antolić, I. Grubelić & M. Despalatović. 2005. Utjecaj marikulture na ekosustave. Dostupno sa: http://www.hok.hr/cro/cehovi/cehovska_dogadanja/15_susret_ribara_porec.

De Innocentiis, S., A. Lesti, S. Livi, A. R. Rossi, D. Crosetti & L. Sola. 2004. Microsatellite markers reveal population structure in gilthead sea bream *Sparus aurata* from the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. Fish. Sci. 70: 852-859.

Dempster, T., D. Fernandez-Jover, P. Sanchez-Jerez, J. Bayle-Sempere, A. Boyra, F. Tuya & R. Haroun. 2005. Vertical variability of wild fish aggregations around sea-cage fish farms in temperate marine environments. Mar. Ecol. Prog. Ser. 304: 15-29.

Dempster, T., F. Tuya, P. Sanchez-Jerez, D. Fernandez-Jover, J. T. Bayle-Sempere, A. Boyra, & R. Haroun. 2006. Coastal aquaculture and conservation can work together. Mar. Ecol. Prog. Ser. 314: 309-310.

Dempster, T., P. Sanchez-Jerez, J. T. Bayle-Sempere, F. Giménez-Casalduero & C. Valle. 2002. Attraction of wild fish to sea – cage fish farms in the south – western Mediterranean Sea: spatial and short – term temporal variability. Mar. Ecol. Prog. Ser. 242: 237-252.

DeWoody, J. A. & J. C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. J. Fish. Biol. 56: 461-473.

Di Rienzo, A., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes & M. Slatkin. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 3166-3170.

Dimitriou, E., G. Katselis, D. K. Moutopoulos, C. Akovitiotis & C. Koutsikopoulos. 2007. Possible influence of reared gilthead sea bream (*Sparus aurata L*.) on wild stocks in the area of the Messolonghi lagoon (Ionian Sea, Greece). Aquacult. Res. 38: 398-408.

Do, C., R. S. Waples, D. Peel, G. M. Macbeth, B. J. Tillett & J. R. Ovenden. 2014. NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. Mol. Ecol. Resour. 14: 209-214.

Druon, J. N., J. M. Fromentin, A. R. Hanke, H. Arrizabalaga, D. Damalas, V. Tičina & P. Reglero. 2016. Habitat suitability of the Atlantic bluefin tuna by size class: An ecological niche approach. Prog. Oceanogr. 142: 30-46.

Džoić, T., G. B. Paklar, B. Grbec, S. Ivatek-Šahdan, B. Zorica, T. Šegvić-Bubić & P. Verley. 2017. Spillover of the Atlantic bluefin tuna offspring from cages in the Adriatic Sea: A multidisciplinary approach and assessment. PloS ONE. 12: e0188956.

Earl, D. A. & B. M von Holdt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv. Genet. Resour. 4: 359-361.

Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nat. Rev. Genet. 5: 435-445.

Ellegren, H. 2009a. The different levels of genetic diversity in sex chromosomes and autosomes. Trends in Genetics. 25: 278-284.

Ellegren, H. 2009b. Is genetic diversity really higher in large populations? J. Biol. 8: 1-3.

Estoup, A & J. M. Cornuet. 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data. In: Microsatellites: Evolution and Applications (eds Goldstein, D. B. & Schlo¨ tterer, C.). Oxford University Press. Oxford. UK. pp. 49-64.

Estoup, A., P. Presa, F. Krieg, D. Vaiman & R. Guyomard. 1993. n and (GT) n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). Heredity. 71: 488-496.

Eurostat, 2019 https://ec.europa.eu/eurostat/371

Evanno, G., S. Regnaut & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14: 2611-2620.

Excoffier, L. & H. E. Lischer. 2010. Arlequin suite, version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Resour. 10: 564-567.

Falconer, D. S. & T. F. Mackay. 1996. Introduction to quantitative genetics, 4th ed. Longman. Essex.

FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2014. p. 209. Rome.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the Sustainable Development Goals. Rome. http://www.fao.org/3/i9540en/ I9540EN.pdf.

Feap. 2017. Annual report 2017. https://issuu.com/feapsec/docs/feap_ar2017

Fernandez-Jover, D., P. Sanchez-Jerez, J. T. Bayle-Sempere, C. Valle & T. Dempster. 2008. Seasonal patterns and diets of wild fish assemblages associated with Mediterranean coastal fish farms. ICES J. Mar. Sci. 65: 1153-1160.

Fiske, P., R. A. Lund & L. P. Hansen. 2005. Identifying fish farm escapees. In Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science Ed: Cadrin, S. X., K. D., Friedland i J. R. Waldman/ Elsevier, Amsterdam. Str. 659-680.

Fleming, I. A., K. Hindar, I. B. MjÖlnerÖd, B. Jonsson, T. Balstad & A. Lamberg. 2000. Lifetime success and interactions of farm salmon invading a native population. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biol. Sci. 267: 1517-1523.

Flos, R., L. Reig, J. Oca & M. Ginovart. 2002. Influence of marketing and different land-based system on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quality. Aquac. Inter. 10: 189- 206.

Ford, J. S. & R. A. Myers, 2008. A Global Assessment of Salmon Aquaculture Impacts on Wild Salmonids. Roberts C, ed. PLoS Biology. 6: e33.

Forrest, B., N. Keeley, P. Gillespie, G. Hopkins, B. Knight & D. Govier. 2007. Review of the Ecological Effects of Marine Finfish Aquaculture : Final Report. Prepared for Ministry of Fisheries. Cawthron Report No. 1285. Cawthron Institute.

Franchini, P., L. Sola, D. Crosetti, V. Milana & A.R. Rossi. 2012. Low level of population genetic structure in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, along the Italian coast. ICES J. Mar. Sci. 69: 41-50.

Francour, P., C. F. Boudouresque, J. G. Harmelin, M. L. Harmelin Vivien & J. P. Quignard. 1994. Are the Mediterranean waters becoming warmer? Information from biological indicators. Mar. Pollut. Bull. 28: 523-526.

Frankham, R., D. A. Briscoe & J. D. Ballou. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge university press.

Freeland, J. L. 2005. Molecular ecology. John Wiley & Sons. Ltd. Hoboken. New York.

Galarza, J. A., G. F. Turner, E. Macpherson, J. Carreras-Carbonell & C. Rico 2007. Cross-amplification of 10 new isolated polymorphic microsatellite loci for red mullet (*Mullus barbatus*) in striped red mullet (*Mullus surmuletus*). Mol. Ecol. Notes. 7: 230-232

García de León, F. J., J. F. Dallas, B. Chatain, M. Canonne, J. J. Versini & F. Bonhomme. 1995. Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (*Perciformes: Serrandidae*). Mol Mar Biol Biotechnol. 4: 62-68.

García-Celdrán, M., G. Ramis, E. María-Dolores, J. Peñalver, Y. J. Borrell, M. Manchado & E. Armero. 2016. Genetic assessment of three gilthead sea bream (*Sparus aurata L.)* populations along the Spanish coast and of three broodstocks managements. Aquac. Int. 24: 1409-1420.

Gilk, S. E., I. A. Wang, C. L. Hoover, W. W. Smoker, S. G. Taylor, A. K. Gray & A. J. Gharrett. 2004. Outbreeding depression in hybrids between spatially separated pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, populations: marine survival, homing ability, and variability in family size. Environ. Biol. Fishes. 69: 287-297.

Gjedrem, T., N. Robinson & M. Rye. 2012. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. Aquaculture. 350: 117-129 .

Glamuzina, B., A. Pešić, A. Joksimović, L. Glamuzina, S. Matić-Skoko, A. Conides & P. Zacharaki. 2014. Observations on the increase of wild gilthead seabream, *Sparusa aurata* abundance, in the eastern Adriatic Sea: problems and opportunities. Int. Aquat. Res. 6: 127-134.

Glover, A. & P. C. Sharma. 2011. Is spatial occurrence of microsatellites in the genome a determinant of their function and dynamics contributing to genome evolution? Curr. Sci. 100: 859-869.

Glover, K. A., M. Quintela, V. Wennevik, F. Besnier, A. G. Sørvik & Ø. Skaala. 2012. Three decades of farmed escapees in the wild: A spatio-temporal analysis of population genetic structure throughout Norway. PloS One. 7: e43129.

Glover, K. A., C. Pertoldi, F. Besnier, V. Wennevik, M. Kent & Ø. Skaala. 2013. Atlantic salmon populations invaded by farmed escapees: quantifying genetic introgression with a Bayesian approach and SNPs. Bmc Genetics.,14: 74.

Glover, K. A., M. F. Solberg, P. McGinnity, K. Hindar, E. Verspoor, M. W. Coulson, M. M. Hansen, H. Araki & Ø. Skaala, T. Svåsand. 2017. Half a century of genetic interaction between farmed and wild Atlantic salmon: Status of knowledge and unanswered questions. Fish. Fish. 18: 1-38.

Goldstein, D. B. & C. Schlötter. 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford. Oxford University Press: 352 str.

Goudet, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2) https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm

Grigorakis, K. 1999. Quality of cultured and wild gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Diktorska disertacija. University of Lincolnshire and Humberside.

Grigorakis, K. 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: Rev. Aquacult. 272: 55-75.

Grigorakis, K., K. D. A. Taylor & M. N. Alexis. 2003. Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and cultured gilthead sea bream: sensory differences and possible chemical basis. Aquaculture. 225: 109-119.

Grigorakis, K., M. N, Alexis, K. D. A. Taylor & M. Hole. 2002. Comparison of wild and cultured gilthead sea bream; composition, appearance and seasonal alterations. Int. J. Food. Sci. Tech. 37: 477-484.

Guinand, B., C. Chauvel, M. Lechene, J. Tournois, C. S. Tsigenopoulos, A. M. Darnaude & P. A. Gagnaire. 2016. Candidate gene variation in gilthead sea bream reveals complex spatiotemporal selection patterns between marine and lagoon habitats. Mar. Ecol. Prog. Ser. 558, 115-127.

Guo, S. W. & E. A. Thompson. 1992. A Monte Carlo method for combined segregation and linkage analysis. Am. J. Hum. Genet. 51: 1111.

Hansson, B. & L. Westerberg. 2002. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. Mol. Ecol. 11: 2467-2474.

Hedgecock, D & A. I. Pudovkin. 2011. Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. Bull. Mar. Sci. 87: 971-1002.

Hedrick, P. W. 2000. Genetics of populations, 2nd ed. Jones and Bartlet Publishers. Sudbury.

Hellberg, M. E., R. S., Burton, J. E., Neigel & S. R. Palumbi. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. Bull. Mar. Sci. 70: 273-290.

Hindar, K., I. A. Fleming, P. McGinnity & O. Diserud. 2006. Genetic and ecological effects of salmon farming on wild salmon: modelling from experimental results. ICES J. Mar. Sci. 63: 1234-1247.

Hirano, T., T. Ogasawara, J. P. Bolton, N. L. Collie, S. Hasegawa & M. Iwata, 1987. Osmoregulatory role of prolactin in lower vertebrate. In Comparative Physiology of Environmental Adaptations. pp. 112-124. Edited by R. Kirsch and B. Lahlou. Karger, Basel.

Hirszfeld L. & Hirszfeld H. 1918–19. Essai d'applicatio methodes serologiques au probleme des races. Anthropologie. 29: 505-510.

Holderegger, R., U. Kamm & F. Gugerli. 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. Landsc. Ecol. 21: 797-807.

Hoshino, N., F. Iijima, G. N. Newton, N. Yoshida, T. Shiga, H. Nojiri & H. Oshio. 2012. Three-way switching in a cyanide-bridged [CoFe] chain. Nat. Chem. 4: 921.

Ihssen, P. E., H. E. Booke, J. M. Casselman, J. M. McGlade, N. R. Payne & F. M. Utter. 1981. Stock identification: materials and methods. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38: 1838-1855.

Islam, M. 2005. Nitrogen and phosphorus budget in coastal and marine cage aquaculture and impacts of effluent loading on ecosystem: review and analysis towards model development. Mar. Pollut. Bull. 50: 48-61.

Izquierdo-Gomez, D. & P. Sanchez-Jerez. 2016. Management of fish escapes from Mediterranean Sea cage aquaculture through artisanal fisheries. Ocean. Coast. Manag. 122: 57-63.

Jackson, D., A. Drumm, S. McEvoy, Ø. Jensen, D. Mendiola, G. Gabiña, J. A. Borg, N. Papageorgiou, Y, Karakassis & K. D. Black. 2015. A pan-European valuation of the extent, causes and cost of escape events from sea cage fish farming. Aquaculture. 436: 21-26.

Jakobsson, M. & N. A. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics. 23: 1801-1806.

Jardas, I. 1996. Jadranska ihtiofauna. Školska knjiga. Zagreb. 533 str.

Jarne, P. & P. J. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol. Evol. 11: 424-429.

Jensen, Ø., T. Dempster, E. B. Thorstad, I. Uglem & A. Fredheim. 2010. Escapes of fish from Norwegian sea-cage aquaculture: causes, consequences, prevention. Aquac. Environ. Interact., 1: 71-83.

Johnson, J. E. & D. J. Welch. 2010. Marine fisheries management in a changing climate: a review of vulnerability and future options. Rev. Fish. Sci. Aquac. 18: 106-124.

Jombart, T., S. Devillard & F. Balloux. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics. 11: 94.

Kalinowski, S. T., M. L. Taper, & T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol. Ecol. 16: 1099-1106.

Karaiskou, N., A. Triantafyllidis, V. Katsares, T. J. Abatzopoulos & C. Triantaphyllidis. 2009. Microsatellite variability of wild and farmed populations of Sparus aurata. J. Fish Biol., 74: 1816-1825.

Karakassis, I. 2007. Effect of aquaculture on Mediterranean marine ecosystems: findings of recent EU – funded projects and ongoing research activities. U: Impact of mariculture on coastal ecosytems. CIESM Workshop Monographs. Briand F. CIEMS, Monaco. 35-38.

Karlsson, S., O. H. Diserud P. Fiske & K. Hindar. 2016. Widespread genetic introgression of escaped farmed Atlantic salmon in wild salmon populations. ICES J. Mar. Sci. 73: 2488-2498.

Kashi, Y. D., King & M. Soller 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. Trends. Genet. 13: 74-78.

Katavić, I. & B. Antolić. 1999. On the impact of a sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cage farm on water quality and macrobenthic communities. Acta. Adriat. 40, 2: 19-32.

Katavić, I. & T. Vodopija. 2000. The possibilities of mariculture development in the Republic of Croatia, Ribarstvo. 59: 71-84.

Katavić, I., V. Tičina, L. Grubišić & V. Franičević. 2003. Tuna farming as a new achievement in mariculture of Croatia. In: Oray, I. K., Karakulak, F. S. (Eds.) Workshop on Farming, Management and Conservation of Bluefin Tuna, 5–7 April 2003m Istanbul, Turkey. Tur. Mar. Res. Fond. Publ. 13: 10-20.

Katavić, I. 2006. Rizici eutrofikacije kao posljedica nekontrolirane hranidbe riba u kaveznom uzgoju. Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme, 48: 157-164.

Katavić, I. 2008. Okolišni aspekti akvakulture s posebnim osvrtom na organski otpad i prihvatni kapacitet uzgajališta. Uzgoj slatkovodne ribe, stanje i perspektive Vukovar. str. 39-56.

Katavić, I. 2016. Marikultura. U: Ribogojstvo (Bogut I. ur.). Sveučilište u Osijeku, Sveučilište u Mostaru, Sveučilište u Splitu.

Katavić, I., T. Šegvić-Bubić, L. Grubišić & I. Talijančić. 2016. Reliability of bluefin tuna tuna size estimates using a stereoscopic camera system. Collective volume of scientific papers - ICAT. 72: 1848-1861.

Katavić, I. 2017. Challenges facing marine aquaculture in the EU-Mediterranean. Trends in Fisheries and Aquatic Animal Health (Panagiotis, Berilis (ed). UAE: Bentham Science Publishers. 42-84.

Katavić, I., N. Mladineo, M. Mladineo, G. Beg Paklar & G. Lončar. 2017. GIS-based multi-criteria analysis for mariculture site selection. Aquaculture Europe 2017 Dubrovnik. Hrvatska. str. 571-572.

Katavić, I. & A. Gavrilović. 2017. Focus on Croatia: Progress towards sustainable aquaculture Aquaculture Europe. 42, 1: 5-11.

Kawecki, T. J. 2008. Adaptation to marginal habitats. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 39: 321-342.

Kimura, M. & J. F. Crow 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics., 49: 725-738.

Knapik, E. W., A. Goodman, M. Ekker, M. Chevrette, J. Delgado, S. Neuhauss & H. J. Jacob. 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). Nature genetics. 18(4), 338-343.

Kobayashi, M., S. Msangi, M. Batka, S. Vannuccini, M. M. Dey & J. L. Anderson. 2015. Fish to 2030: the role and opportunity for aquaculture. Aquacult. Econ. Manag. 19: 282-300.

Koljonen M. L, J. Tähtinen, M. Säisä & J. Koskiniemi. 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. Aquaculture. 212: 69-92.

Lacy, R. C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. J. Mammal. 78: 320-335.

Laikre, L., R. Andren, H. O. Larsson & N. Ryman. 1996. Inbreeding depression in brown bear Ursus arctos. Biol. Conserv. 76: 69-72.

Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A.Rudnicki, R. Jaenisch & A. Berns. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. Nucleic. Acids. Res. 19:15.

Lal, S. P. 1989. Minerals. In J. E. Halver (Ed.), Fish nutrition 220–257. San Diego: Academic Press.

Lanes, C. F. C., T. T. Bizuayehu, S. Bolla, C. Martins, J. M. de Oliveira Fernandes, A. Bianchini & I. Babiak. 2012. Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua L*.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstock. Aquaculture. 324-325, 267-275.

Larsen, P. F., E. E. Nielsen, K. Meier, P. A. Olsvik, M. M. Hansen, & V. Loeschcke. 2012. Differences in salinity tolerance and gene expression between two populations of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in response to salinity stress. Biochem. Genet. 50: 454-466.

Launey, S., F. Krieg & P. Haffray. 2003. Twelve new microsatellite markers for gilted seabream (*Sparus aurata L*.): characterization, polymorphism and linkage. Mar. Environ. Res. 3: 457-459.

Lee-Montero, I., A. Navarro, Y. Borrell, M. García-Celdrán, N. Martín, D. Negrín-Báez, G. Blanco, E. Armero, C. Berbel, M. J. Zamorano, J. J. Sánchez, A. Estévez, G. Ramis, M. Manchado & J. M. Afonso. 2013. Development of the first standardised panel of two new microsatellite multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). Anim. Genet. 44: 533-546.

Lett, C., P. Verley, C. Mullon, C. Parada, T. Brochier, P. Penven & B. Blanke. 2008. A Lagrangian tool for modelling ichthyoplankton dynamics. Environ. Model. Softw. 28: 1210-1214.

Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, & E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol. Ecol. 11: 2453-2465.

Liao, M., G. Yang, X. Wang, D. Wang, G. Zou & Q. Wei. 2006. Development of microsatellite DNA markers of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and their cross-species application in bighead carp (*Aristichthys nobilis*). Mol. Ecol. Notes. 7: 95-99.

Litt, M. & J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44: 397.

López-Flores, I. & M. A. Garrido-Ramos. 2012. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. In Repetitive DNA. Karger Publishers.7: 1-28.

Lopparelli, R. M., S. Segato, A. Corato, L. Fasolato & I. Andrighetto. 2004. Sensory evaluation of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) fed two diets differing in fat content. Vet. Res. Commun. 28: 225-227.

Loukovitis, D., E. Sarropoulou, E. Vogiatzi, C. S. Tsigenopoulos, G. Kotoulas, A. Magoulas & D Chatziplis. 2012. Genetic variation in farmed populations of the gilthead sea bream *Sparus aurata* in Greece using microsatellite DNA markers. Aquacult Res. 43: 239−246.

Lovatelli, A., J.Aguilar-Manjarrez & D. Soto. 2013. Expanding mariculture farther offshore: technical, environmental, spatial and governance challenges. FAO Fisheries and Aquaculture Proceedings (FAO) eng no. 24.

Loy, A., C. S. Boglione & Cataudella. 1999. Geometric morphometrics and morpho – anatomy: a combined tool in the study of sea bream (*Sparus aurata, Sparidae*) shape. J. Appl. Ichthyol. 15: 104-110.

Lucchini, V., A. Galov & E. Randi. 2004. Evidence of genetic distincion and long-term population decline in wolves (*Canis lupus*) in the Italian Apennines. Mol. Ecol. 13: 523-536.

Manzon, L. A. 2002. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. Gen Comp Endocrinol. 125: 291-310.

Marie, A. D., L. Bernatchez & D. Garant. 2011. Empirical assessment of software efficiency and accuracy to detect introgression under variable stocking scenarios in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). Conserv. Genet. 12, 1215–1227.

Matić-Skoko, S., T. Šegvić-Bubić, I. Mandić, D. Izquierdo-Gomez, E. Arneri, P. Carbonara & P. Sartor. 2018. Evidence of subtle genetic structure in the sympatric species *Mullus barbatus* and *Mullus surmuletus* (Linnaeus, 1758) in the Mediterranean Sea. Sci. Rep. 8: 676

McGinnity, P. 2009. Impact of naturally spawning captive-bred Atlantic salmon on wild populations: depressed recruitment and increased risk of climate-mediated extinction. Proc. R. Soc. B. 276: 3601-3610.

Mendonça, F. F., L. H. F. Ussami, D. T. Hashimoto, L. H. G. Pereira, F. Porto-Foresti, C. Oliveira, O. B. F. Gadig & F. Foresti. 2012. Identification and characterization of polymorphic microsatellite loci in the blue shark Prionace glauca, and cross-amplification in other shark species. J. Fish Biol. 80: 2643-2646.

Menezes, M. R., D. Noguchi, M. Nakajima & N. Taniguchi. 2008. Microsatellite development and survey of genetic variation in skipjack tuna Katsuwonus pelamis. J. Fish Biol. 73: 463-473.

Miggiano, E., S. De Innocentiis, A. Ungaro, L. Sola, & D. Crosetti. 2005. AFLP and microsatellites as genetic tags to identify cultured gilthead seabream escapees: data from a simulated floating cage breaking event. Aquac. Environ. Interact. 13: 137-146.

Mistri, M., E. A. Fano, G. Rossi, K. Caselli & R. Rossi. 2000. Variability in macrobenthos communities in the Valli di Comacchio, northern Italy, a hypereutrophized lagoonal ecosystem. Estuar. Coast. Shelf, Sci. 51: 599-611.

Mladineo, I., T. Šegvić-Bubić, R. Stanić & Y. Desdevises. 2013. Morphological plasticity and phylogeny in a monogenean parasite transferring between wild and reared fish populations. PloS one. 8: e62011.

Moretti, A., M. Fernandez-Criado, G. Cittolin & R. Guidastri. 1999. Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream Volume 1. FAO. Rim. 205 str.

Morgante, M., M. Hanafey, W. Powell. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nat. Genet. 30: 194-200.

MPS, 2019, https://poljoprivreda.gov.hr/statistika-360/360. Pristupljeno listopad, 2019.

Nasopoulou, C., T. Nomikos, C. A. Demopoulos & I. Zabetakis. 2007. Comparison of antiatherogenic properties of lipids obtained from wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Food. Chem. 100: 560-567.

Naylor, R., K. Hindar, I. A. Fleming, R. Goldburg, S. Williams, J. Volpe & F. Whoriskey. 2005. Fugitive salmon: assessing the risks of escaped fish from net-pen aquaculture. Biosci. 55: 427–437.

Negrín-Báez, D., A. Navarro, J. M. Afonso, R. Ginés & M. J. Zamorano. 2015. Detection of QTL associated with three skeletal deformities in gilthead seabream (*Sparus aurata L.*): Lordosis, vertebral fusion and jaw abnormality. Aquaculture. 448: 123-127.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 3321–3323.

Novel, P., J. M. Porta, J. Porta, J. Bejar & M. C. Alvarez. 2010. PCR multiplex tool with 10 microsatellites for the European seabass (*Dicentrarchus labrax*)-Applications in genetic differentiation of populations and parental assignment. Aquaculture. 308: 34-38.

Orban, E., T. Nevigato, G. Di Lena, I. Casini & A. Marzetti. 2003. Differentiation in the lipid quality of wild and farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). J. Food Sci. 68: 128-132.

Orsini, L., S. Huttunen & C. Schlotterer. 2004. A multilocus microsatellite phylogeny of the *Drosophila virilis* group. Heredity. 93: 161-165.

Otha, T. & M. Kimura. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. Genet. Res. 22: 201-204.

Ottavian, M., P. Facco, L. Fasolato, E. Novelli, M. Mirisola & M. Perini. 2012. Use of near-infrared spectroscopy for fast fraud detection in seafood: application to the authentication of wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Agric. Food. Sci. 60: 639-648.

Patterson, K. & P. J. Blanchfield. 2013. Oncorhynchus mykiss escaped from commercial freshwater aquaculture pens in Lake Huron, Canada. Aquac. Environ. Interact. 4: 53-65.

Peakall, R. O. D. & P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes. 6: 288-295.

Pita, C., S. Gamito & K. Erzini. 2002. Feeding habits of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) from the Ria Formosa (southern Portugal) as compared to the black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) and the annular seabream (*Diplodus annularis*). J. Appl. Ichthyol. 18: 81-86.

Planes, S., & Romans, P. 2004. Evidence of genetic selection for growth in new recruits of a marine fish. Mol. Ecol. 13: 2049-2060.

Portnoy, D. S., C. M. Hollenbeck, R. R. Vidal & J. R. Gold. 2014. A comparison of neutral and immune genetic variation in Atlantic salmon, *Salmo salar L*. in Chilean aquaculture facilities. PLoS ONE. 9: e99358.

Powell, W., G. C. Machray & J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends. Plant. Sci. 1: 215-222.

Power, D. M., B. Louro, R. Houston, L. Anjos & J. C. R. Carodo. 2011. Genomic-proteomic research in Sparidae and its application to genetic improvement. In: Pavlidis, M. & C. Mylonas (eds). *Sparidae*: biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species. Blackwell Publishing Ltd. Oxford. UK. 359-381.

Price, C. S. & J. A. Morris. 2013. Marine Cage Culture and the Environment: Twenty – first Century Science Informing a Sustainable Industry. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 16. 158 str.

Pritchard, J., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155: 945-959.

Pusey, A. & M. Wolf. 1996. Inbreeding avoidance in animals. Trends Ecol. Evol. 11: 201-206.

Radonić, I. 2019. Populacijska analiza atlantske plavoperajne tune, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) u kaveznom uzgoju primjenom mikrosatelitnih lokusa. Doktorska disertacija.

Rajendrakumar, P., A. K. Biswal, S. M. Balachandran, K. Srinivasarao & R. M. Sundaram. 2007. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. Bioinformatics. 23: 1-4.

Reed, D. H. & R. Frankham. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. Conserv. Biol., 17: 230-237.

Rengmark, A. H., A. Slettan, Ø. Skaala, Ø. Lie & F. Lingaas. 2006. Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) strains estimated by SNP and microsatellites. Aquaculture. 253: 229-237.

Rice, WR. 1989. Analyzing tables of statistical tests. Evolution., 43: 223-225.

Rosenberg, N. A. & P. P. Calabrese. 2004. Polyploid and multilocus extensions of the Wahlund inequality. Theor. Popul. Biol. 66: 381-391.

Rossi, A. R., E. Perrone & L. Sola. 2006. Genetic structure of gilthead sea bream Sparus aurata in the Central Mediterranean Sea. Cent. Eur. J. Bio. 1: 636-647.

Rowe, G., M. Sweet & T. J. C. Beebee. 2017. An introduction to molecular ecology. Oxford University Press.

Russo, T., C. Costa & S. Cataudella. 2007. Correspondence between shape and feeding habit changes throughout ontogeny of gilthead sea bream *Sparus aurata* L., 1758. J. Fish. Biol. 71: 629-656.

Ryman, N. & S. Palm. 2006. POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. Mol. Ecol. 6: 600-602.

Sakamoto, T., R. G. Danzmann, K. Gharbi, P. Howard, A. Ozaki, S. K. Khoo & R. Guyomard. 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. Genetics. 155(3), 1331-1345.

Sanchez-Jerez, P., D. Fernandez-Jover, I. Uglem, P. Arechavala-Lopez, T. Dempster, J. T. Bayle-Sempere, C. Valle Pérez, D. Izquierdo, P. A. Bjørn & R. Nilsen. 2011. Coastal Fish Farms as Fish Aggregation Devices (FADs). U: Bortone SA, Pereira Brandini F, Fabi G, Otake S (ur.), Artificial reefs in fisheries managment. CRC Press. New York. 187-209.

Satake, A. & H. Araki. 2012. Stocking of captive-bred fish can cause long-term population decline and gene pool replacement: Predictions from a population dynamics model incorporating density dependent mortality. Theor. Ecol. 5: 283-296

Schlötterer, C. & J. Pemberton. 1994. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. In Molecular ecology and evolution: Approaches and applications (pp. 203-214). Birkhäuser, Basel.

Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma. 109:365-371.

Selkoe, K. A. & R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecol. Lett. 9: 615-629.

Serrano, R., M. A. Blanes & F. J. López. 2008. Biomagnification of organochlorine pollutants in farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and stable isotope characterization of the trophic chains. Sci. Total. Environ. 389: 340-349.

Serrano, R., M. A. Blanes & L. Orero. 2007. Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues from the western Mediterranean. Chemosphere. 69: 1075-1080.

Shaltout, M. & A. Omstedt. 2015. Modelling the water and heat balances of the Mediterranean Sea using a two-basin model and available meteorological, hydrological, and ocean data. Oceanologia. 57: 116-131.

Shanks, A. L. 2009. Pelagic larval duration and dispersal distance revisited. Biol. Bull. 216: 373–385 .

Shirak, A., Y. Palti, A. Cnaani, A. Korol, G. Hulata, M. Ron & R. R. Avtalion. 2002. Association between loci with deleterious alleles and distorted sex ratios in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*). Journal of Heredity. 93: 270-276.

Skaala, Ø., K. A. Glover, B. T. Barlaup, T. Svåsand, F. Besnier, M. M. Hansen & R .Borgstrøm. 2012. Performance of farmed, hybrid, and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) families in a natural river environment. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 69: 1994-2006.

Skaala, O., V. Wennevik & K. A. Glover. 2006. Evidence of temporal genetic change in wild Atlantic salmon, *Salmo salar L*., populations affected by farm escapees. ICES. J. Mar. Sci. 63: 1224-1233.

Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 16: 393-430.

Smith, D. N. & M. E. Devey. 1994. Occurrence and inheritance of microsatellites in Pinus radiata. Genome., 37: 977-983.

Sola L, A. Moretti, D. Crosetti, N. Karaiskou, A. Magoulas, A. R. Rossi, M. Rye, A. Triantafyllidis & C. S. Tsigenopoulos. 2006. Gilthead seabream – *Sparus aurata*. U: Crosetti D, Lapègue S, Olesen I, Svaasand T (ur.), Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations. GENIMPACT project: Evaluation of genetic impact of aquaculture activities on native populations. A European network, Italija, 6 str.

Sola, L., S. De Innocentiis, A. R. Rossi, D. Crosetti, M. Scardi & C. Boglione. 1998. Genetic variability and fingerling quality in wild and reared stocks of European sea bass. Cahiers Options Me´diterrane´ennes 34: 273-280.

Somarakis, S., M. Pavlidis, C. Saapoglou, C. S. Tsigenopoulos, & T. Dempster. 2013. Evidence for 'escape through spawning' in large gilthead sea bream Sparus aurata reared in commercial sea-cages. Aquacult. Environ. Inter. 3: 135-152.

Stagličić, N., T. Šegvić-Bubić, P. Ugarković, I. Talijančić, I. Žužul, V. Tičina & L. Grubišić. 2017. Ecological role of Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fish farms for associated wild fish assemblages in Mediterranean Sea. Mar. Environ. Res., 132: 79-93.

STECF - Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries – Monitoring the performance of the Common Fisheries Policy (STECF-Adhoc-18-01). Publications Office of the European Union. Luxembourg. 2018. ISBN 978-92-79-85802-4.

Streelman, J. T. & T. D. Kocher. 2002. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia. Physiol. Genomics.,9: 1-4.

Šegvić-Bubić, T., L. Grubišić, N. Karaman, V. Tičina, K. Mišlov Jelavić & I. Katavić. 2011a. Damages on mussel farms potentially caused by fish predation – Self service on the ropes? Aquaculture. 319: 497-504.

Šegvić-Bubić, T., I. Lepen, Ž. Trumbić, J. Ljubković, D. Sutlović, S. Matić-Skoko, L. Grubišić, B. Glamuzina & I. Mladineo. 2011b. Population genetic structure of reared and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in the Adriatic Sea inferred with microsatellite loci. Aquaculture. 318: 309-315.

Šegvić-Bubić, T., L. Grubišić, V. Tičina & I. Katavić. 2011c. Temporal and spatial variability of pelagic wild fish assemblages around Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* farms in the eastern Adriatic Sea. J. Fish Biol. 78: 78-97.

Šegvić-Bubić, T., I. Talijančić, L. Grubišić, D. Izquierdo-Gomez & I. Katavić. 2014. Morphological and molecular differentiation of wild and farmed gilthead sea bream *Sparus aurata*: implications for management. Aquac. Environ. Interact. 6: 43-54.

Šegvić-Bubić, T., L. Grubišić, Ž. Trumbić, R. Stanić, J. Ljubković, J. Maršić-Lučić & I. Katavić. 2017. Genetic characterization of wild and farmed European seabass in the Adriatic sea: assessment of farmed escapees using a Bayesian approach. ICES J. Mar. Sci. 74: 369-378.

Šegvić-Bubić, T., P. Arechavala-Lopez, I. Vučić, I. Talijančić, L. Grubišić, I. Žužul & Ž. Kovač. 2018. Site fidelity of farmed gilthead seabream *Sparus aurata* escapees in a coastal environment of the Adriatic Sea. Aquacult. Environ. Interact. 10: 21-34.

Šimat, V., T. Bogdanović, M. Krželj, A. Soldo & J. Maršić-Lučić. 2012. Differences in chemical, physical and sensory properties during shelf life assessment of wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). J. Appl. Ichthyol. 28: 95-01.

Takagi M, T. Okamura, S. Chow & N. Taniguchi. 1999. PCR primers for microsatellite loci in tuna species of the genus *Thunnus* and its application for population genetic study. Fish. Sci. 65: 571-576.

Talijančić, I., T. Šegvić-Bubić, I. Žužul, T. Džoić, J. Maršić-Lučić & L. Grubišić. 2019. Interactions between wild gilthead seabream *Sparus aurata* and tuna farms in the Adriatic Sea: morphological and ecophysiological fish adaptations. Aquac. Environ. Interact. 11: 97-110.

Tancioni, L., S. Mariani, A. Maccaroni, A. Mariani, F. Massa, M. Scardi & S. Cataudella. 2003. Locality-specific variation in the feeding of *Sparus aurata L.*: evidence from two Mediterranean lagoon systems. Coast. Shelf Sci. 57: 469-474.

Taranger, G. L., Ø. Karlsen, R. J. Bannister, K. A. Glover, V. Husa, E. Karlsbakk & A. Madhun. 2015. Risk assessment of the environmental impact of Norwegian Atlantic salmon farming. ICES J. Mar. Sci. 72: 997-1021

Toledo-Guedes, K., P. Sanchez-Jerez & A. Brito. 2014. Influence of a massive aquaculture escape event on artisanal fisheries. Fish. Manag. Ecol. 21: 113-121

Toledo-Guedes, K., P. Sanchez-Jerez, G. Gonzalez-Lorenzo & A. Brito. 2009. Detecting the degree of establishment of a non-indigenous species in coastal ecosystems: sea bass *Dicentrarchus labrax* escapes from sea cages in Canary Islands (Northeastern Central Atlantic). Hydrobiol. 623: 203-212

Tong, J., Z. Wang, X. Yu, Q. Wu & K. H. Chu. 2002. Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite primers of common carp. Mol. Ecol. Notes. 2: 245-247.

Treer T., R. Safner, I. Aničić & M. Lovrinov. 1995. Ribarstvo. Globus. Zagreb.

Trenberth, K. E., Jones, P. H., Ambenje, P., Bojariu, R., Easterling, D., Tank, A. K., Parker, D., Rahimzadeh, F., Renwick, J. A., Rusticucci, M., i sur. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Poglavlje 3. Observations: Surface and Atmospheric Climate Change. Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M., Miller, H. L., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK.

Triantafyllidis, A. 2007. Aquaculture escapes: new DNA based monitoring analyses and application on sea bass and sea bream. In: F. Briand (ed.), Impact of Mariculture on Coastal Ecosystems. CIESM Workshop Monographs 32, Monaco. 22-67

Tymchuk, W. E., L. F. Sundström & R. H. Devlin 2007. Growth and survival trade-offs and outbreeding depression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Evolution. 61: 1225-1237.

Uglem, I, P. A. Bjřrn, T. Dale & S. Kerwath. 2008. Movements and spatiotemporal distribution of escaped farmed and local wild Atlantic cod (*Gadus morhua L.*). Aquac. Res., 39: 158-170.

Vähä, J. P. & C. R. Primmer. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. Mol. Ecol., 15: 63-72.

Väli, Ü., A. Einarsson, L. Waits & H. Ellegren. 2008. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? Mol. Ecol. 17: 3808-3817.

Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wilis & P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol. 4: 535-538.

Vandeputte, M. & S. Launey. 2004. The genetic management of fish domestication. INRA. Prod. Anim. 17: 237-242.

Vosman, B., P. Arens, W. Rus-Kortekaas & M. J. M. Smulders. 1992. Identification of highly polymorphic DNA regions in tomato. Theor. Appl. Genet. 85: 239-244.

Waldbieser, G. C., B. G. Bosworth, D. J. Nonneman & W. R. Wolters. 2001. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Genetics. 158: 727-734.

Waples, R. S. 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. Genetics. 121: 379-391.

Wells, B. K., B. E. Rieman, J. L. Clayton, D. L. Horan & C. M. Jones. 2003. Relationships between water, otolith, and scale chemistries of westslope cutthroat trout from the Coeur d'Alene River, Idaho: the potential application of hard-part chemistry to describe movements in freshwater. Trans. Am. Fish. Soc. 132: 409-424.

Wringe, B. F., R. R. Stanley, N. W. Jeffery, E. C. Anderson & I. R. Bradbury. 2017. HYBRIDDETECTIVE: a workflow and package to facilitate the detection of hybridization using genomic data in R. Mol. Ecol. Resour. 17: e275-e284.

Wu R. 1995. The Environmental Impact of Marine Fish Culture: Towards a Sustainable Future. Mar. Pollut. Bull. 31: 159-166.

Yeh, F., R. Young & T. Boyle. 2000. POPGENE, Version 1.32. A Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta. Edmonton. Canada.

Youngson, A., A. Dosdat, M. Saroglia & W. Jordan. 2001. Genetic interactions between marine finfish species in European aquaculture and wild conspecifics. J. Appl. Ichthyol. 17: 153- 162.

Yue, G. H., M. Y Ho,. L. Orban & J. Komen. 2004. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. Aquaculture. 234: 85-98.

Žužul, I., T. Šegvić-Bubić, I. Talijančić, T. Džoić, I. Lepen-Pleić, G. Beg Paklar, S. Ivatek-Šahdan, I. Katavić & L. Grubišić. 2019. Spatial connectivity pattern of expanding gilthead seabream populations and its interactions with aquaculture sites: a combined population genetic and physical modelling approach. Sci. Rep. 9: 14718.

7. PRILOZI

Tablica 7.1. Sažeta statistika za genetičku raznolikost vrste *Sparus aurata*, prikazuje broj uzoraka (n), broj alela (nA), zapaženu heterozigotnost (H_O), očekivanu heterozigotnost (H_E) i fiksacijski indeks (F_{IS}) za 19 neutralnih mikrosatelitnih lokusa za svih 27 populacija.

Lo		09 WH	15 WT	15 WN	16 WR	16 WU	16 WV	16 WK	16 WD	15 AK	15 AB	15 AJ	16 AK	16 AB	17 AK	17 AB	15 JP	15 JN	16 JP	16 JR	15 JB	15 FC	15 FI	16 FI	16 FG	15 FF	16 FFa	16 FFb
E1	**n**	41	80	90	89	47	86	29	19	56	44	21	50	46	60	70	124	71	25	34	30	96	97	57	15	71	59	79
	nA	10	10	8	10	9	9	8	8	7	9	8	8	9	9	9	9	9	8	9	4	9	8	7	6	5	5	5
	HO	0,76	0,84	0,77	0,76	0,68	0,78	0,79	0,79	0,73	0,82	0,86	0,78	0,91	0,87	0,81	0,77	0,77	0,84	0,82	0,73	0,77	0,77	0,70	0,67	0,66	0,85	0,76
	HE	0,82	0,84	0,80	0,80	0,80	0,80	0,77	0,83	0,79	0,79	0,80	0,79	0,84	0,85	0,82	0,78	0,78	0,79	0,79	0,75	0,80	0,78	0,69	0,72	0,73	0,78	0,73
	FIS	0,08	0	0,04	0,04	0,16	0,03	-0,05	0,10	0,08	-0,04	-0,07	0,01	-0,09	-0,02	0,01	0,02	0,01	-0,06	-0,04	0,02	0,04	0,01	-0,01	0,08	0,09	-0,09	-0,04
C3	**n**	40	80	89	89	47	86	29	19	56	44	21	50	46	60	70	124	71	25	34	30	96	97	57	15	71	59	79
	nA	27	32	29	27	29	30	21	17	25	29	15	26	26	28	29	36	27	20	19	16	31	24	19	12	22	18	21
	HO	0,90	0,94	0,90	0,88	0,98	0,93	0,93	0,89	0,93	0,91	0,95	0,96	0,96	0,88	0,91	0,95	0,87	0,84	0,94	0,93	0,90	0,95	0,91	1	0,92	0,95	0,85
	HE	0,95	0,95	0,96	0,95	0,95	0,95	0,95*	0,94	0,94	0,95	0,93	0,96	0,96	0,96	0,96	0,95	0,94	0,95	0,94	0,9	0,94	0,82	0,94	0,91	0,93	0,90	0,92
	FIS	0,06	0,01	0,06	0,08	-0,03	0,02	0,02	0,003	0,02	0,05	-0,02	-0,004	-0,00	0,08	0,05	0,003	0,07	0,11	0,002	-0,04	0,05	-0,02	0,03	-0,10	0,02	-0,05	0,08
D4	**n**	40	80	88	88	45	83	28	18	56	42	21	50	43	58	64	123	71	24	34	30	96	97	57	15	62	59	72
	nA	14	12	14	14	12	14	11	13	13	11	11	15	12	13	16	14	14	11	13	9	13	11	12	7	9	9	9
	HO	0,6	0,68	0,74	0,74	0,64	0,71	0,82	0,78	0,64	0,62	0,67	0,64	0,7	0,71	0,75	0,73	0,65	0,75	0,62	0,77	0,67	0,71	0,67	0,73	0,63	0,66	0,69
	HE	0,83*	0,78	0,85	0,82	0,85	0,86	0,84	0,84	0,79	0,77	0,81	0,84	0,87	0,83	0,87	0,84	0,83	0,80	0,88*	0,83	0,79	0,82	0,74	0,74	0,83*	0,81	0,84
	FIS	0,28*	0,13	0,13	0,11	0,25	0,17	-0,03	0,08	0,19	0,20	0,18	0,24	0,20	0,15	0,14	0,13	0,22*	0,07	0,30	0,08	0,15	0,13	0,10	0,02	0,25	0,18	0,18
D11	**n**	41	80	90	89	46	86	29	19	56	44	21	50	45	60	70	123	71	25	34	30	93	97	57	15	70	59	78
	nA	11	13	13	13	12	13	8	10	12	12	11	11	13	11	12	11	12	11	12	8	12	10	10	7	9	9	12
	HO	0,80	0,85	0,87	0,74	0,78	0,79	0,69	0,79	0,66	0,80	0,67	0,74	0,78	0,65	0,7	0,76	0,87	0,8	0,76	0,77	0,77	0,74	0,70	0,67	0,67	0,76	0,71
	HE	0,81	0,84	0,85	0,81	0,80	0,83*	0,75	0,86	0,83*	0,85	0,77	0,86	0,85	0,86*	0,83	0,82	0,86	0,84	0,88	0,84	0,85	0,82	0,80	0,80	0,80	0,78	0,81
	FIS	0,01	-0,02	-0,02	0,08	0,02	0,05	0	0,14	0,21	0,07	0,14	0,14	0,08	0,25*	0,16	0,07	-0,01	0,04	0,13	0,09	0,09	0,1	0,13	0,17	0,17	0,02	0,13
C12	**n**	41	80	90	88	47	85	29	19	56	44	21	50	45	60	70	123	71	25	34	30	96	97	57	15	71	59	79
	nA	7	7	7	8	8	7	6	5	6	8	7	7	7	8	7	9	8	5	7	4	8	7	6	5	5	4	6
	HO	0,61	0,7	0,71	0,65	0,64	0,72	0,52	0,63	0,83	0,75	0,62	0,80	0,67	0,65	0,76	0,61	0,72	0,60	0,76	0,57	0,66	0,70	0,74	0,67	0,63	0,27	0,49
	HE	0,67	0,62	0,68	0,64	0,63	0,71	0,68	0,68	0,67	0,70	0,65	0,72	0,67	0,67	0,68	0,68	0,67	0,70	0,74	0,56	0,64	0,66	0,71	0,71	0,59	0,30	0,54
	FIS	0,09	-0,13	-0,04	-0,01	-0,02	-0,01	0,12	0,1	-0,03	-0,08	0,05	-0,12	0	0,03	-0,12	0,1	-0,08	0,15	-0,03	-0,01	-0,03	-0,06	-0,04	0,06	-0,08	0,1	0,08
I9	**n**	41	80	90	88	46	86	29	19	56	44	21	50	44	59	69	123	70	25	34	30	80	97	57	15	70	59	79
	nA	7	10	10	10	8	9	6	5	10	8	6	9	7	8	9	11	8	7	8	6	8	10	9	6	5	6	5
	HO	0,83	0,83	0,82	0,77	0,74	0,78	0,90	0,89	0,86	0,86	0,86	0,80	0,75	0,71	0,70	0,75	0,81	0,84	0,85	0,87	0,83	0,79	0,77	1	0,79	0,86	0,68
	HE	0,80	0,81	0,78	0,80	0,77	0,81	0,79	0,73	0,80	0,82	0,74	0,79	0,79	0,80	0,78	0,79	0,79	0,81	0,81	0,77	0,80	0,80	0,78	0,83	0,72	0,75	0,71
	FIS	-0,04	-0,02	-0,05	0,04	0,05	0,04	-0,2	-0,22	-0,07	-0,05	-0,16	-0,02	0,06	0,11	0,11	0,05	-0,04	-0,04	-0,06	-0,13	-0,04	0	0,01	-0,21	-0,10	-0,16	0,04
E4	**n**	40	79	90	89	47	86	29	19	56	44	21	50	46	60	70	124	71	25	34	30	94	97	57	15	71	59	79
	nA	10	12	12	13	12	12	10	10	11	11	9	11	10	11	10	14	13	9	12	9	13	11	10	8	9	10	9
	HO	0,90	0,85	0,84	0,84	0,85	0,92	0,93	0,84	0,86	0,89	0,76	0,86	0,7	0,90	0,81	0,87	0,90	0,92	0,85	0,77	0,85	0,89	0,79	0,93	0,72	0,85	0,91
	HE	0,87	0,88	0,86	0,87	0,86	0,88	0,87	0,89	0,87	0,89	0,86	0,88	0,86*	0,89	0,88	0,88	0,87	0,87	0,86	0,78	0,89	0,85	0,81	0,83	0,85	0,76	0,85
	FIS	-0,03	0,04	0,02	0,03	0,01	-0,05	-0,07	0,12	0,02	-0,01	0,12	0,02	0,20	-0,02	0,07	0,01	-0,03	-0,07	0,01	0,02	0,04	-0,04	0,02	-0,13	0,03	-0,11	-0,07
A5	**n**	41	79	90	89	47	86	29	19	56	42	21	50	45	60	70	124	71	25	34	30	96	97	57	15	71	59	79
	nA	4	5	4	4	5	5	3	3	4	4	4	6	4	5	5	5	4	5	5	6	6	5	4	4	6	5	6
	HO	0,71	0,62	0,69	0,67	0,60	0,71	0,52	0,32	0,68	0,62	0,67	0,42	0,56	0,53	0,73	0,52	0,63	0,56	0,71	0,7	0,58	0,64	0,74	0,8	0,75	0,56	0,75
	HE	0,65	0,65	0,60	0,62	0,53	0,67	0,57	0,49	0,71	0,74	0,60	0,69*	0,72	0,69*	0,61	0,69	0,72	0,74	0,74	0,72	0,60*	0,72	0,65	0,67	0,77	0,70	0,70
	FIS	-0,09	0,05	-0,14	-0,09	-0,13	-0,05	0,05	0,36	0,04	0,16	-0,11	0,39*	0,23	0,23	-0,19	0,24*	0,12	0,24	0,05	0,03	0,03	0,12	-0,13	-0,2	0,04	0,2	-0,06
M5	**n**	41	79	90	89	46	85	29	19	56	44	21	50	46	60	68	124	71	25	33	30	96	97	57	15	70	59	77
	nA	19	24	22	25	20	19	19	16	22	16	13	21	20	24	22	27	24	16	16	11	17	18	14	9	12	10	13
	HO	0,95	0,86	0,86	0,87	0,85	0,85	0,74	0,84	0,89	0,89	0,90	0,82	0,87	0,85	0,72	0,83	0,79	0,96	0,73	0,72	0,85	0,86	0,75	1	0,80	0,86	0,84
	HE	0,90	0,86	0,86	0,87	0,87	0,84	0,87*	0,86	0,84	0,88	0,79	0,85	0,87	0,86	0,84	0,88	0,87	0,88	0,81	0,86	0,87	0,84	0,78	0,85	0,83	0,69	0,84
	FIS	-0,06	0,01	0	0	0,03	-0,01	0,16	-0,04	-0,06	-0,01	-0,15	0,04	0	0,01	0,14	0,06	0,09	-0,09	0,10	0,11	0,02	-0,02	0,03	-0,18	0,04	-0,25	-0,01
L11	**n**	41	80	90	89	47	86	29	19	56	44	21	50	46	60	70	124	71	25	34	30	96	97	57	30	71	59	78
	nA	4	7	6	7	5	6	6	5	5	6	5	7	5	5	5	7	8	4	6	5	5	6	5	4	5	4	4
	HO	0,76	0,64	0,67	0,69	0,70	0,76	0,72	0,53	0,71	0,64	0,57	0,64	0,65	0,68	0,84	0,67	0,69	0,56	0,71	0,73	0,77	0,64	0,86	0,80	0,72	0,68	0,64
	HE	0,72	0,70	0,7	0,69	0,68	0,72	0,70	0,71	0,68	0,72	0,70	0,74	0,70	0,67	0,70	0,70	0,71	0,71	0,73	0,72	0,70	0,65	0,77	0,70	0,69	0,73	0,69

	FIS	-0,05	0,09	0,05	0	-0,04	-0,06	0,03	0,2	-0,06	0,12	0,19	0,13	0,07	-0,02	-0,2	0,04	0,02	0,22	0,03	-0,02	-0,11	0,02	-0,12	-0,15	-0,04	0,07	0,07
J1	**n**	41	80	90	89	47	86	29	19	56	44	21	50	46	59	70	124	71	25	34	30	96	97	57	15	71	58	79
	nA	10	17	15	17	15	15	14	12	15	15	9	15	13	14	15	17	13	10	12	7	14	15	14	9	11	9	11
	HO	0,80	0,81	0,80	0,87	0,89	0,81	0,83	0,89	0,86	0,82	0,81	0,82	0,85	0,95	0,80	0,84	0,77	0,76	0,76	0,83	0,91	0,75	0,86	0,8	0,7	0,86	0,77
	HE	0,85	0,89	0,89	0,90	0,91	0,89	0,89	0,90	0,84	0,85	0,84	0,85	0,85	0,89	0,89	0,84	0,84	0,87	0,85	0,83	0,90	0,86*	0,87	0,85	0,81	0,82	0,83
	FIS	0,06	0,09	0,10	0,04	0,01	0,08	0,02	-0,01	-0,02	0,04	0,04	0,03	0	-0,06	0,1	0,01	0,08	0,12	0,10	0	-0,01	0,12	0,01	0,06	0,14	-0,06	0,07
G2	**n**	41	79	89	89	46	85	29	19	56	43	21	50	46	59	67	124	71	25	34	27	94	97	56	15	69	59	79
	nA	16	16	22	19	17	20	13	13	17	15	15	17	18	16	18	21	19	12	17	11	19	15	15	10	14	14	14
	HO	0,93	0,87	0,90	0,88	0,98	0,89	0,79	0,79	0,84	0,84	0,86	0,76	0,87	0,85	0,87	0,83	0,87	0,88	0,82	0,63	0,90	0,70	0,73	0,73	0,64	0,71	0,78
	HE	0,92	0,89	0,92	0,89	0,90	0,90	0,90*	0,91	0,89	0,88	0,92	0,88	0,91	0,89	0,88	0,90*	0,90	0,90	0,90	0,82	0,87	0,74	0,80	0,67	0,88*	0,79	0,83
	FIS	-0,01	0,02	0,02	0,02	-0,09	0	0,08	0,19	0,06	0,05	0,07	0,14	0,04	0,05	0,02	0,08	0,04	0,02	0,09	0,24	-0,04	0,06	0,09	-0,1	0,28*	0,1	0,05
G3	**n**	41	79	90	89	46	86	29	19	55	44	21	50	45	59	70	124	70	23	34	30	92	97	57	15	71	59	79
	nA	7	7	9	8	9	6	6	5	7	7	4	5	7	7	8	8	10	5	5	3	4	6	6	4	4	4	7
	HO	0,46	0,53	0,42	0,39	0,48	0,38	0,48	0,68	0,42	0,43	0,24	0,42	0,47	0,24	0,57	0,46	0,49	0,39	0,32	0,4	0,45	0,38	0,28	0,47	0,25	0,37	0,44
	HE	0,68*	0,66*	0,61*	0,59*	0,68*	0,63*	0,65	0,71	0,66*	0,67*	0,67*	0,65*	0,63	0,57*	0,69	0,68*	0,67	0,59	0,56*	0,37	0,57	0,51*	0,41	0,61	0,54*	0,52	0,58
	FIS	0,32	0,20	0,31	0,33*	0,3	0,39*	0,35	0,04	0,37	0,36	0,65*	0,36	0,26	0,58*	0,18	0,33*	0,28	0,35	0,43	-0,08	0,22	0,26	0,32	0,24	0,53*	0,28	0,24
I8	**n**	41	78	90	89	47	86	29	19	56	44	21	50	46	59	70	123	71	25	34	30	93	97	55	15	71	59	79
	nA	14	12	12	12	10	13	10	10	13	11	9	11	10	11	11	13	11	11	13	7	14	10	10	6	9	9	9
	HO	0,76	0,82	0,80	0,80	0,74	0,86	0,86	0,84	0,77	0,77	0,76	0,88	0,67	0,75	0,84	0,80	0,86	0,92	0,79	0,8	0,84	0,81	0,65	0,93	0,82	0,71	0,85
	HE	0,82	0,81	0,79	0,82	0,79	0,82	0,82	0,81	0,83	0,79	0,85	0,85	0,74	0,80	0,85	0,80	0,81*	0,85	0,79	0,83	0,83	0,83	0,74	0,83	0,83	0,86	0,81
	FIS	0,08	-0,01	-0,02	0,03	0,05	-0,05	-0,03	-0,05	0,07	0,03	0,11	-0,04	0,09	0,07	0	0,01	-0,06	-0,08	-0,01	0,04	-0,01	0,01	0,11	-0,13	0,02	0,17	-0,05
L7	**n**	41	80	90	89	47	86	29	19	56	44	21	50	46	60	70	124	71	25	34	30	96	97	57	15	71	59	79
	nA	4	4	4	4	5	4	3	3	4	4	3	4	4	4	5	5	4	3	4	3	4	3	3	3	4	3	4
	HO	0,44	0,53	0,54	0,48	0,55	0,42	0,34	0,53	0,55	0,64	0,43	0,42	0,57	0,38	0,54	0,52	0,41	0,60	0,53	0,6	0,46	0,48	0,51	0,67	0,54	0,61	0,51
	HE	0,58	0,61	0,6	0,62	0,61	0,63*	0,65*	0,62	0,6*	0,62	0,56	0,57	0,61	0,62*	0,68	0,60*	0,65*	0,51	0,59	0,58	0,59*	0,66*	0,65	0,63	0,62*	0,58	0,56
	FIS	0,25	0,15	0,1	0,23	0,1	0,34*	0,51	0,13	0,08	-0,02	0,23	0,27	0,08	0,38	0,21	0,13	0,37*	-0,17	0,1	-0,04	0,22	0,27	0,22	-0,07	0,13	-0,06	0,09
H5	**n**	41	80	90	88	46	85	29	19	56	44	21	50	46	59	70	124	71	25	33	30	91	97	57	15	71	59	78
	nA	14	16	17	17	16	18	14	17	19	15	13	18	17	16	17	19	17	13	16	11	18	15	16	11	11	12	13
	HO	0,85	0,89	0,88	0,90	0,78	0,81	0,93	0,95	0,86	0,86	0,90	0,88	0,80	0,85	0,83	0,80	0,83	0,88	0,85	0,63	0,95	0,92	0,95	0,93	0,73	0,85	0,86
	HE	0,88	0,87	0,85	0,88	0,86	0,87	0,89	0,90	0,90	0,89	0,88	0,90	0,87	0,86	0,87	0,89	0,9	0,88	0,89	0,79	0,88	0,84	0,85	0,85	0,86*	0,89	0,83
	FIS	0,03	-0,02	-0,03	-0,02	0,09	0,08	0,09	-0,04	0,05	0,03	-0,03	0,02	0,07	0,02	0,05	0,11	0,07	0	0,05	0,20	-0,08	-0,1	-0,11	-0,1	0,15	0,04	-0,04
B6	**n**	41	80	90	87	46	84	29	19	54	43	21	50	44	59	68	124	71	24	33	30	80	97	57	15	70	57	78
	nA	15	19	21	19	15	18	14	15	16	16	13	15	15	19	20	19	16	15	16	10	18	15	14	11	11	12	12
	HO	0,93	0,96	0,94	0,91	0,91	0,94	0,9	1	0,96	0,98	1	0,94	0,80	0,95	0,90	0,9	0,93	0,83	0,94	0,70	0,96	0,91	0,84	0,93	0,83	0,86	0,82
	HE	0,92	0,92	0,92	0,92	0,91	0,93	0,92	0,94	0,92	0,92	0,91	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,93	0,77	0,91	0,85	0,88	0,89	0,85	0,85	0,80
	FIS	-0,01	-0,04	-0,02	0,02	-0,01	-0,01	0,01	-0,07	-0,04	-0,06	-0,11	-0,02	0,14	-0,03	0,02	0,03	-0,02	0,1	-0,01	0,10	-0,05	-0,07	0,05	-0,05	0,03	-0,01	-0,03
F4	**n**	41	80	90	89	47	85	29	19	56	44	21	50	46	58	70	123	71	25	34	30	96	97	56	15	71	59	79
	nA	8	10	11	12	9	10	10	7	9	8	8	11	9	11	11	10	6	7	8	5	10	9	9	6	9	10	8
	HO	0,76	0,71	0,78	0,78	0,81	0,73	0,66	0,58	0,80	0,80	0,76	0,72	0,78	0,79	0,77	0,80	0,80	0,92	0,82	0,73	0,68	0,72	0,79	1	0,77	0,63	0,78
	HE	0,79	0,76	0,81	0,81	0,79	0,80	0,81	0,79	0,79	0,79	0,80	0,80	0,79	0,77	0,83	0,79	0,81	0,80	0,84	0,72	0,80	0,77	0,8	0,76	0,8	0,64	0,78
	FIS	0,04	0,06	0,04	0,05	-0,02	0,09	0,26	0,25	-0,02	-0,01	0,05	0,10	0,01	-0,03	0,07	-0,02	0	-0,15	0,02	-0,01	0,16	0,06	0,02	-0,33	0,04	0,02	-0,01
C10	**n**	41	80	90	89	47	84	29	19	56	44	21	50	45	60	68	124	71	25	34	30	93	97	57	15	70	59	77
	nA	21	20	20	21	16	21	14	14	21	19	16	19	18	21	17	21	20	16	18	9	20	17	17	12	10	9	12
	HO	0,90	0,84	0,72	0,81	0,74	0,88	0,72	0,95	0,82	0,7	0,86	0,86	0,91	0,88	0,78	0,85	0,79	0,84	0,82	0,77	0,84	0,91	0,58	0,93	0,64	0,71	0,70
	HE	0,90	0,91	0,88	0,87	0,89	0,90	0,89*	0,92	0,89	0,85	0,89	0,92	0,91	0,91	0,86	0,89	0,89	0,90	0,92	0,78	0,91	0,87	0,74*	0,91	0,76	0,78	0,76
	FIS	-0,01	0,09	0,18*	0,07	0,16	0,02	0,17	-0,04	0,08	0,18	0,04	0,07	-0,01	0,03	0,09	0,05	0,11	0,06	0,10	0,02	0,08	-0,04	0,22	-0,03	0,16	0,09	0,08

Tablica 7.2. Sažeta statistika za genetičku raznolikost vrste *Sparus aurata*, prikazuje broj uzoraka (n), broj alela (nA), zapaženu heterozigotnost (H_O), očekivanu heterozigotnost (H_E) i fiksacijski indeks (FIS) za 3 mikrosatelitna lokusa (cgSST) za svih 9 populacija.

Locus	Indices	15WT	16WV	15AK	15AB	15JN	15JP	15FC	15FI	16FF
Prl	n	40	38	32	26	40	46	16	35	22
	nA	18	18	17	16	15	18	13	12	10
	HO	0,68	0,74	0,75	0,69	0,78	0,70	0,81	0,80	0,82
	HE	0,93*	0,93*	0,93	0,93*	0,93	0,93*	0,89	0,86	0,84
	F_{IS}	0,28*	0,21*	0,19	0,26	0,17*	0,25*	0,09	0,07	0,03
Gh	n	39	38	32	26	40	47	16	35	23
	nA	14	13	14	11	13	13	9	10	6
	HO	0,85	0,92	0,81	0,88	0,70	0,85	0,88	0,89	0,74
	HE	0,87	0,88	0,87	0,84	0,87*	0,87	0,87	0,79	0,69
	F_{IS}	0,03	-0,04	0,07	-0,06	0,20	0,02	-0,01	-0,13	-0,08
Ramp3	n	39	37	31	25	40	45	16	35	22
	nA	5	9	4	6	5	7	5	4	5
	HO	0,64	0,62	0,58	0,64	0,68	0,64	0,81	0,31	0,73
	HE	0,63	0,64	0,62	0,67	0,64	0,67	0,75	0,30	0,69
	F_{IS}	-0,02	0,02	0,06	0,05	-0,06	0,03	-0,08	-0,04	-0,05

Tablica 7.3. Ukupna učinkovitost Bayesove metode implementirane u programe Newhybrids i STRUCTURE, za uspješno prepoznavanje hibrida primjenom R paketa hybriddetective (Wringe i sur. 2017) s različitim udjelom hibrida u podacima (15 %, 33 %, 66 %). Žuta boja naglašava pragove koji imaju dobru izvedbu.

a) Postavke - 15 % hibrida

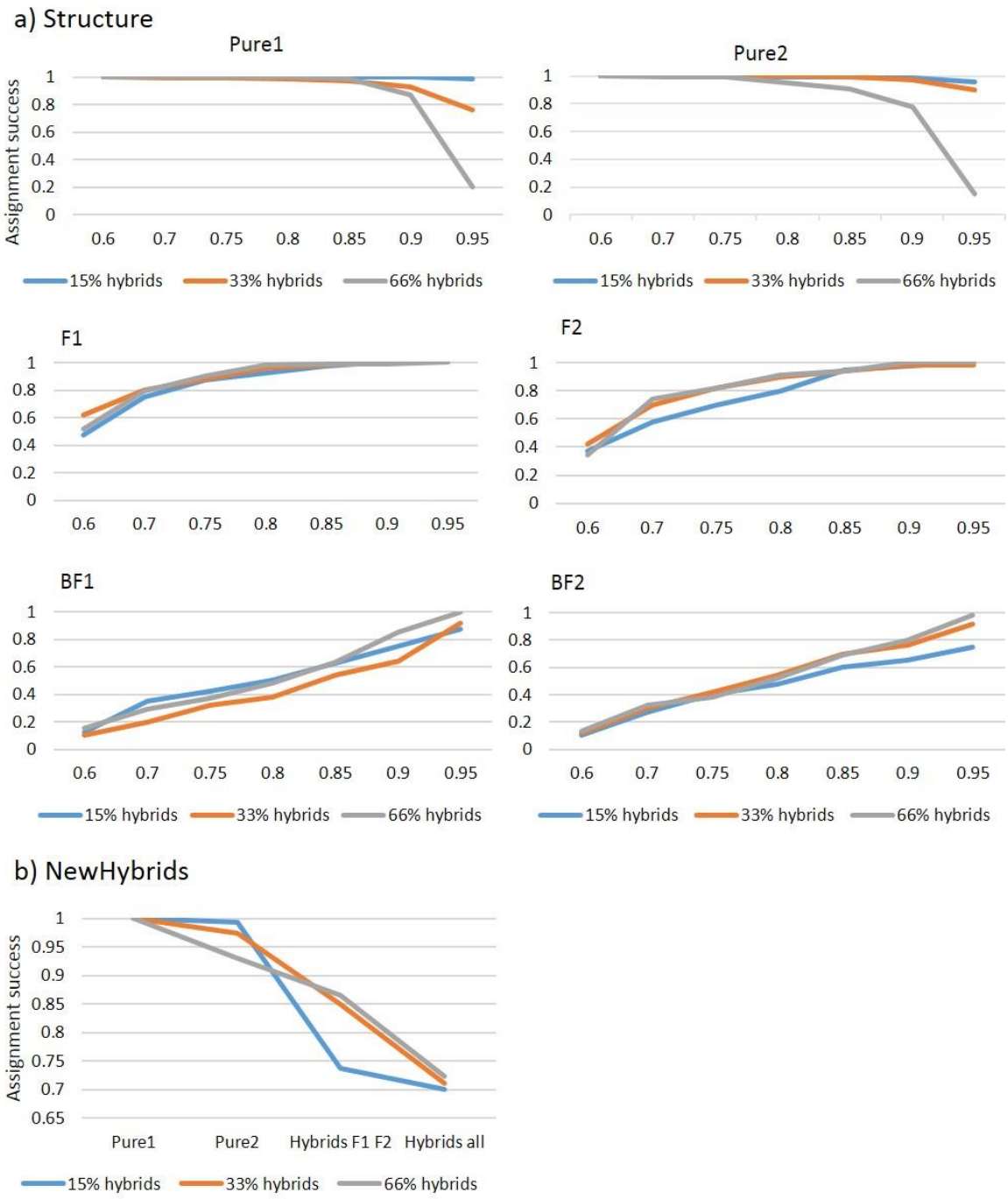
	Prag vjerojatnosti							
	NewHybrids			Structure				
	0,50	*0,60*	*0,70*	*0.75*	*0.80*	*0,85*	*0,90*	*0,95*
Čisti divlji	0,96	0,90	0,93	0,90	0,96	0,97	0,98	0,98
Čisti uzgojni	0,96	0,89	0,93	0,89	0,94	0,96	0,96	0,94
Hibridi F1_F2	0,66	0,41	0,66	0,77	0,83	0,91	0,90	0,55
Srednjak	**0,86**	**0,74**	**0,84**	**0,85**	**0,91**	**0,95**	**0,94**	**0,82**
	0,50	0,60	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95
Čisti divlji	0,96	0,90	0,93	0,90	0,96	0,97	0,98	0,98
Čisti uzgojni	0,96	0,89	0,93	0,89	0,94	0,96	0,96	0,94
Hibridi svi	0,72	0,26	0,48	0,59	0,66	0,76	0,80	0,76
Srednjak	**0,88**	**0,69**	**0,78**	**0,79**	**0,85**	**0,91**	**0,91**	**0,89**

b) Postavke - 33% hibrida

	Prag vjerojatnosti							
	NewHybrids			Structure				
	0,50	*0,60*	*0,70*	*0,75*	*0,80*	*0,85*	*0,90*	*0,95*
Čisti divlji	0,86	0,74	0,79	0,83	0,84	0,86	0,84	0,74
Čisti uzgojni	0,86	0,75	0,81	0,84	0,88	0,92	0,92	0,88
Hibridi F1_F2	0,83	0,52	0,74	0,84	0,91	0,89	0,83	0,59
Srednjak	**0,85**	**0,67**	**0,78**	**0,84**	**0,88**	**0,89**	**0,86**	**0,73**
	0,50	0,60	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95
Čisti divlji	0,86	0,74	0,79	0,83	0,84	0,86	0,84	0,74
Čisti uzgojni	0,86	0,75	0,81	0,84	0,88	0,92	0,92	0,88
Hibridi svi	0,69	0,32	0,50	0,61	0,69	0,76	0,76	0,70
Srednjak	**0,80**	**0,60**	**0,70**	**0,76**	**0,80**	**0,84**	**0,84**	**0,77**

c) Postavke - 66% hibria

	Prag vjerojatnosti							
	NewHybrids			Structure				
	0,50	0,60	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95
Čisti divlji	0,58	0,42	0,52	0,56	0,65	0,72	0,70	0,18
Čisti uzgojni	0,66	0,40	0,51	0,56	0,60	0,67	0,65	0,15
Hibridi F1_F2	0,84	0,43	0,76	0,86	0,92	0,92	0,85	0,55
Srednjak	**0,69**	**0,42**	**0,60**	**0,66**	**0,72**	**0,77**	**0,73**	**0,29**
	0,50	0,60	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95
Čisti divlji	0,58	0,42	0,52	0,56	0,65	0,72	0,70	0,18
Čisti uzgojni	0,66	0,40	0,51	0,56	0,60	0,67	0,65	0,15
Hibridi svi	0,71	0,29	0,53	0,62	0,71	0,79	0,83	0,70
Srednjak	**0,65**	**0,37**	**0,52**	**0,58**	**0,65**	**0,73**	**0,73**	**0,35**



Slika 7.1. Učinkovitost detekcije hibrida programima (a) Structure i (b) NewHybrids, za svaki genotip s promjenjivim omjerima hibrida u uzorcima (15 %, 33 %, 66 %) na temelju simuliranih pojedinačnih genotipova korištenjem 19 korištenih mikrosatelitskih lokusa. Za NewHybrids, kao prag je korištena samo vrijednost posteriorne vjerojatnosti od 50 %. Vrijednosti za sve hibride su zbrojene i svi se koriste kao jedna procjena za skupinu hibrida. (engl. *Hybrids:* hibridi)

8. ŽIVOTOPIS

Iva Žužul Vrgoč rođena je 22. lipnja 1990. godine u Imotskom, gdje završava osnovnu školu. Akademske godine 2009./2010. upisuje se na preddiplomski studij Sveučilišnog studijskog centra za studije mora Sveučilišta u Splitu, smjer Biologija i ekologija mora, te na istoimenom diplomskom studiju 2015. godine stječe sveučilišni stupanj magistre. Međusveučilišni poslijediplomski doktorski studij 'Primijenjene znanosti o moru' upisuje 2015. godine, od kada radi u Institutu za oceanografiju i ribarstvo. Laboratoriju za akvakulturu, te 2016. godine postaje znanstveni novak Hrvatske zaklade za znanost, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivana Katavića. U sklopu HRZZ projekta „AquaPop“ kojega je voditelj dr. sc. Tanja Šegvić-Bubić radi na doktorskom radu koji se bavi problematikom genetske varijabilnosti i strukture populacija komarče (*Sparus aurata*).

Sudjelovala je na sedam znanstveno-stručnih radionica:

- Physalia Courses (Berlin, Njemačka): Od 08. srpnja do 12. srpnja 2019. „Introduction to Environmental DNA research and analysis“.
- Course NourseFish Project (IOR, Split): 17. listopada 2018. „Isotopes in marine and fisheries ecology“.
- Physalia Courses (Berlin, Njemačka): Od 8. svibnja do 12. svibnja 2017. “Introductory Population Genomics: From Data to Inference“.
- InovaGen (Zagreb, Hrvatska): Od 14. listopada do 16. listopada 2016. „Nucleic Acids Research in Molecular Biology“.
- Transmitting science (Sbadell, Spain): Od 5. rujna do 9. rujna 2016. „From Phenotype to Genotype: The Genetoc Bases of Shape – 3rd Edition“.
- FAO-ADRIAMED project (Rim, Italija): Od 07. rujna do 11. rujna 2015. „The use of the R programing language for statistical analysis“.
- Sartorius (IOR, Split): 12. lipnja, 2015. „Bolji rezultati pipetiranja uz sigurnost i ergonomiju“.

Projekti na kojima je do sada sudjelovala:

- 2015-2019, AquaPop: Utjecaj akvakulture na prirodne morske populacije; pozicija: suradnik; Hrvatska zaklada za znanost; opis projekta: praćenje utjecaja akvakulturne

prozvodnje na populacije koje obitavaju u blizini uzgajališta te utjecaj prebjega na prirodne populacije; uloga: obrada genetske strukture i raznolikosti populacija komarče (Sparus aurata).

- 2017-2019, COCOA: Natjecanje između autohtone Ostrea edulis i invanzivne Crassostrea gigas školjke; pozicija: suradnik; UKF projekt.
- 2015-2016, PRUT: Praćenje ribolova i uzgoja tuna, pozicija: suradnik; Ministarstvo poljoprivrede, Hrvatska.
- 2015-2016, SCT: Primjena sustava stereoskopske kamere u procjeni tuna namijenjenih kaveznom uzgoju, pozicija: suradnik; Ministarstvo poljoprivrede, Hrvatska

Znanstveni radovi u Web of Science bazi:

Žužul, I., T. Šegvić-Bubić, I. Talijančić, T. Džoić, I. Lepen-Pleić, G. Beg Paklar, S. Ivatek-Šahdan, I. Katavić & L. Grubišić. 2019. Spatial connectivity pattern of expanding gilthead seabream populations and its interactions with aquaculture sites: a combined population genetic and physical modelling approach. Sci. Rep., 9: 14718.

Talijančić, I., T. Šegvić-Bubić, **I. Žužul**, T. Džoić, J. Maršić-Lučić & L. Grubišić. 2019. Interactions between wild gilthead seabream *Sparus aurata* and tuna farms in the Adriatic Sea: morphological and ecophysiological fish adaptations. Aquac. Environ. Interact., 11: 97-110.

Šegvić-Bubić, T., L. Grubišić, S. Zrnčić, S. Jozić, **I. Žužul**, I. Talijančić, D. Oraić, M. Relić & I. Katavić. 2016. Range expansion of the non-native oyster *Crassostrea gigas* in the Adriatic Sea. Acta. Adriat., 57: 321-330.

Stagličić, N., T. Šegvić-Bubić, P. Ugarković, I. Talijančić, **I. Žužul**, V. Tičina & L. Grubišić. 2017. Ecological role of Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fish farms for associated wild fish assemblages in Mediterranean Sea. Mar. Environ. Res., 132: 79-93.

Šegvić-Bubić, T., P. Arechavala-Lopez, I. Vučić, I. Talijančić, L. Grubišić, **I. Žužul** & Ž. Kovač. 2018. Site fidelity of farmed gilthead seabream *Sparus aurata* escapees in a coastal environment of the Adriatic Sea. Aquacult. Environ. Interact., 10: 21-34.

Znanstveni radovi u ASFA bazi:

Katavić, I., L. Grubišić, M. Mihanović, I. Petrina Abreu, I. Talijančić, T. Šegvić-Bubić & **I. Žužul**. 2018. Length-weight relationships applicable to bluefin tuna juveniles (*Thunnus thynnus*) caught for farming purposes during the purse seine fishing season in the Adriatic. Collective volume of scientific papers - International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, 74: 3515-3522.

Katavić, I.; L. Grubišić, V. Tičina, T. Šegvić-Bubić, J. Maleš, I. Talijančić & **I. Žužul**. 2017. Catch structure of purse seine bluefin tuna fishing in the Adriatic Sea: the first age frequency distribution estimate based on a spine age-length key. Collective volume of scientific papers - International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, 73: 2535-2542,

Kongresna priopćenja:

Žužul, I., T. Šegvić-Bubić, I. Talijančić, I. Katavić & L. Grubišić. 2019. Combination of molecular and morphological characteristics to assess different origins. 54th European Marine Biology Symposium - Book of Abstracts Dublin, Ireland, 88-88 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo) https://embs54,ucd,ie/wp-content/uploads/2019/08/EMBS54-Book-of-Abstracts,pdf

Talijančić, I., T. Šegvić-Bubić, **I. Žužul** & L. Grubišić. 2019. Human-mediated marine environments induce rapid phenotypic changes in wild fishes // 54th European Marine Biology Symposium - Book of Abstracts Dublin, Ireland, 31-31 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni) https://embs54,ucd,ie/wp-content/uploads/2019/08/EMBS54-Book-of-Abstracts,pdf

Pavičić, M., T. Šegvić-Bubić, **I. Žužul**, D. Vrdoljak & S. Matić-Skoko. 2019. Population structure and genetic diversity of the European lobster (*Homarus gammarus*). 54th European Marine Biology Symposium - Book of Abstracts Dublin, Ireland, 176-176 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni) https://embs54,ucd,ie/wp-content/uploads/2019/08/EMBS54-Book-of-Abstracts,pdf

Talijančić, I.; T. Šegvić-Bubić, **I. Žužul**, J. Maleš & L. Grubišić, Odgovori fenotipske plastičnosti riba u antropogenom uvjetovanom morskom okolišu. 13, Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem - Zbornik sažetaka Poreč, 142-143 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo) http://www,hbd-sbc,hr/kongres2018/zbornik-sazetaka/

Žužul, I., T. Šegvić-Bubić, I. Talijančić, I. Katavić & L. Grubišić. 2018. Molekularna identifikacija podrijetla komarče (*Sparus aurata L, 1758*) na području istočnog Jadrana // 13, Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem - Zbornik sažetaka Poreč, 147-148 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo) http://www,hbd-sbc,hr/kongres2018/zbornik-sazetaka/

Šegvić Bubić, T., L. Grubišić, I. Talijančić & **I. Žužul**. 2018. Gilthead seabream predation on mussel farms: a growing conflict // Book of Abstracts of the 69th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science / EAAP Scientific Committee (ur,), 6700 AE Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 295-295 (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni) https://doi,org/10,3920/978-90-8686-859-9

Ezgeta-Balić, D., T. Šegvić Bubić, **I. Žužul**, D. Bojanić Varezić, N. Stagličić, M. Peharda, I. Mandić. 2018. Feeding habits of the invasive Magallana gigas and native Ostrea edulis oysters in the Adriatic Sea – are they in competition? MARINE INVADERS - assessment and impact on aquatic ecosystems Neto, JoãoM, ; Lemos, Marco F,L, ; Novais Sara C, (ur,), Penich, Portugal: Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, 2018, str, 14-14 (poster, podatak o recenziji nije dostupan, sažetak, znanstveni)

Šegvić-Bubić, T., P. Arechavala-Lopez, I. Talijančić, **I. Žužul** & L. Grubišić 2016. Post-escape movements and habitat use of farmed sea bream Sparus aurata in the eastern Adriatic Sea. Journal of Aquaculture Research & Development., Lenzi, Mauro, 56-56 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni), https://www,omicsonline,org/conference-proceedings/2155-9546,C1,008_026,pdf

Šegvić-Bubić, T., N. Stagličić, L. Grubišić, J. Šiljić, I. Talijančić, **I. Žužul**, J. Pleadin & I. Katavić. 2017. Impact of semi-offshore tuna farms on fitness status of wild fish populations: gilthead seabream as a case study species from the eastern Adriatic Sea, Aquaculture Europe, Book of abstracts.

Žužul, I., T. Šegvić-Bubić, I. Talijančić, I. Mandić, L. Grubišić, I. Katavić & J. Maršić-Lučić, 2017. Genetic structure of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in the Adriatic Sea inferred with microsatellite markers, Aquaculture Europe 2017, Book of abstracts.

Talijančić, I., T. Šegvić-Bubić, **I. Žužul**, L. Grubišić, V. Tičina & I. Katavić. 2017. Phenotypic delineation of wild and farmed gilthead seabream (*Sparus aurata L*, 1758) along

the eastern Adriatic coast, Aquaculture Europe, Book of abstracts, https://www,was,org/EasOnline/AbstractDetail,aspx?i=8650